

**Charakterisierung spezieller pflanzlicher
 γ -Tubulin-Sequenzbereiche und Detektion
potentieller Interaktionspartner mittels
Yeast-two-Hybrid-System**

Dissertation
zum Erlangen des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Robert Lukeš
Geboren in Rüsselsheim
Mainz, im August 2008

*Was wir wissen, ist ein Tropfen,
was wir nicht wissen, ein Ozean.*

(Isaac Newton)

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Robert Lukes, Mainz, im August 2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Cytoskelett	1
1.1.1 Aufbau der Mikrotubuli	2
1.1.2 Funktion der Mikrotubuli.....	5
1.1.3 Mikrotubuli-Organisierende-Zentren (MTOCs)	7
1.1.4 Mikrotubuli-Organisierende-Zentren (MTOCs) bei Pflanzen	8
1.1.5 Mikrotubuli-Assoziierte Proteine (MAPs).....	11
1.1.6 γ -Tubulin-Ring-Komplexe (γ -TuRCs).....	12
1.1.7 γ -Tubulin-Small-Complexes (γ -TuSCs).....	16
1.1.8 Lokalisation von γ -Tubulin.....	18
1.1.9 γ -Tubulin bei Pflanzen.....	20
1.1.10 γ -Tubulin-Sequenzen und funktionelle Domänen	21
1.2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	24
2. Material und Methode	26
2.1 Sterilisation von Labormaterialien	26
2.2 Pflanzenmaterial	26
2.2.1 Anzucht des Pflanzenmaterials	27
2.2.2 Medien zur Anzucht des Pflanzenmaterials.....	28
2.2.3 Überimpfplan des Pflanzenmaterials	30
2.3 Bakterienstamm	31
2.3.1 Anzucht	32
2.3.1.1 Plattenkulturen.....	32
2.3.1.2 Flüssigkulturen	32
2.3.1.3 Dauerkulturen	32
2.3.2 Herstellung der Bakterien-Nährmedien	33
2.3.3 Vernichtung von Bakterien	34
2.4 Hefekulturen	34
2.4.1 Anzucht	35
2.4.1.1 Plattenkulturen.....	35
2.4.1.2 Flüssigkulturen	36
2.4.1.3 Dauerkulturen	36
2.4.2 Herstellung der Hefe-Medien	37
2.4.3 Vernichtung der Hefe	38
2.5 Nukleinsäurepräparation	38
2.5.1 Präzipitation von Nukleinsäuren.....	38
2.5.2 Probenvorbereitung für Nukleinsäureextraktionen	39
2.5.3 Extraktion von gesamt-RNA (gRNA).....	39
2.5.3.1 Isolation nach MacDONALD et al. (1987)	39
2.5.3.2 Isolation mit PeqGold RNA Pure™	40

2.5.3.3 Isolation mit Nucleobond AXR 400-Säulen.....	41
2.5.3.4 Isolation mit NucleoSpin®-RNA-Plant-Kit	42
2.6 Plasmidextraktion	44
2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mittels alkalischer Lyse	44
2.6.1.1 Isolierung ohne Säulenaufreinigung	44
2.6.1.2 Säulenchromatographische Isolierung.....	45
2.6.1.3 Säulenextraktion mit NucleoSpin® Plasmid-Kit	47
2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen	48
2.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	49
2.7.1 DNA-Längenstandards	49
2.7.2 Probenvorbereitung und Gelelektrophorese (Mini-Gel)	50
2.7.3 Dokumentation der Gele.....	52
2.8 Nukleinsäure-Nachweismethoden	52
2.8.1 Photometrische Bestimmung	52
2.8.2 Anfärbung mit Ethidiumbromid	52
2.8.3 Anfärbung mit SYBR®Gold	53
2.9 Reverse Transkription.....	53
2.10 Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	55
2.11 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	56
2.12 Verwendete Oligonukleotid-Primer	58
2.13 Erstellung einer c-DNA Bibliothek.....	59
2.13.1 Primer für die cDNA-Bibliothek Synthese	60
2.13.2 Erststrangsynthese	61
2.13.2 Zweitstrangsynthese.....	62
2.14 Nachweis von Protein-Interaktionen mittels Y2H-System	63
2.15 Verwendete Vektoren	65
2.15.1 Klonierungsvektor	65
2.15.2 Vektoren des Yeast-Two-Hybrid-System.....	66
2.15.2.1 GAL4-Klonierungsvektoren.....	67
2.15.2.2 Kontrollvektoren.....	70
2.15.2.3 Referenzvektor	71
2.16 Konstruktion der Y2H-Köderplasmide	72
2.17 Restriktion	74
2.18 Ligation	75

2.19 Transformation von Bakterien	76
2.19.1 Herstellung kompetenter Bakterien	76
2.19.2 Transformation mit anschließender Blau-Weiß-Selektion.....	77
2.20 Herstellung chemisch kompetenter Hefen für die Transformation	78
2.20.1 Co-Transformation der Hefe AH 109	80
2.20.1.1 Ausplattierung der transformierten Hefen	81
2.20.1.2 Berechnung der Transformationseffizienz	81
2.20.2 Mating der Hefen AH 109 und Y 187.....	82
2.20.2.1 Ausplattieren der Matingansätze	83
2.20.2.2 Berechnung der Mating-Effizienz	83
2.20.3 Blau-Weiss-Selektion mittels X- α -Gal.....	84
2.21 DNA-Sequenzierung	85
2.22 Computergestützte Sequenzanalysen	86
3. Ergebnisse zur Untersuchung von γ-Tubulin-Teilsequenzen.....	87
3.1 Auswahl des Pflanzenmaterials	87
3.2 Ribonuklease (RNA)-Extraktion	87
3.2.1 Resultate der RNA-Extraktionen.....	87
3.2.2 Gelelektrophoretischer Nachweis der RNA.....	89
3.3 Amplifikation der γ-Tubulin-Teilsequenzen mittels PCR.	90
3.4 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten.....	91
3.5 Klonierungsergebnisse mittels Blau/Weiss-Screening	92
3.6 Charakterisierung der Klone mittels Kolonie-PCR.....	93
3.7 Mengenabschätzung der Klone für eine Cyclesequenzierung-Reaktion.....	93
3.8 Sequenzierungsergebnisse.	94
3.9 Alignment der γ-Tubulin-Aminosäure-Teilsequenzen	94
3.10 Phylogenetischer Stammbaum aller bekannten und ermittelten pflanzlichen γ-Tubulin-Teilsequenzen.....	95
3.11 Merkmalsübersicht aller Pflanzen mit bekannter γ-Tubulin-Teilsequenz	96
4. Ergebnisse zur Ermittlung von γ-Tubulin-Interaktionspartnern mittels Y2H	98

4.1 Phänotypentest der Hefestämme AH109 und Y187	98
4.2 Gesamt-RNA-Extraktion (gRNA) von BY2-Zellen (<i>Nicotiana tabacum</i>)	100
4.3 Konstruktion der Köder- und Beutepalsmide	101
4.3.1 Amplifikation der γ -Tubulin-Sequenzen AB, AB+, AB-c-term und γ -Tub.....	101
4.3.2 Subklonierung in den pGEM®-T Vektor	102
4.3.3 Klonierung in die Yeast Two-Hybrid Vektoren.....	103
4.3.4 Sequenzierung der in den Bindedomänenvektor inserierten Sequenz	104
4.4 Überprüfung der Tertiärstruktur der γ-Tubulin-Konstrukte	107
4.5 Ergebnisse der Zweitstragsynthese	109
4.6 Linearisierung des pGADT₇-Rec-Vektors	110
4.7 Transformation von AH109 mit dem pGADT₇-Rec-Vektor und einer aufgereinigten cDNA-Bibliothek	111
4.8 Verifizierung der cDNA-Sequenzen im pGADT₇-Rec-Vektor	112
4.9 Kontrollvektoren-Test	114
4.9.1 Transformation der Hefestämme mit den Kontrollvektoren	114
4.9.2 Transformation von AH109 und Y187 mit den BD-Kontrollvektoren pGBKT ₇ -53 und pGBKT ₇ -Lam	115
4.9.3 Transformation von AH 109 mit dem AD-Kontrollvektor pGADT ₇ -T	116
4.10 Transformation mit dem Referenzvektor pCL1	117
4.11 Transformation der Hefestämme AH109 und Y187 mit den Bindedomänenvektoren pGBKT₇/AB, pGBKT₇/AB+, pGBKT₇/Ab_{c-term} und pGBKT₇/ γ-Tub	118
4.12 Nachweis der pGBKT₇-Plasmide und Verifizierung der γ-Tubulin-Peptidsequenzen	120
4.13 Prüfung auf Eigenaktivierung der Reportergene durch die Köder-konstrukte	120
4.14 Screening einer c-DNA-Bibliothek mittels sequenzieller Transformation	125
4.15 Screening einer c-DNA-Bibliothek mittels Mating	129
4.16 Identifikation der Beutesequenzen	137
5. Diskussion	145
5.1 Sequenzuntersuchungen des γ-A- und γ-B-Peptidmotivs	145
5.2 Die ermittelten γ-Tubulin-Sequenzen	148

5.3 Detektion von Interaktionspartnern mittels Y2H-System	149
5.3.1 Problematik der Entstehung falsch positiver und falsch negativer Interaktionspartnern.....	151
5.3.2 Sequenzielle Co-Transformtion und Mating im Vergleich	152
5.3.3 Eigenaktivierungstests	155
5.3.4 Transformation der Hefezellen	157
5.3.5 Homologe Transformation.....	158
5.3.6 Qualität der RNA und cDNA-Bibliothek	159
5.3.7 <i>Saccaromyces cerevisiae</i> als Expressionsvektor.....	161
5.3.8 Amplifikation und Sequenzierungsqualität der MCS des pGADT ₇ -Rec-Vektors	162
5.3.9 Mögliche funktionelle Defizite infolge inkorrektter Struktur und veränderter Oberflächeneigenschaft der Proteine	163
5.3.10 Identifizierte Proteine	165
5.3.10.1 Identifikation der S-Adenosyl-L-Methionin-Synthetase	166
5.3.10.2 Identifikation der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GDADP)...	167
5.3.10.3 Identifikation diverser Peroxydasen	170
5.3.10.4 Identifikation des Poly-(A)-Bindeproteins	171
5.3.11 Indizien für eine Kooperation zwischen Actinfilamenten und Mikrotubuli	172
5.4 Ausblick	176
6. Zusammenfassung	177
7. Literaturverzeichnis	181
8. Anhang	199
8.1 Transformationseffizienzen der ersten Transformationen	199
8.2 Transformationseffizienzen der zweiten Transformationen und Anzahl gescreenter Klone	200
8.3 Übersicht über die Ergebnisse des Matings und die Matingeffizienzen	200
8.4 Alignments der identifizierten Beutesequenzen mit bekannten Homologen	203
8.5 Materialien	212
8.5.1 Chemikalien und andere Reagenzien	212
8.5.2 Enzyme	213
8.5.3 Labormaterialien.....	213
8.6 Abkürzungen	214
8.7 Symbole für die Darstellung der Aminosäuren	215

1. Einleitung

1.1 Das Cytoskelett

Eukaryotische Zellen besitzen ein cytoplasmatisches Netzwerk von Proteinfilamenten, das als Cytoskelett bezeichnet wird. Diese komplexe Struktur erstreckt sich über das gesamte Cytoplasma und vermittelt eine Vielzahl von Funktionen. Es ist neben der Festlegung der äusseren Zellform und der Definition der Zelldifferenzierungsrichtung für die Organisation und für die Stabilisierung der einzelnen Zellkomponenten zuständig. Außerdem sorgt es für die Fähigkeit zur Formveränderung. Zusätzlich nimmt das Cytoskelett dynamische Aufgaben wahr. Zusammen mit krafterzeugenden Proteinen (z.B. Myosin, Kinesin, Dynein) dient es der zellulären und intrazellulären Bewegung (BASKIN 2000, ALBERTS et al. 1999).

Die Proteinfilamente des Cytoskelettes werden aufgrund ihres Durchmessers in drei Hauptgruppen unterteilt: Mikrofilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Den geringsten Durchmesser dieser Cytoskelettkomponenten weisen mit 8 nm die faserigen helikal aufgebauten Mikrofilamente auf. Mikrotubuli sind Röhren mit einem Aussendurchmesser von 25 nm und einem Innendurchmesser von 14 nm. Dazwischen liegen mit etwa 10 nm Durchmesser die Intermediärfilamente (z.B. NULTSCH 2001).

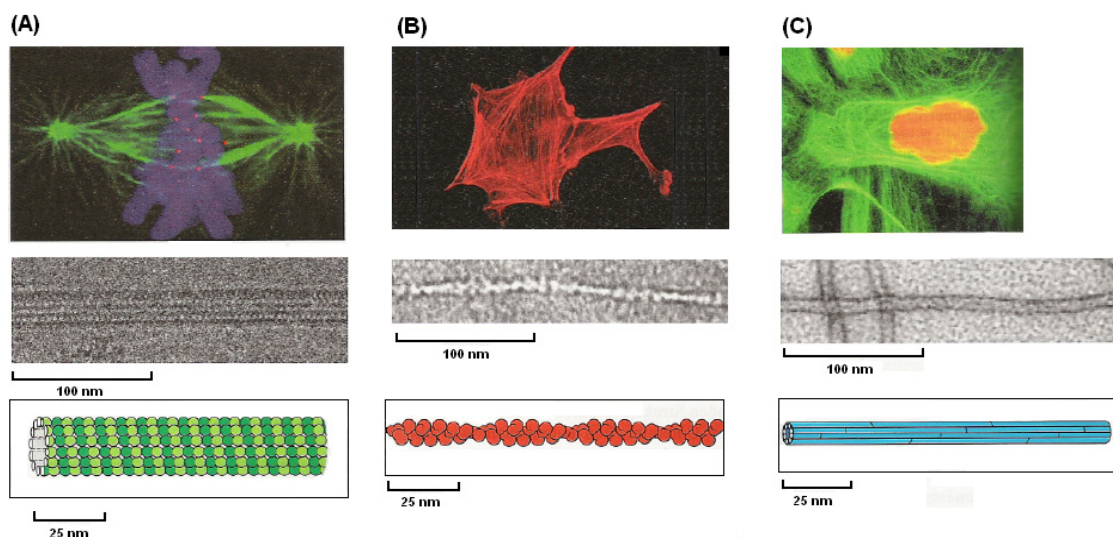


Abb. 1 Proteinfilamente des Cytoskeletts: Immunfluoreszenz-Aufnahmen, Elektronenmikroskop-aufnahmen und Modelle dreier Proteinfamilien aus denen das Cytoskelett aufgebaut ist. A) Röhrenförmige Mikrotubuli, B) Mikrofilamente (Actinpolymere), C) Intermediärfilamente. (Verändert nach: BECKER et al., 2000)

Die Intermediärfilamente sind in ihrem Vorkommen wahrscheinlich auf tierische Zellen beschränkt. Ein sicherer Nachweis über ihr Auftreten bei höheren Pflanzen erweist sich aufgrund ihrer starken Heterogenität bislang als schwierig (MENZEL 1993). Man spricht hier von intermediärähnlichen Strukturen. Mikrofilamente und Mikrotubuli können hingegen in allen pflanzlichen Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Intermediärfilamenten sind sie polar organisiert und deutlicher einem ständigen Auf-, Um- und Abbau unterworfen. Die Mikrofilamente, welche auch als Actinfilamente bezeichnet werden sind mitverantwortlich für die elastischen Eigenschaften des Cytoplasma. Sie bewerkstelligen zusammen mit dem Protein Myosin die Cytoplasmaströmung in der pflanzlichen Zelle. Mikrotubuli sind an mehreren Prozessen in der eukaryotischen Zelle maßgeblich beteiligt. Sie sind in der Lage, ähnlich wie die Mikrofilamente, intrazelluläre Translokationen cytoplasmatischer Bestandteile zu bewerkstelligen (LUDUENA 1998). Dazu gehören der Vesikeltransport in Nervenzellen, sowie die Verschiebung der Chromosomen innerhalb der Kernspindel während der Mitose. Die Kolokalisation kortikaler Mikrotubuli mit Cellulose-Mikrofibrillen weist darauf hin, dass ihnen eine Aufgabe bei der Steuerung der Cellulosesynthase-Komplexe zukommt (zur Übersicht siehe ALBERTS et al. 1999). Zusammen mit Mikrotubuli-assoziiierenden Proteinen (MAPs) sorgen Mikrotubuli in den Cilien und Flagellen für die Motilität von begeißelten Organismen (CHAPMAN et al. 2000). Der Aufbau der Mikrotubuli wird im nachfolgenden Abschnitt näher beschrieben.

1.1.1 Aufbau der Mikrotubuli

Die Mikrotubuli sind röhrenförmige Filamente, die typischerweise aus 13 parallel angeordneten Protofilamenten bestehen. Jedes Protofilament ist aus einer linearen Kette von Heterodimeren der strukturell nah miteinander verwandten globulären Proteine α - und β -Tubulin zusammengesetzt. Innerhalb des Mikrotubulus sind die Tubulin-Heterodimere entlang ihrer Längsachse leicht gegeneinander verschoben, was eine spiralförmige Anordnung der Untereinheiten im Gitterwerk der Mikrotubuliwand bewirkt (MANDELKOW 1994, BASKIN 2000). Die Mikrotubuli besitzen eine polare Struktur, die aus der geordneten Verbindung der Monomere zueinander resultiert.

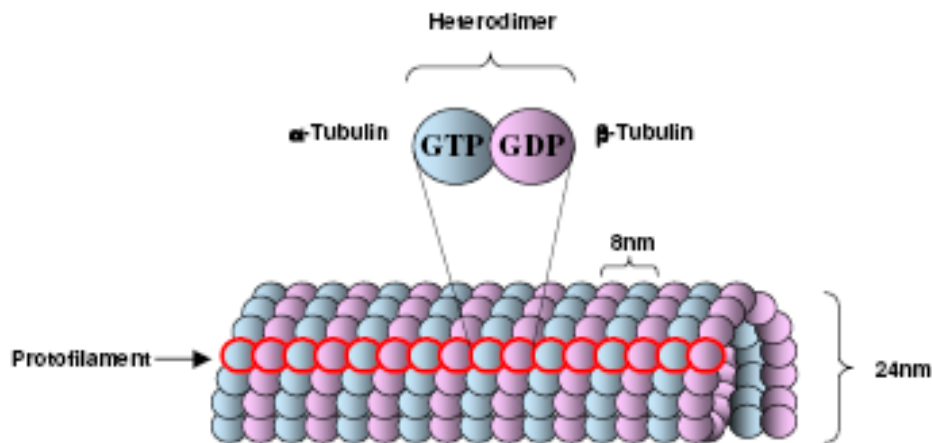


Abb. 2 Anordnung der Tubulin-Untereinheiten in einem Mikrotubulus: Polare Anordnung der Heterodimere, deren Zusammenlagerung zu einem Protofilament (rot umrandet) und schließlich zu einem Mikrotubulus. (Verändert nach LODISH et al. 2001).

Die Assemblierung und das Wachstum der Tubuline der Mikrotubuli erfolgt mittels GTP-aktivierter Heterodimere. Aufgrund der raschen Hydrolyse der Tubulin-Dimere zum instabileren GDP-Tubulin, kann ein Wachstum der Mikrotubuli nur dann erfolgen, wenn genügend GTP-Tubulin nachgeliefert wird. Das sogenannte GTP-Cap wachsender Mikrotubuli wirkt strukturstabilisierend und fördert ihr weiteres Wachstum (BASKIN 2000). Der Bereich der GTP-Tubulinanlagerung wird als Plus-Ende bezeichnet. Das Mikrotubulusende mit GDP-Tubulin wird Minus-Ende genannt und unterliegt der Depolarisation. Konsequenz ist das sogenannte Tretmühlen-Verhalten der Mikrotubuli, das durch die unterschiedliche freie Energie der Anlagerungs- und Dissoziations-Reaktionen an den Plus- und Minus-Enden des Mikrotubulus hervorgerufen wird. (ALBERTS et al. 2004). Je nach Konzentration an freiem Tubulin kann jedes Ende eines Mikrotubulus zwischen einem wachsenden und einem schrumpfenden Zustand wechseln (ALBERTS et al. 2004). Wachsende Mikrotubuli lagern GTP-bindende Untereinheiten an. Wenn die Hydrolyse des Nucleotids schneller erfolgt als die Anlagerung neuer Untereinheiten, bedingt dies den Verlust der GTP-Kappe, der Mikrotubulus beginnt zu schrumpfen. Durch Anlagerung neuer GTP-tragenden Untereinheiten kann es jedoch zu einem weiterem Wachstum des Mikrotubulus kommen (ALBERTS et al. 2004). Der rasche Wechsel zwischen Wachsen und Schrumpfen bei gleich bleibender Konzentration freier Untereinheiten wird als dynamische Instabilität bezeichnet (ALBERTS et al. 2004). Während Tubulin-untereinheiten mit einem an das β -Monomer gebundenen GTP gerade Protofilamente

bedingen, bewirkt GTP-Hydrolyse Konformationsänderungen des Proteins. Ein Ausgleich dieser Krümmungen kann bei einem schnell wachsenden Mikrotubulus durch die GTP-Kappe ausgeglichen werden. Sind die Nucleotide am Ende jedoch hydrolysiert, führt dies zur Separation der Protofilamente voneinander. Durch die kooperative Freisetzung der im Verbund des Mikrotubulus gespeicherten Energie wird die Depolymerisation beschleunigt (ALBERTS et al. 2004, BASKIN 2000). Beide Enden pflanzlicher Mikrotubuli unterliegen im Gegensatz zu tierischen, deren Minus-Enden keine Dynamik zeigen, einer Instabilität (SHAW et al. 2003). Diese Ergebnisse unterstützen einen Hybrid-Treadmilling-Mechanismus, bei dem die dynamische Instabilität der Plus-Enden durch die Polymerisation beeinflusst wird, während die Minus-Enden einer allmählichen und zeitweise unterbrochenen Depolymerisation unterliegen (LLOYD & CHAN 2004).

In der Zelle zeigen hauptsächlich Actinfilamente Tretmühlen-Verhalten. Bei Mikrotubuli tritt es hinter der vorherrschenden dynamischen Instabilität zurück (BASKIN 2000). Dynamische Instabilität und Tretmühlen-Verhalten ermöglichen der Zelle den Gesamt-Filamentanteil konstant zu halten, obwohl ständig einzelne Untereinheiten zwischen Filamenten und Cytosol ausgetauscht werden. Der Vorteil dieser Dynamik liegt in der räumlichen und zeitlichen Anpassungsfähigkeit an verschiedene Funktionen der Zelle (ALBERTS et al. 2004, BASKIN 2000).

Mikrotubuli entstehen *in vitro* unter Präsenz von GTP und Mg^{2+} in Abhängigkeit von der Tubulin-Dimer-Konzentration spontan. *In vivo* wird die spontane Zusammenlagerung durch eine niedrige endogene Tubulin-Konzentration vermieden (KELLOG et al. 1994). Der limitierende Schritt ist die Initiation der Keimbildung des Mikrotubulus, aus der die Elongation erfolgt (DESAI & MITCHISON 1998). Vermutlich wird diese durch Proteine reguliert, welche mit dem Mikrotubulus interagieren (WIESE & ZHENG 2000). Es wird diskutiert, ob eventuell auch ein γ -Tubulin-Monomer genügt, um die Keimbildung zu initiieren, indem es die Hydrolyse von GTP am Minus-Ende unterbindet (LEGUY et al. 2000).

Die während der spontanen Polymerisation oder Depolymerisation der Mikrotubuli freigesetzte Energie kann genutzt werden, um mechanische Arbeit zu leisten, zum Beispiel um eine bestimmte Fracht, Vesikel, Organellen oder die Chromosomen während der Anaphase zu befördern, oder um sie an definierten Stellen zu verankern (ALBERTS et al. 2004, BASKIN 2000). Diese Vorgänge werden durch die Funktion der Motorproteine Dynein und Kinesin ergänzt.

Tubulin-Dimere sind grundsätzlich zur Selbstassemblierung in der Lage, haben *in vivo* jedoch meist ihren Ursprung in MTOCs (Microtubule Organizing Centers). MTOCs sind Nukleationstellen für Mikrotubuli und schützen die Minus-Enden vor unkontrollierter Depolarisation.

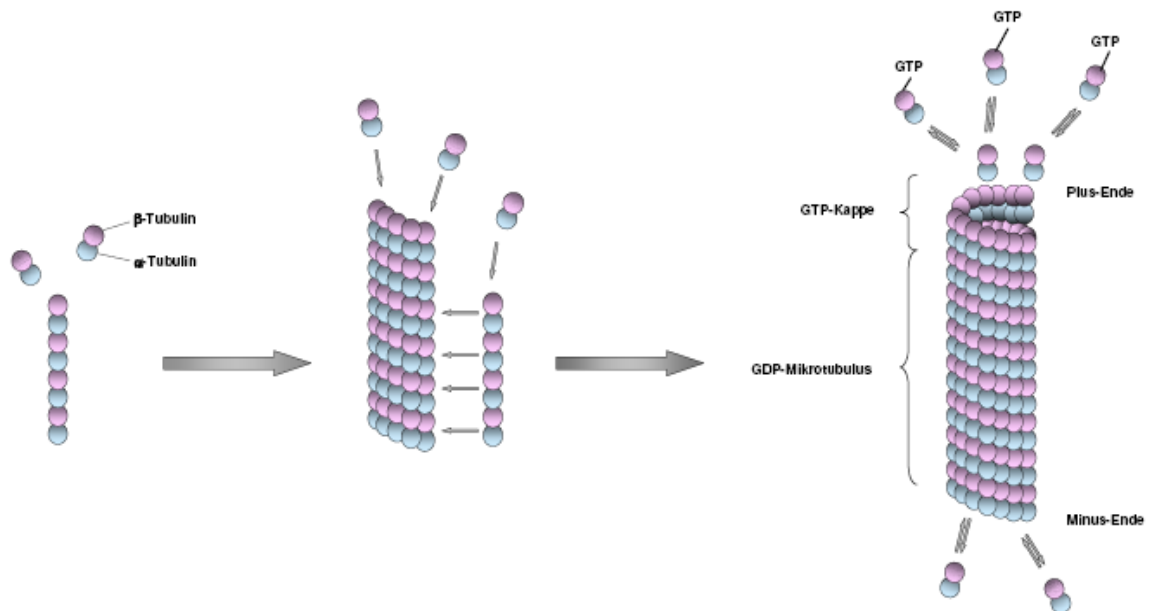


Abb. 3 Aufbau von Mikrotubuli: Nach Anlagerung freier $\alpha\beta$ -Heterodimeruntereinheiten zu Protofilamenten, können diese sich zu zylinderförmigen Mikrotubuli zusammenlagern. Das anschließende Wachstum erfolgt durch Anlagerung von Tubulindimeren vorzugsweise am Plus-Ende (Quelle: LODISH et al. 2001)

1.1.2 Funktion der Mikrotubuli

Mikrotubuli erfüllen zahlreiche Funktionen innerhalb pflanzlicher Zellen. Als Strukturen des Cytoskeletts sind sie in die Mitose und Cytokinese involviert und während des Zellzyklus hoch dynamisch (BASKIN 2000). Während der Interphase bilden Mikrotubuli kortikale Strukturen, die innerhalb der Plasmamembran in einem Abstand von 200 nm zu dieser im kortikalen Cytosol liegen (BASKIN 2000) und die Zelle umgeben. Sie sind in die Disposition der Cellulosesynthase-Komplexe und somit in die gerichtete Ablagerung der Cellulose involviert (BASKIN 2000, GARDINER & MARC 2003, VAUGHN & HARPER 1998). Sie definieren und regulieren folglich die Richtung der Zellelongation (LLOYD & CHAN 2004).

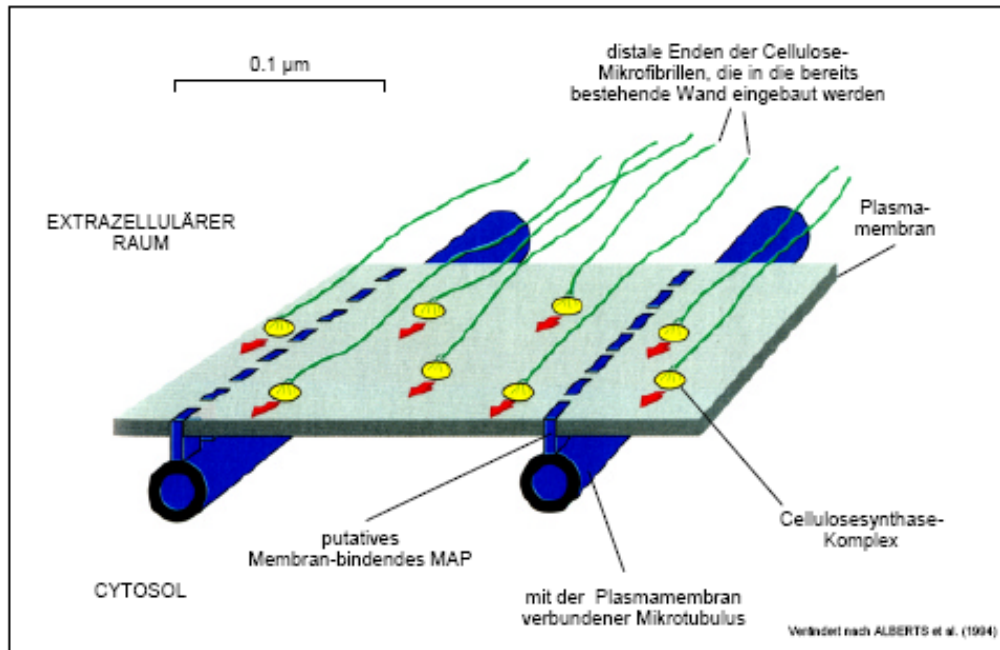


Abb. 4 Modell der gerichteten Biosynthese der Cellulose: Die Beweglichkeit der transmembranen Cellulosesynthese-Komplexe wird eingeschränkt durch kortikale Mikrotubuli. Dadurch wird die Orientierung der Cellulose-Mikrofibrillen vorgegeben und die Textur der Zellwand geprägt. Verändert nach ALBERTS et al. (1994).

Während der Zellteilung bilden Mikrotubuli in somatischen Zellen ein dichtes Präprophaseband, welches im Kortex den Zellkern umgibt und die Zellteilungsebene für die folgende Mitose und Cytokinese festlegt (GARDINER & MARC 2003, VAUGHN & HARPER 1998).

Zu Beginn der Mitose kommt es zu einer enormen Zunahme der mit dem Zellkern in Verbindung stehenden Mikrotubuli (VAUGHN & HARPER 1998). Sie formen eine breite bipolare Mitosespindel zur Trennung der Chromosomen (GARDINER & MARC 2003). Mikrotubuli verbinden den Spindelpol mit dem Kinetochor der Chromosomen, wobei die Minus-Enden zum Pol, die Plus-Enden zum Kinetochor gerichtet sind. Durch die Depolymerisation der Mikrotubuli werden die Chromosomen in Richtung der Pole bewegt (ALBERTS *et al.* 2004). In der späten Anaphase bzw. zu Beginn der Telophase bilden sie den Phragmoplast, welcher für die Festlegung der neuen Zellwand entscheidend ist (GARDINER & MARC 2003).

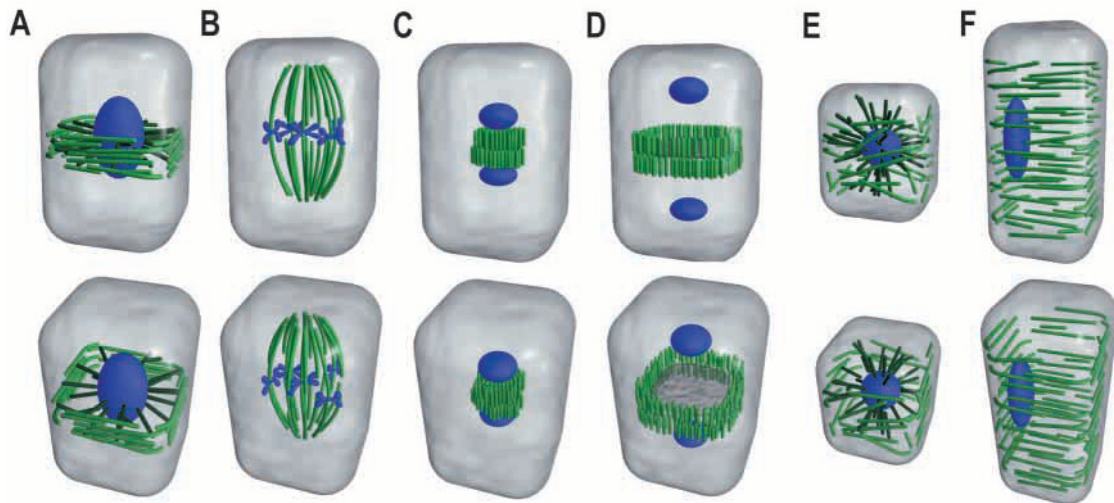


Abb. 5 Funktionen der Mikrotubuli im Laufe des Zellzyklus: (A) Präprophaseband, welches die Ebene für die folgende Mitose und Cytokinese festlegt. (B) Bipolare Mitosespindel zur Trennung der Chromosomen. (C) Formierung zum zylinderförmigen Phragmoplasten zwischen den Tochterzellkernen, der sich (D) zentrifugal bis zur Zellwand ausdehnt. (E) Verteilung der Mikrotubuli zum Kortex nach Abschluß der Cytokinese. (F) Kortikal ausgerichtete Mikrotubuli während der Interphase. (verändert nach WASTENEYS 2002).

Mikrotubuli dienen zudem als Netzwerk für Golgi-Vesikel, die das Zellwandmaterial enthalten. Außerdem fixieren sie die Lage der membranumschlossenen Organellen, bewirken die Verankerung des Zellkerns, und leiten intrazelluläre Transporte. Die Verankerung des Cytoskeletts an der Zellmembran kann vermutlich auch eine Rolle in der Informationsleitung spielen (BASKIN 2000).

1.1.3 Mikrotubuli-organisierende-Zentren (MTOCs)

In vielen Organismen gehen die Mikrotubuli aus morphologischen Strukturen hervor, welche erstmals 1969 von PICKET-HEAPS als Mikrotubuli-organisierende-Zentren (MTOCs) beschrieben wurden. (OVECHINKA und OAKLEY 2001). Typische MTOCs sind die Centrosomen der tierischen Zellen. Sie bestehen aus zwei rechtwinklig zueinander stehenden Centriolen, welche von einer amorphen Matrix, dem pericentriolarem Material (PCM), umgeben sind. Die Centriolen gleichen Zylinder, die aus neun radiär angeordneten Mikrotubuli-Tripletts aufgebaut sind (PREBLE et al. 2000). Auch die Basalkörper der Flagellen und Cilien sind auf diese Weise aufgebaut.

Beide Organellen, Centriolen und Basalkörper, sind Ausgangspunkte für die Polymerisation der Mikrotubuli.

Die im Tierreich weit verbreiteten Centriolen kommen im Pflanzenreich jedoch nur bei einigen Algen und bei der Spermatogenese in Bryophyten und wenigen Gymnospermen vor. Über das Vorkommen von MTOCs ist bei den Pflanzen noch recht wenig bekannt. Es scheint, dass diese diffus im cortikalen Bereich des Cytoplasma liegen oder in dem an der Kernhülle grenzenden Cytoplasma aufzufinden sind. (VAUGHN und HARPER 1998).

Ein wichtiger Bestandteil der MTOCs scheint das im Jahre 1989 von OAKLEY und OAKLEY entdeckte γ -Tubulin zu sein. Es stellt ein weiteres Mitglied der Tubulin-Superfamilie dar. Es ist Bestandteil des pericentriolaren Materials der Centrosomen und spielt vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Nukleation und Assemblierung der Mikrotubuli (OAKLEY 2000).

1.1.4 Mikrotubuli-organisierende-Zentren (MTOCs) bei Pflanzen

Hinsichtlich des Vorkommens der MTOCs im Pflanzenreich bestehen noch Ungewissheit und Kontroversen. In begeißelten Algen konzentriert sich die Organisation der Mikrotubuli an den Basalkörpern und dem Pericentriolären Material. In vielzelligen, unbegeißelten Algen und niederen Landpflanzen, die noch Centriolen besitzen, werden Interphasemikrotubuli vom pericentriolären Material organisiert. In Moosen ist wahrscheinlich die Zellkernoberfläche für die Verankerung der Mikrotubuli verantwortlich. Die Spindel der Moose weist bereits eine breite, den Spindeln der höheren Landpflanzen ähnliche Morphologie auf. Während der Spermatogenese kommen in niederen Landpflanzen wie Bryophyten und Pteridophyten strukturell definierte MTOCs in Form von Blepharoplasten vor, die Organisation der Spindel-Mikrotubuli geht jedoch eventuell von Plastiden aus (MARC 1997, VAUGHN & HARPER 1998). Innerhalb der Gymnospermen besitzen nur die Spermatozoen einiger weniger Arten Centriolen (MARC 1997). In den Zellen der meisten höheren Landpflanzen finden Mikrotubuli ihren Ursprung aufgrund des Fehlens des Centrosoms und den Spindelpolkörpern (VAUGHN & HARPER 1998, OVECHKINA & OAKLEY 2001) aus zahlreichen diffusen und breiten Verankerungsstellen, den sogenannten Nukleationsstellen (Nucleationsites) (BASKIN 2000, OVECHKINA & OAKLEY 2001).

Die Existenz von γ -Tubulin ist seit einigen Jahren in Pflanzenzellen dokumentiert worden. Distinkte Mikrotubuli-organisierende-Komplexe und deren Komponenten konnten bisher jedoch nicht definitiv identifiziert werden. Die Verankerung der Mikrotubuli an MTOCs in Pflanzen ist bisher nicht geklärt. Ein Homolog des Proteins Spc98p, welches in Hefezellen Bestandteil des γ -TuRC (γ -Tubulin Ringcomplex) ist und mit γ -Tubulin interagiert, wurde in Pflanzen analog zum γ -Tubulin an der Zellkernoberfläche nachgewiesen (ERHARDT *et al.* 2002). Dies ist ein Hinweis, dass zu γ -TuSCs homologe Strukturen in pflanzlichen Zellen vorliegen könnten. Es bleibt jedoch die Suche nach funktionell analogen Komplexen zu Spindelpolkkörpern und Centrosomen offen. Diskutiert wird ebenfalls die Funktion von δ - und ϵ -Tubulin. δ -Tubulin wurde als Bestandteil der Triplett-Mikrotubuli in Basalkörpern, ϵ -Tubulin in Abhängigkeit vom Zellzyklusstadium am Centrosom nachgewiesen. (INCLÁN & NOGALES 2001).

Die Zellkernoberfläche wird primär als Ort der Mikrotubuli-Verankerung angesehen (STOPPIN *et al.* 1994), allerdings werden sekundäre Verankerungsstellen nicht ausgeschlossen, da γ -Tubulin entlang der gesamten Länge der Mikrotubuli, in allen Pflanzen und allen Stadien des Zellzyklus nachgewiesen werden konnte (LIU *et al.* 1993, JOSHI & PALEVITZ 1996, MURATA *et al.* 2005). In Verbindung mit diesen γ -Tubulin-Molekülen konnten keine Spc98-Homologe dokumentiert werden (ERHARDT *et al.* 2002), sodass die Vorstellungen bezüglich der Lokalisation von pflanzlichen MTOCs zunächst auf kernnahe Regionen beschränkt blieben. Ein Nachweis von γ -Tubulin-Molekülen und Spc98-Homologen im Zellkortex (ERHARDT *et al.* 2002) gibt Anlass zur Annahme über Mikrotubuli-Verankerungsstellen am Plasmalemma. Ausserdem wird die Rolle des glatten Endoplasmatischen Reticulums als MTOC diskutiert (VAUGHN & HARPER 1998).

Es verdichten sich die Hinweise auf kortikale Ursprünge der Mikrotubuli-Stränge. Anheftpunkte an der Innenseite der Plasmamembran konnten belegt werden (LLOYD & CHAN 2004). Folglich müsste die Organisation des Netzwerkes der Mikrotubuli nach der Verankerung beeinflusst werden (LLOYD & CHAN 2004). Es wird propagiert, dass Membranbestandteile in die acentrosomale Verbindung von Mikrotubuli involviert sein könnten (DRYKOVÁ *et al.* 2003). Sie scheinen ausgehend von über die Zelle verteilten, kortikalen, flexiblen Stellen verknüpft und organisiert zu werden. (BINAROVÁ *et al.* 2006, ECKARDT 2006, LLOYD & CHAN 2004, siehe auch SHAW *et al.* 2003).

Diskutiert wurde in diesem Zusammenhang auch die Fähigkeit der Eigenorganisation durch die Mikrotubuli (HEALD *et al.* 1996). Über die beteiligten Proteine ist bisher wenig bekannt (MARC 1997), jedoch sind die Mikrotubuli-assoziierten Motorproteine potentielle Kandidaten (WASTENEYS 2002). In diesem Kontext wird eine Verknüpfung der neuen Mikrotubuli ausgehend von bestimmten, γ -Tubulin enthaltenden Komplexen vorgeschlagen, welche entlang der bestehenden Mikrotubuli durch Motorproteine mobil sind. Diese Komplexe könnten auch durch die Mikrotubuli-abbauende Aktivität von Katanin entstehen, entlang des alten Stranges transportiert werden und als Initiationszentren für die Verankerung neuer Mikrotubuli dienen (WASTENEYS 2002).

Es wurde gezeigt, dass für die Entstehung neuer Mikrotubuli in *Nicotiana tabacum* das Vorhandensein bestehender, kortikaler Mikrotubuli und die Bindung an γ -Tubulin erforderlich sind (MURATA *et al.* 2005). Die neuen Mikrotubuli, welche von bereits bestehenden ausgehen und Seitenäste bilden benötigen an den Verzweigungspunkten γ -Tubulin. Man geht davon aus, dass γ -Tubulin entlang kortikaler Mikrotubuli mobil sein muss (MURATA *et al.* 2005, WASTENEYS & YANG 2004, WASTENEYS 2002) und dabei bereits vorhandene Mikrotubuli als eine Art Schiene nutzt (WASTENEYS & YANG 2004). In Verbindung zu diesen bereits bestehenden Mikrotubuli bewirken die mobilen Verankerungszentren die Polymerisation neuer Mikrotubuli und werden ins Cytosol entlassen, wenn der ursprüngliche Mikrotubulus depolymerisiert. Dieses Modell geht konform mit der Behauptung, dass strukturelle Mikrotubuli-assoziierte Proteine und Motorproteine in die Verankerung und Organisation der Mikrotubuli involviert zu sein scheinen (VAUGHN & HARPER 1998).

Hinsichtlich ihrer Komponenten konnten bisher in Pflanzen keine distinkten Mikrotubuli-organisierenden Komplexe identifiziert werden. Die Organisation pflanzlicher Mikrotubuli in funktionsfähigen Anordnungen erfordert einen Mechanismus der Vernetzung. Eine zentrale Rolle der Mikrotubuli-assoziierten Proteine scheint plausibel (GUNAWARDANE *et al.* 2000, VAUGHN & HARPER 1998, WASTENEYS & YANG 2004). Es können sich verschiedene Mechanismen der Mikrotubuli-Verankerung in Pflanzen entwickelt haben, welche abhängig vom Stadium des Zellzyklus und vom Gewebe sind (VAUGHN & HARPER 1998). Dem γ -Tubulin wird aufgrund der Forschungsergebnisse jedoch eine zentrale Rolle zugeschrieben.

1.1.5 Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs)

Zur Organisation der Mikrotubuli während des Zellzyklus sind Kooperationen Microtubuli-assoziiierter Proteine (MAPs) erforderlich. MAPs binden in einer nukleotid-unspezifischen Art am Mikrotubulus (DESAI & MITCHISON 1997). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Tubulinfaltung und der Disposition der kortikalen Mikrotubuli und deren funktioneller Modulation. Zudem sind sie in deren Regulation während der Zellteilung beteiligt (GARDINER & MARC 2003, GEISSLER *et al.* 1998, LLOYD & CHAN 2004). Sie dienen zur Stabilisierung der Mikrotubuli und zur Vermittlung von Wechselwirkungen anderer Zellbausteinen des Cytoskeletts (z.B. Actin) (ALBERTS *et al.* 2004, CHUONG *et al.* 2004). Außerdem bedingen sie die Organisation der Mikrotubuli in den charakteristischen parallelen Gruppen sowie deren Fixierung in dieser Position (ALBERTS *et al.* 2004, LLOYD & CHAN 2004).

Auch die Motorproteine zählen neben diesen strukturellen Proteinen zu den MAPs. Mit Hilfe der akzessorischen Motor-Proteine Myosin, Dynein und Kinesin können mittels ATP Vesikel innerhalb der Zelle transportiert werden. Während Myosin mit Actin interagiert, werden durch Dynein Vesikel entlang des Mikrotubulus zum Minus-Ende und durch Kinesine zum Plus-Ende transportiert (BASKIN 2000, OVECHKINA & OAKLEY 2001). Zudem beschleunigen sie die Keimbildung, und spielen eine zentrale Rolle in der Translation.

Eine Proteinfamilie von der Größe 65 kDa wurde zuerst aus *Nicotiana tabacum*-Zellen isoliert und ihre Mikrotubuli-verknüpfende Wirkung bestätigt. Genprodukte der MAP65-Familie scheinen in die Überlappung der antiparallelen Mikrotubuli der Spindel und des Phragmoplasten involviert zu sein. Zudem konnten sie im Bereich des Präprophasebands und in Verbindung zu kortikalen Mikrotubuli nachgewiesen werden. Sie scheinen von essentieller Bedeutung für die räumliche Strukturierung der Mikrotubuli-Anordnungen zu sein (WASTENEYS 2002). Es ist mittlerweile bekannt, dass das Genom von *Arabidopsis thaliana* 9 MAP65-ähnliche Gene enthält (LLOYD & CHAN 2004). Einen Überblick über die *Arabidopsis thaliana* MAPs und deren Homologe sind bei GARDINER & MARC (2003) nachzulesen.

Ein 200 kDa großes Protein TMBP200/MOR1 (engl. tobacco microtubule bundling protein, ein Homolog zu MOR1) verursacht die Mikrotubuli-Stabilisierung im Kortex. Da eine Mutation des Gens zur Auflösung der Mikrotubuli führt (WHITTINGTON *et al.* 2001), ist es wahrscheinlich für die Organisation kortikaler Mikrotubuli erforderlich. In *Saccharomyces cerevisiae* zeigen jedoch Homologe des Gens eine destabilisierende

Wirkung (LLOYD & CHAN 2004). Das in *Xenopus*-Eiern identifizierte Protein XMAP215 beeinflusst das dynamische Verhalten der Mikrotubuli, indem es die Polymerisation beschleunigt und eine hohe Depolymerisationsrate unterbindet, jedoch nur an den Plus-Enden (DESAI & MITCHISON 1997). Das zu XMAP215 homologe Protein der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* interagiert mit dem γ -Tubulin-Ring-Komplex am Spindelpolkkörper (KNOP & SCHIEBEL 1998). Es ist möglich, dass XMAP215 mit diesen interagiert und die Verankerung der Mikrotubuli am Centrosom stimulieren kann (GUNAWARDANE *et al.* 2000). Ein weiteres funktionell interessantes MAPs ist die Phospholipase D (PLD), welche Mikrotubuli an die Plasmamembran bindet. Ausserdem existiert ein Protein der phragmoplastin-verwandten Unterfamilie DRP1, welches vermutlich der Verankerung von Golgi-Vesikeln an Mikrotubuli dient und diese während der Cytokinese zur entstehenden Zellplatte leitet (HONG *et al.* 2003).

MAPs können aufgrund der sequentiellen Divergenzen besonders am C-Terminus der Tubuline binden (DESAI & MITCHISON 1997, ERICKSON 2000). Die Vielfaltigkeit der pflanzlichen MAPs gibt einen Hinweis darauf, dass die zellulären Mechanismen, welche die Organisation der Mikrotubuli regulieren, sehr komplex sind (GARDINER & MARC 2003). Die Aktivität hinsichtlich der Kontrolle von Verankerung und Stabilisierung der Mikrotubuli weist darauf hin, dass MAPs auch entscheidende Bestandteile der MTOCs sein könnten. Auch die Bindeeigenschaften der MTOC-Komponenten könnten entscheidend beeinflusst werden (OAKLEY 2000, VAUGHN & HARPER 1998).

1.1.6 γ -Tubulin-Ring-Komplexe (γ -TuRCs)

Die centrosomal vermittelte Verknüpfung von tierischen Mikrotubuli basiert auf großen, ringförmigen Multi-Protein-Komplexen, die ausschließlich an die Minus-Enden der Mikrotubuli binden (KEATING & BORISY 2000, MORITZ *et al.* 2000, ZHENG *et al.* 1995) und für die Verknüpfung zwischen Mikrotubulus und Centrosom erforderlich sind (MORITZ *et al.* 2000). Ein zentraler Faktor der Mikrotubuli-Nukleation in centrosomalen ringförmigen Strukturen tierischer Zellen und Pilze ist γ -Tubulin (ECKARDT 2006). Diese sogenannten γ -Tubulin-Ring-Komplexe γ -TuRCs (engl. γ -Tubulin-Ring-Complexes) wurden erstmals aus *Xenopus*-Eiern extrahiert

(ZHENG *et al.* 1995). Sie kommen sowohl im pericentriolären Material als auch im Cytoplasma vor (MORITZ *et al.* 1995, ZHENG *et al.* 1995). Da 80 % der γ -Tubulin-Ring-Komplexe im Cytosol vorliegen, die Mikrotubuli-Verankerung jedoch vom Centrosom ausgeht, ist anzunehmen, dass dort die Aktivierung der γ -Tubulin-Ring-Komplexe erfolgt. Diese kann durch eine Konformationsänderung oder centrosomale, γ -Tubulin-bindende Proteine hervorgerufen werden (KNOP & SCHIEBEL 1998, OAKLEY 2000, RAFF 1996). γ -TuRCs haben einen Durchmesser von 25 nm, was dem Durchmesser von Mikrotubuli entspricht. Sie bestehen aus 10-14 γ -Tubulin-Molekülen (ZHENG *et al.* 1995) sowie mindestens fünf weiteren, in einigen Organismen bereits identifizierten Proteinen (engl.: gamma ring proteins, ‚grips‘)(GUNAWARDANE *et al.* 2000, SCHMIT 2002).

Die γ -Tubulin-Ring-Komplexe werden hinsichtlich der Konfiguration weiterhin diskutiert. Es werden Interaktionen von γ -Tubulin mit den α/β -Tubulin-Heterodimeren postuliert. Aufgrund seiner modifikationshemmenden Wirkung bezüglich β -Tubulin wurde zunächst eine Interaktion zwischen γ - und β -Tubulin vermutet (OAKLEY & OAKLEY 1989). Die Rolle der MTOCs als essentieller Bestandteil an den Minus-Enden der Mikrotubuli lässt auch Überlegungen über eine Interaktion mit α -Tubulin zu (BURNS 1995, TAKEOKA *et al.* 2000). Es etablierten sich zwei unterschiedliche Thesen bezüglich der Struktur der γ -TuRCs und der Nukleation von Mikrotubuli.

Nach dem Protofilamentmodell (ERICKSON & STOFFLER 1996) entfaltet sich ein Ring longitudinal interagierender γ -Tubulin-Moleküle zu einem kurzen Protofilament. Die γ -Tubuline interagieren mit α -, aber aufgrund der hohen Affinität besonders mit β -Tubulin über laterale Kontaktstellen und bilden dementsprechend das erste Protofilament als Ansatzpunkt weiteren Wachstums (ERICKSON 2000). Nach diesem Modell wären γ -TuRCs jedoch nicht in der Lage, die Elongation der Mikrotubuli am Minus-Ende zu unterbinden (GUNAWARDANE *et al.* 2000).

ZHENG *et al.* (1995) propagierten ein Modell, nach dem, entsprechend der Anzahl an Protofilamenten, 13 lateral miteinander interagierende γ -Tubulin-Untereinheiten eine Helix bilden und als ‚template‘ fungieren. Jede Untereinheit stellt somit durch die longitudinale Interaktion der γ -Tubulin-Moleküle mit α -Tubulin-Molekülen die Basis für ein Protofilament dar, von der ausgehend der Mikrotubulus wächst.

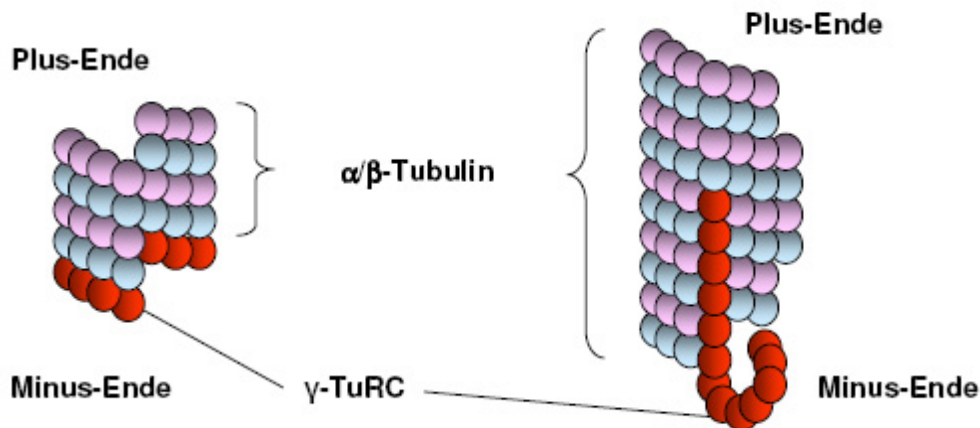


Abb. 6 Modelle für die Funktion des γ -Tubulins beim Zusammenbau von Mikrotubuli:

γ -TuRC dient als Keim für die Mikrotubuliassemblierung entweder in Form eines Ringes aus γ -Tubulinuntereinheiten (links), oder als Protofilament (rechts), an das sich die α/β -Tubulin-dimere direkt binden können (Quelle: LODISH et al. 2001)

Es konnten biochemische Nachweise hervorgebracht werden, welche ein modifiziertes Protofilament-Modell rechtfertigen (LEGUY *et al.* 2000). Dennoch wird die These des Template-Modells von der Majorität für wahrscheinlicher gehalten (KEATING & BORISY 2000, MORITZ *et al.* 2000, MORITZ & AGARD 2001, RAFF 1996, TAKEOKA *et al.* 2000, WIESE & ZHENG 2000, zusammenfassend JOB 2003). Mittels Elektronenmikroskopie konnte die Ringform inzwischen experimentell nachgewiesen werden (MORITZ & AGARD 2001). Ferner sind die Untereinheiten, die den Ring umgeben, paarweise und in V- bzw. U-Form angeordnet (MORITZ *et al.* 2000, MORITZ & AGARD 2001). Vermutlich besteht diese ringumfassende Struktur aus sechs oder sieben γ -TuSCs (GUNAWARDANE *et al.* 2000, MORITZ & AGARD 2001). Eine bei *Drosophila* aus Dgrip 163, 128 und 75 bestehende, globuläre Struktur bildet eine terminale Kappe, die aufgrund ihrer asymmetrischen Struktur in die Interaktion mit dem Centrosom involviert sein könnte (MORITZ *et al.* 2000, MORITZ & AGARD 2001). Dgrip91WD ist eine weitere, mit diesen Proteinen interagierende Komponente des γ -TuRCs in *Drosophila melanogaster* (GUNAWARDANE *et al.* 2003). Auch in *Xenopus* konnten analoge Strukturen nachgewiesen werden (KEATING & BORISY 2000, ZHANG *et al.* 2000). Die Präsenz von Xgrip210 ist Voraussetzung für die Bildung von γ -TuRCs und für die Bindung von

γ -Tubulin und Xgrip109 am Centrosom (ZHANG *et al.* 2000). Der gesamte kappenförmige Komplex umfasst das minus-Ende der Mikrotubuli und unterbindet sowohl weiteres Wachstum als auch Depolymerisation. Er hat somit eine entscheidende Funktion hinsichtlich der Dynamik der minus-Enden von Mikrotubuli und somit auch hinsichtlich deren Organisation innerhalb der Zelle (WIESE & ZHENG 2000).

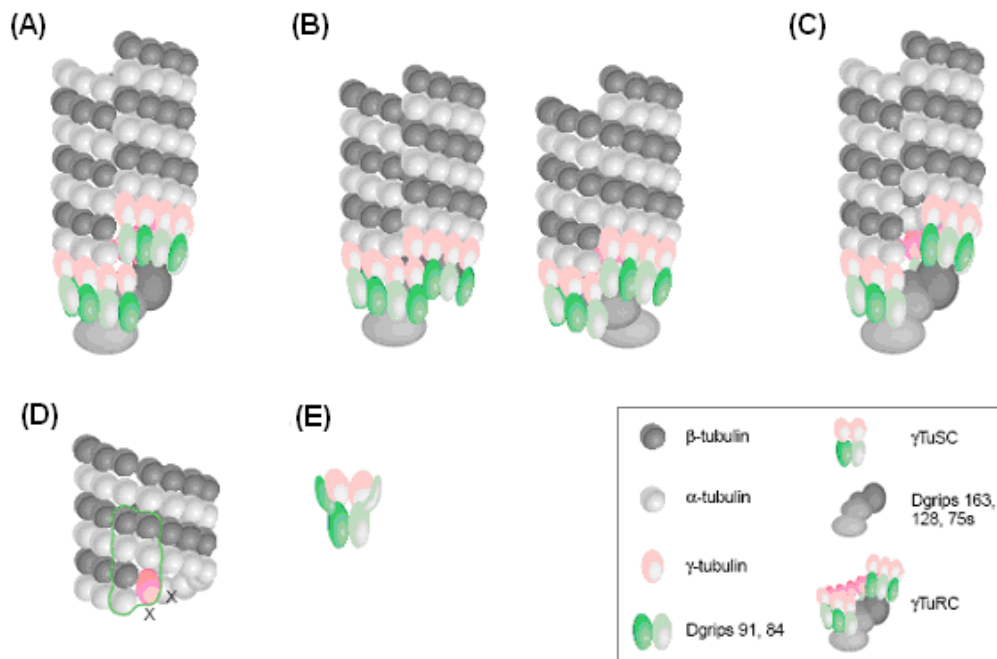


Abb. 7 Aktuell diskutierte Modelle der Mikrotubuli-Verankerung an γ -Tubulin-Ring-Komplexen:

(A-C) Weiterentwicklungen des Template-Modells. (A) Der 14 γ -Tubulin-Moleküle enthaltende γ -Tubulin-Ring-Komplex (γ -TuRC) erzeugt durch überlappende Regionen an beiden Enden der Helix, die sich jeweils über ein halbes γ -Tubulin-Molekül erstrecken, die 13fache Symmetrie als Basis der Protofilamente. (B) ‚split-helix‘-Modell: Hier beläuft sich die überlappende Region auf ein ganzes γ -Tubulin-Molekül. Es wird eine direkte Interaktion zwischen β - und γ -Tubulin möglich. (C) 12 γ -Tubulin-Moleküle innerhalb des γ -Tubulin-Ring-Komplexes, die durch die Dgrip-Untereinheiten so in einer Helix konfiguriert werden, dass 13 Protofilamente verankert werden können. (D) Ein einziges γ -Tubulin-Molekül verankert den Mikrotubulus. Hierbei soll die intensive Interaktion zwischen β - und γ -Tubulin die ersten Tubulindimere (grün umrandet) des Polymers stabilisieren und die folgende Elongation erleichtern. (E) Veranschaulichung wie die Spc97/Spc98-Homologe Dgrip 91/84 die β -Tubulin-Bindestelle von γ -Tubulin abschirmen könnten (verändert nach MORITZ *et al.* 2000).

1.1.7 Tubulin-Small-Complexes (γ -TuSCs)

Die γ -Tubulin-Small-Complexes (γ -TuSC) sind als solide Untereinheiten der γ -Tubulin-Ring-Komplexe identifiziert worden. Sie konnten aufgrund ihres gegenüber hohen, Salzkonzentrationen resistenten Komplex aus den Ringkomplexen herausgelöst werden (KNOP & SCHIEBEL 1997, JOB 2003). Die Tub4p-Komplexe in *Saccharomyces cerevisiae* sind Homologe der γ -TuSCs (BYERS *et al.* 1978, O'TOOLE *et al.* 1999). Deren Spindelpol-Komponenten (Spc: spine pole component) Spc97p und Spc98p legen die Konformation der Spindelpole fest und sind entscheidend an der korrekten Duplikation der Spindelpolkörper und der Formation der Mitosespindel beteiligt. Ihnen wird eine stabilisierende Funktion hinsichtlich der beiden longitudinal interagierenden γ -Tubulin-Moleküle zugeschrieben (INCLÁN & NOGALES 2001).

Die Tetramere der γ -TuSCs bestehen aus zwei γ -Tubulin-Molekülen und jeweils einem Molekül der Homologe von Spc98p und Spc97p (GEISLER *et al.* 1996, KNOP & SCHIEBEL 1997). Sie bewirken durch ihre Interaktion mit Spc110p und Spc72 die Bindung der γ -Tubulin-Komplexe an den Spindelpolkörper (KNOP & SCHIEBEL 1997, KNOP & SCHIEBEL 1998). Ausserdem unterbinden sie eine direkte Interaktion zwischen γ - und β -Tubulin (MORITZ & AGARD 2001). Die Interaktion zwischen den Spindelpolkomponenten und γ -Tubulin wird auf Bereiche innerhalb der γ -Tubulin-Moleküle zurückgeführt, welche große Nukleotiddifferenzen gegenüber α - und β -Tubulin aufweisen (INCLÁN & NOGALES 2001). Homologe Proteine zu den Spindelpolkomponenten konnten in den evolutionär unterschiedlichsten Organismen nachgewiesen werden (Tab.1). In *Schizosaccharomyces pombe* sind Alp4 und Alp6 erforderlich für die Regulation von Interphasespindeln und bipolaren Mitosespindeln (VARDY & TODA 2000). Die *Drosophila*-gamma-Ringproteine Dgrip84 und Dgrip91 bilden zusammen mit γ -Tubulin die γ -TuSCs (OEGEMA *et al.* 1999). Homologe in *Xenopus* sind Xgrip109 und Xgrip110 (ZHANG *et al.* 2000). Das Protein GCP-WD, welches ursprünglich auch NEDD1 genannt wurde ist das humane Homolog zu Spc98p und zu dem *Drosophila* Dgrip71WD Protein und Bestandteil des menschlichen γ -TuRC (LÜDERS *et al.* 2006). Durch die Hemmung dieses Proteins kommt es zur Abspaltung des γ -TuRC vom Centrosom. Außerdem kommt es zum Ausbleiben von Mikrotubuli-Verbindungen trotz intakter Funktionsfähigkeit des γ -TuRC. Zusätzlich konnte Dynamin 2 als Bestandteil des Centrosoms nachgewiesen werden, der nicht nur dessen Kohäsion bedingt, sondern zudem sowohl mit γ -Tubulin als auch mit α -Tubulin

interagiert (THOMPSON *et al.* 2004). Zudem scheinen Proteine von 48-211 kDa beim Menschen und von 75-163 kDa in *Drosophila* eine schützende Kappe am Minus-Ende der Mikrotubuli zu bilden (MORITZ & AGARD 2001). γ -Tubulin-Komplexe sind in Pilzen und tierischen Zellen gut charakterisierte Bestandteile von Spindelpolkörper oder Centrosomen (GEISSLER *et al.* 1998).

Organismus	Homologe Proteine in γ -Tubulin-Small-Complexes		Homologe Proteine der Kappenstruktur	Weitere interagierende Proteine
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Spc97	Spc98	-	Spc72 Spc110
	Referenzen : Geissler et a. 1996, Knop & Schiebel 1997, Knop & Schiebel 1998			
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Alp4	Alp6		
	Referenz: Vardy & Toda 2000			
<i>Drosophila melanogaster</i>	Dgrip84	Dgrip91	Dgrip 163 Dgrip 128 Dgrip 75	Dgrip71 WD
	Referenzen : Oegema <i>et al.</i> 1999, Gunawardane <i>et al.</i> 2003, Schmit 2002			
<i>Xenopus laevis</i>	Xgrip110	Xgrip109	Xgrip 210	XMAP215?
	Referenz: Zhang <i>et al.</i> 2000			
<i>Homo sapiens</i>	hGCP2	GCP-WD HsSpc98/hGCP3		
	Referenzen : Lüders 2006, Schmit 2002			
Pflanzen	In <i>Arabidopsis thaliana</i> vorhanden	Nachgewiesen in <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Oryza</i> , und <i>Nicotiana</i>		
	Referenz: Erhardt <i>et al.</i> 2002			

Tab. 1 Identifizierte Homologe der Spindelpolkomponenten Spc97p und Spc98p verschiedener Organismens.

1.1.8 Lokalisation von γ -Tubulin

γ -Tubulin wurde als Produkt des *mipA*-Gens in Spindelpolkörpern von *Aspergillus nidulans* entdeckt (OAKLEY & OAKLEY 1989). Die zentrale Funktion von γ -Tubulin hinsichtlich der Organisation von Mikrotubuli konnte seit dem schrittweise durch Mikroinjektion von Antikörpern (JOSHI *et al.* 1992), genetische Studien (OAKLEY *et al.* 1990, HORIO *et al.* 1991) und biochemische Experimente (LI & JOSHI 1995, ZHENG *et al.* 1995) aufgeklärt werden. Diese Experimente erwiesen die signifikante Lokalisation an Mikrotubuli-Minus-Enden und somit in der Nähe von vermuteten MTOCs wie dem Zellkern, dem Centrosom, den Centriolen, den Spindelpolen und den Spindelpolkörpern (HORIO *et al.* 1991, MARC 1997, VAUGHN & HARPER 1998). In Regionen mit hohen Konzentrationen an Mikrotubuli-Plus-Enden wie Kinetochoren und dem Phragmoplasten fehlt γ -Tubulin oder kommt nur in schwachen Konzentrationen vor (LIU *et al.* 1993). Ausserdem zeigte sich, dass γ -Tubulin in Zellen, denen Centriolen fehlen, stärker über die Pole zerstreut vorkommt, jedoch trotzdem funktionell intakte Spindeln verankert (JOSHI & PALEVITZ 1996). Es konnte auch in Verbindung mit isolierten Zellkernen nachgewiesen werden (SCHMIT 2002). Diese Lage spricht für eine zentrale Rolle in der Verknüpfung von Mikrotubuli (JOSHI *et al.* 1992), vor allem bezüglich der Mitosespindel (JOSHI & PALEVITZ 1996, LIU 1993, JOB 2003). Durch einen Bruch im γ -Tubulin-Gen von *Aspergillus nidulans* wird die Formation der Mikrotubuli unterbunden und ist letal (OAKLEY 2000). Die Fähigkeit von γ -Tubulin, Mikrotubuli an den Minus-Enden zu verknüpfen, und seine essentielle Bedeutung in dieser Funktion sind inzwischen allgemein anerkannt (Überblick von JOB *et al.* 2003, MARC 1997 und SCHMIT 2002). *In vitro* konnte diese Eigenschaft mittlerweile experimentell bestätigt werden. In Proteinkomplexen aus *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* und *Vicia faba* wurde pflanzliches γ -Tubulin nachgewiesen (STOPPIN-MELLETT *et al.* 2000, DRYKOVÁ *et al.* 2003). Komplexe welche γ -Tubulin enthalten zeigen eine Kompetenz zur Verankerung von Mikrotubuli in *Arabidopsis* (DRYKOVÁ *et al.* 2003). Zudem kann pflanzliches γ -Tubulin in *Schizosaccharomyces pombe* unter Fehlen von endogenem an MTOCs binden und Mikrotubuli verankern (HORIO & OAKLEY 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass menschliches γ -Tubulin in *Schizosaccharomyces pombe* mit α -Tubulin interagiert (TAKEOKA *et al.* 2000). Die Verankerung konnte *in vitro* durch ein einziges menschliches γ -Tubulin-Monomer hervorgerufen werden (LEGUY *et al.* 2000). Es gibt jedoch weiterhin nur wenige

Beweise für eine solche Funktion *in vivo*. Analog zu den γ -TuRCs wurde γ -Tubulin über die Mikrotubuli verteilt nachgewiesen (DRYKOVÁ *et al.* 2003). Über ihre gesamte Länge bindet γ -Tubulin in einer punktförmigen Struktur und ist nicht ausschließlich auf das Minus-Ende begrenzt (LIU *et al.* 1993, JOSHI & PALEVITZ 1996, DRYKOVÁ *et al.* 2003). Dies müsste auf ein Protein zutreffen, dem ausschließlich verankernde Funktion zugesprochen wird. Zwar konnte γ -Tubulin in Verbindung zu dem pflanzlichen Spc98p-Homolog nachgewiesen werden (ERHARDT 2002), da es aber entlang der Mikrotubuli ohne Spc98p vorkommt, könnte es auch eine von der Mikrotubuli-Verankerung unabhängige Funktion haben, welche deren Eigenschaften bedingt (ERHARDT 2002). Erst vor kurzem konnte belegt werden, dass γ -Tubulin eine zentrale Rolle in der acentrosomalen Verknüpfung von Mikrotubuli spielt (MURATA, PASTUGLIA und BINAROVÁ, 2005). Es wurde gezeigt, dass ein mobiles γ -Tubulin entlang der Mikrotubuli für die Entstehung kortikaler Mikrotubuli essentiell ist (MURATA *et al.* (2005). Auch BINAROVÁ *et al.* (2006) propagieren, dass γ -Tubulin für die *in vivo*-Verknüpfung von pflanzlicher Mikrotubuli außerhalb von Centrosomen von wesentlicher Bedeutung ist, indem es Bestandteil kortikaler Templates ist, welche das Netzwerk der Mikrotubuli dirigieren. Seine Funktion außerhalb von Centrosomen ist bislang jedoch wenig erforscht (BINAROVÁ *et al.* 2006). γ -Tubulin ist in *Arabidopsis thaliana* neben der Bildung einer funktionell intakten Spindel und eines Phragmoplasten auch für die Organisation kortikaler Interphase-Mikrotubuli erforderlich (PASTUGLIA 2006).

In Pflanzen kommen zwei γ -Tubulin-Komplexe der Größe 750 kDa und 1500 kDa vor (STOPPIN-MELLET *et al.* 2000). Diese zeigen zudem unterschiedliche Eigenschaften. Lösliches γ -Tubulin interagiert mit α/β -Tubulindimeren und cosedimentiert mit Mikrotubuli (DRYKOVÁ *et al.* 2003). Größere γ -Tubulin-Komplexe, die in die Verankerung von Mikrotubuli involviert sind, scheinen in Verbindung zu Membranen zu stehen. Solche Ergebnisse könnten Aufschluss über eine acentrosomale Verankerung von Mikrotubuli geben.

Es wäre möglich, dass die verschiedenen γ -Tubulin-Proteine unterschiedliche Funktionen ausüben. Allerdings zeigen sie in ihrer Aminosäure-Sequenz eine sehr hohe Übereinstimmungen, so dass funktionelle Unterschiede fragwürdig sind. Die unterschiedlichen Expressionsmuster der verschiedenen γ -Tubulin-Proteine in unterschiedlichen Geweben sind jedoch denkbar (OAKLEY 2000, OVECHKINA & OAKLEY 2001). Die These verschiedener γ -Tubulin-Funktionen wird allerdings durch

Ergebnisse diverser Arbeitsgruppen gestützt (STOPPIN-MELLET *et al.* 2000., DRYKOVÁ *et al.* 2003). Allein das beträchtlich hohe Vorkommen von γ -Tubulin in verschiedensten Kompartimenten pflanzlicher Zellen erlaubt Spekulationen über vielfache und unterschiedliche Funktionen, z.B. während der Anaphase, Elongation der Spindel, Spindelorganisation oder Dynamik der Mikrotubuli (Zusammenfassend von JOB *et al.* 2003).

Dass Vorliegen zweier Konformationen des γ -Tubulin erscheint sicher. Neben einer aktiven Form, welche die Verankerung von Mikrotubuli initiiert, sollte es auch in einer löslichen oder zumindest transportablen bzw. einer Speicherform existieren (BURNS 1995, OAKLEY 2000). Pflanzliches γ -Tubulin ist demnach stärker innerhalb der Zelle verteilt als seine Homologe in Zellen von Pilzen oder Tieren (JOSHI & PALEVITZ 1996). Die zerstreute Lokalisation von γ -Tubulin geht konform mit den variablen, über die Zelle verteilten Ansatzpunkten der funktionell verschiedenen Mikrotubuli-Anordnungen während des Zellzyklus (JOSHI & PALEVITZ 1996). Die für die Zellfunktionen essentielle Polarität der Mikrotubuli scheint durch γ -Tubulin bedingt zu werden, auch wenn weitere Proteine darin involviert zu sein scheinen (LEGUY *et al.* 2000).

1.1.9 γ -Tubulin bei Pflanzen

Mit Hilfe eines gegen einen konservierten Sequenzbereich gerichteten Antikörper (LIU *et al.* 1993) erfolgte der Nachweis des Vorkommens von γ -Tubulin-Homologen in Pflanzen. Das erste pflanzliche γ -Tubulin-Gen konnte im selben Jahr aus dem Farn *Anemia phyllitides* isoliert und sequenziert werden (FUCHS *et al.* 1993). Nachfolgend wurde γ -Tubulin auch aus *Arabidopsis thaliana* (LIU *et al.* 1995), dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (Gen-Bank accession no AF142098), sowie aus *Zea mais* (LOPEZ *et al.* 1995) und *Oryza spec.* (KIM *et al.* 1999) isoliert und sequenziert. Zuletzt wurden von der eigenen Arbeitsgruppe die γ -Tubulin-Sequenzen aus *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* identifiziert (SCHRÖDER *et al.* 2002). Zudem wurden γ -Tubulin-Teilsequenzen von der Grünalge *Chlorella spec.* und dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* ermittelt (eigene Diplomarbeit, 2002). Die Tatsache, dass γ -Tubulin auch im Pflanzenreich weit verbreitet ist, jedoch bei den grünen Landpflanzen

nicht in definierten MTOCs, lässt eine weitestgehend unbeantwortete Frage offen: wie wird hier die Assemblierung der Mikrotubuli bewerkstelligt?

1.1.10 γ -Tubulin-Sequenzen und funktionelle Domänen

Die bisher beschriebenen γ -Tubuline grüner Landpflanzen weisen untereinander eine Sequenzhomologie von 90 % auf. Als grüne Landpflanzen werden im folgenden alle Archegoniaten, Gymnospermen und Angiospermen betrachtet (SITTE et al. 1998). Im Vergleich dazu beträgt die Homologie zu den γ -Tubulinen der Pilze, Metazoen und den einzelligen Algen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella spec.* nur 60 – 70 % (MARC 1997, eigene Diplomarbeit 2002). Durch Untersuchungen der bekannten γ -Tubulin-Sequenzen untereinander und den Homologien zwischen α -, β - und γ -Tubulin konnte folgendes festgestellt werden: Der N-terminale Bereich der γ -Tubulin-Sequenz zeigt mit etwa 40 % eine deutlich höhere Homologie zu α - und β -Tubulin als der C-terminale Bereich mit ca. 23 %. Man vermutet, dass diese beiden Bereiche funktionelle Domänen des γ -Tubulins sind. Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass die C-terminale Domäne mit centrosomalen Proteinen interagiert, während der N-terminale Bereich an die $\alpha\beta$ -Heterodimere bindet (BURNS 1995).

Das γ -Tubulin beinhaltet zwei auffallend divergente Peptid-Bereiche, welche als γ -Peptid A und γ -Peptid B bezeichnet werden (BURNS 1995). Sie liegen im C-terminalen Bereich und besitzen eine variable Anzahl von Insertionen und Deletionen, während die flankierenden Bereiche sehr starke Homologien aufweisen. Der γ -Peptid A und γ -Peptid B-Bereich liegt im gefalteten Protein an der Aussenseite exponiert, und kann deshalb wahrscheinlich in Interaktion mit assoziierenden Proteinen treten (BURNS 1995, INCLAN und NAGALES 2001). Die Proteinstruktur des menschlichen γ -Tubulin ist mittlerweile mittels Kristallstrukturanalyse ermittelt worden (ALDUZ et al. 2006), und ist in der Datenbank von Swissprot (<http://www.expasy.org/spdbv>) im Internet verfügbar.

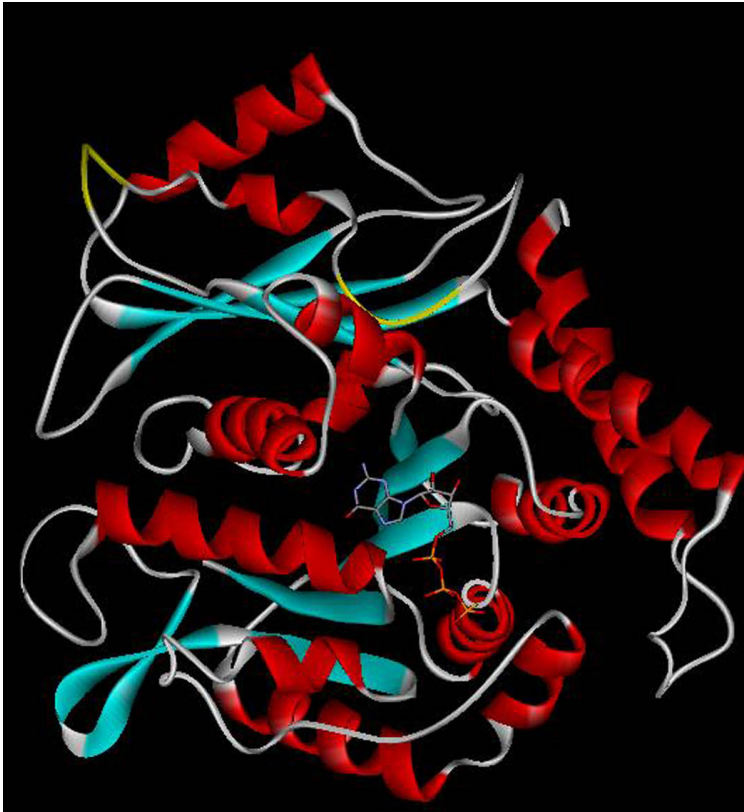


Abb. 8 Kristallstruktur des menschlichen γ -Tubulin

Die nach außen exponierten A- und B-Peptidbereiche des γ -Tubulin sind gelb unterlegt

Vergleiche der A- und B-Peptidbereiche der bekannten γ -Tubulin-Sequenzen zeigen, dass diese bei den grünen Landpflanzen stark konserviert vorliegen (Abb.9). Sie unterscheiden sich deutlich von denen des Tier- und Pilzreichs sowie von den einzelligen Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella spec.* (BURNS 1995, SCHRÖDER et al. 2002). Während der Evolution der Pflanzen kommt es zum definitiven Verlust der Centrosomen in allen Stadien des Zellteilungszyklus, zeitlich einhergehend mit dem Verlust der Begeißelung und somit der Zellmobilität (CANADAY et al. 2000). Es wurde postuliert, dass dieser Verlust in sehr enger Beziehung mit dem A- und B-Peptidmotiv steht (SCHRÖDER et al. 2002). Möglicherweise könnten diese Motive dem γ -Tubulin erlauben, in Abwesenheit von Centrosomen seine speziellen Funktionen auszuüben. In der eigenen Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe konnte dies durch Identifizierung von γ -Tubulin-Teilsequenzen der einzelligen coccalen Alge *Chlorella spec.* und dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* nicht aufgeklärt werden. Die Tatsache, dass *Chlorella spec.* mit ihrer coccalen, unbegeißelten Organisationsform im γ -Peptid A- und B-Bereich ähnliche Divergenzen

zu den grünen Landpflanzen aufweist wie die begeißelte Alge *Chlamydomonas reinhardtii*, lässt darauf schließen, dass eine Begeißelung nicht zwingend mit der Konservierung der Sequenzbereiche in Korrelation steht. Erhärtet wird diese Annahme dadurch, dass der konservierte Bereich im γ -A und B-Peptid der grünen Landpflanzen bereits bei den Archegoniaten *Marchantia polymorpha*, *Physcomitrella patens* und *Anemia phyllitides* auftritt, welche während der Spermatogenese noch *de novo* Centriolen und Geißeln ausbilden. Die Divergenzen innerhalb der Protisten läßt vermuten, dass während der Evolution des γ -Tubulins bis zur Manifestierung der konservierten Sequenz Schwankungen auftreten, die sich aber nicht auf die Ausbildung von Centriolen und/oder Geißeln auswirken.

Aus phylogenetischen Untersuchungen der wenigen vorhandenen γ -Tubulin-Sequenzen sind bislang klare Gruppen hervorgegangen. Die einzelligen Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella spec.* sind deutlich von den höheren grünen Landpflanzen getrennt. Weitere Gruppen bilden die Archegoniaten und die nochmals in monokotyle (Gräser) und dikotyle unterteilten Angiospermen (SCHRÖDER et al. 2002).

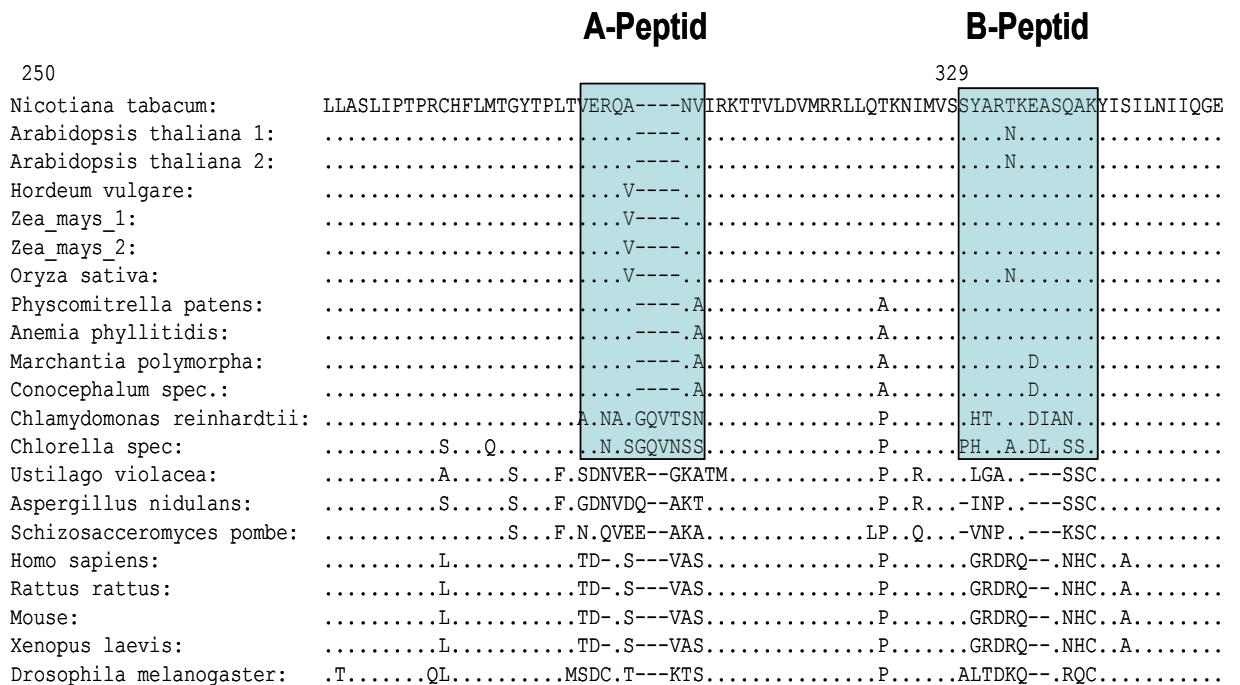


Abb. 9 Übersicht des γ -Tubulin A- und B-Peptidbereiches verschiedener Spezies

1.2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Bisher sind erst eine geringe Anzahl pflanzlicher γ -Tubuline charakterisiert worden. Besonders im Bereich zwischen den einzelligen Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella spec.* besteht gegenüber den grünen Landpflanzen, beginnend mit dem Lebermoos *Marchantia polymorpha*, weiterhin eine große phylogenetische Lücke. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht, in diesem Bereich weitere Sequenzen zu ermitteln und das Motiv des γ -Peptids A und B in Hinblick auf verschiedene Organisationsformen zu vergleichen. Hierzu standen die folgenden Grünalgen *Coleochaete scutata*, *Closterium ehrenbergii*, *Scenedesmus fusca*, *Gonium pectorale*, *Volvox globator*, *Volvox tertius*, *Ulothrix spec.*, *Cephaleuron spec.*, *Spirogyra spec.*, *Chlorokybus atmophyticus*, *Mesostigma viride*, *Pleodorina illinoisiensis*, *Volvox carteri*, *Volvox gigas* sowie *Chara spec.* als Versuchsobjekte zur Verfügung.

In dem interessanten phylogenetischen Bereich bis hin zu den grünen Landpflanzen gibt es neben Spezies, die während ihrer gesamten Entwicklung begeißelt sind und Centriolen besitzen (Bsp. *Chlamydomonas reinhardtii*), auch solche, die beide Charakteristika nicht mehr aufweisen (Bsp. Angiospermen). Einige Organismen wiederum besitzen noch in allen Stadien Centriolen, bilden jedoch zu keinem Entwicklungszeitpunkt Geißeln aus (Bsp. *Chlorella spec.*). In manchen Arten, die auf eine Begeißelung nur noch bei der Fortpflanzung zurückgreifen, werden die sonst nicht zu beobachtenden Centriolen während der Spermatogenese *de novo* ausgebildet (Bsp. *Marchantia polymorpha*, *Anthoceros egestris*).

Neben der grundlegenden Sequenzinformation ist vor allem von Interesse, ob das A- und B-Peptid-Motiv phylogenetische Abstände reflektiert und/oder spezielle Funktionen des γ -Tubulins übernimmt, welche durch einen Verlust der Centriolen und/oder der Begeißelung einher gehen können. Des Weiterem stellen Sequenzinformationen eine Grundlage für Studien dar, durch die weitere Einblicke in die Funktion der γ -Tubuline ermöglicht werden, z.B. mittels Anti- γ -Tubulin-Antikörper.

Zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen könnte die Methode des Yeast Two-Hybrid System (Y2H) einen wesentlichen Beitrag zum besseren Verständnis der Mikrotubulinukleation in höheren Pflanzen leisten. Die Möglichkeit mittels dieses Systems potentielle oder bekannte Interaktionspartner von pflanzlichem γ -Tubulin aufzufinden, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Für den Versuch Interaktionspartner des γ -A und γ -B-Peptides innerhalb einer c-DNA-Bibliothek zu

detektieren sollten verschiedene γ -Tubulin-Sequenzen um den A/B-Bereich pflanzlichen γ -Tubulins mittels PCR hergestellt werden, anschließend in einen Bindedomänenvektor ligiert und zunächst die Integration durch eine Sequenzierung überprüft werden. Das konstruierte Köderplasmid sollte auf eine Eigenaktivierung des unter der Kontrolle des GAL4 Transkriptionsfaktors stehenden Reportergen hin getestet werden. Zur Generierung der Aktivierungsdomänenvektoren sollte ein von Clontech erstelltes System verwendet werden. Als Versuchsobjekt zur Konstruktion der Köder- und Beutesequenzen für das System war eine Bright-Yellow-2-Zellsuspensionskultur (BY2) vorgesehen. Die BY2-Zelllinie entstammt einem Kallusgewebe eines *Nicotiana tabacum*-Sämlings.

Im Rahmen des Y2H-Screenings dieser Arbeit wurde neben der Strategie einer sequentiellen Co-Transformation auch das Mating zweier haploider Hefestämme unterschiedlichen Mating-Typs verfolgt.

2. Material und Methode

2.1 Sterilisation von Labormaterialien

Nach Möglichkeit wurden alle für die Versuche relevanten Materialien sterilisiert. Dies geschah bei hitzeunempfindlichen Glaspipetten und Corex-Zentrifugenröhrchen durch eine 3-stündige Inkubation bei 180 °C in einem Wärmeschrank (Trockenschrank Typ U50, Memmert Elektronik, Schwalbach). Die Gerätschaften aus hitzestabilen Kunststoffen (z.B. Polycarbonat, Teflon) konnten bei 2 bar und 121°C für ca. 15 min. autoklaviert werden (LSL Sectroid BST 300, Aclens, Schweiz; Varioklav Dampfsterilisationen, Neuried).

Puffer und Medien wurden, wenn möglich, ebenfalls autoklaviert. War dies unmöglich, musste eine Sterilfiltration durchgeführt werden (Millipore-Filtrationseinheit, Filtertyp 0,22 µm GV, Bedford, USA), um Kontaminationen in den Versuchsansätzen zu vermeiden.

Um diese auch während der Versuche zu verhindern, fanden die meisten Schritte in einer 'Laminar-Air-Flow'-Bank (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen) statt. Diese wurde mindestens 15 min. vor ihrer Nutzung eingeschaltet und direkt vor den Arbeiten mit Ethanol (abs.) ausgewischt.

Zu einem zusätzlichen Schutz vor Kontaminationen wurden Latexhandschuhe getragen.

2.2 Pflanzenmaterial

Alle Organismen der vorliegenden Arbeit lagen in Reinkultur vor. Die Grünalgen *Coleochaete scutata*, *Closterium ehrenbergii*, *Scenedesmus fusca*, *Gonium pectorale*, *Volvox globator*, *Volvox tertius*, *Ulothrix spec.*, *Cephaleuron spec.*, *Spirogyra spec.*, *Chlorokybus atmophyticus*, *Mesostigma viride*, wurden von der Algensammlung SAG (Universität Göttingen) bezogen. Die Grünalgen *Pleodorina illinoisiensis*, *Volvox carteri*, *Volvox gigas*, wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Patrick Barbinger (Universität Regensburg) überlassen. Die Alge *Chara spec.* wurde im

botanischen Garten geerntet, unter einem Binokular gereinigt und für spätere Extraktionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ausgangsmaterial zur Konstruktion der Köder- und Beutesequenzen für das Y2H-System war eine Bright-Yellow-2-Zellsuspensionskultur (BY2). Die BY2-Zelllinie entstammt einem Kallusgewebe eines *Nicotiana tabacum*-Sämlings aus dem Tobacco Science Research Laboratory, Japan Tobacco Inc. (KATO et al. 1972). Diese Zellen zeichnen sich durch eine enorme Teilungsaktivität und eine starke Homogenität aus (NAGATA et al. 1992).

2.2.1 Anzucht des Pflanzenmaterials

Die Anzucht der Algen *Coleochaete scutata*, *Closterium ehrenbergii*, *Scenedesmus fusca*, *Gonium pectorale*, *Ulothrix spec.*, *Cephaleuron spec.*, *Mesostigma viride*, erfolgte auf einem Schüttler (100 rpm) im Klimakonstantraum bei 18°C +/-1°C bei einer Bestrahlungsdauer von 12 h mit einer Bestrahlungsstärke von ca. 18 Wm⁻² (Osram L36W/25 Universal-White) in 500 ml bzw. 250 ml Erlenmeyerkolben im jeweils benötigten Nährmedium. Die Algen *Pleodorina californica*, *Volvox globator*, *Volvox tertius*, *Volvox carteri*, *Volvox gigas*, *Spirogyra spec.*, wurden unter den gleichen Bedingungen, allerdings ruhend, angezogen. Die epiphytisch wachsende Alge *Chlorokybus atmophyticus* wurde auf einem entsprechenden Agarnährboden (1,5%ig) angezogen.

Die Erhaltungskulturen der BY2-Zellen von *Nicotiana tabacum* wurden auf einem gemäß NAGATA et al. (1992) modifizierten, auxinhaltigen Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) in einem Klimakonstantraum bei 23 °C und 100 rpm auf einem Rotationsschüttler (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) im Dunkeln herangezogen. Zu Versuchskulturen wurde 1 ml Zellsuspension in 25 ml modifiziertes LS-Medium, dem zusätzlich 2,4-D zugesetzt war, überimpft.

2.2.2 Medien zur Anzucht des Pflanzenmaterials

Das für die Anzucht der Algen benötigte Basal-Medium, Desmidiacean-Medium sowie das Volvox-Medium wurden freundlicherweise von Renate Müller (TA, Allgemeine Botanik, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht der BY2-Zellen erfolgte in LS-Medium.

Basal-Medium:

Stammlösung (g/100 ml)	Eingesetzte Menge der Substanz (ml)	
	1	20 KNO ₃
0,1	20	K ₂ HPO ₄
0,1	20	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	30	Erde-Extrakt
	5	Mikroelement-Lösung

Herstellung der Erde-Extrakt-Lösung:

Zu etwa 2 Liter Erde wurde ddH₂O bis zu einem 5 cm-Überstand zugegeben und 2x in einem Schnellkochtopf erhitzt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, zum Entfernen der letzten Erdpartikel zentrifugiert und autoklaviert.

Mikroelement-Lösung:

Stammlösung (g/100 ml)	Eingesetzte Menge (ml)	
0,1	1	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
0,1	2	MnSO ₄ x 4 H ₂ O
0,2	5	H ₃ BO ₄
0,02	5	CO(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O
0,02	5	N ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
0,0005	1	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
	981	ddH ₂ O
	0,7 g	FeSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,8 g	Na-EDTA

Das FeSO₄ und Na₂-EDTA wurde zunächst getrennt gelöst und autoklaviert und erst nach dem Abkühlen mit der übrigen Lösung vereinigt.

Desmidiacean-Medium:

Stammlösung (g/100 ml)	Eingesetzte Menge (ml)	
1	10	KNO ₃
0,2	5	(NH ₄) ₂ HPO ₄
0,1	10	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	10	CaSO ₄ (gesättigte Lösung)
	5	Mikroelement-Lösung (siehe Basalmedium)
	875	ddH ₂ O

Nach dem Autoklavieren erfolgte eine Zugabe von 5×10^{-6} g Vitamin B₁₂.

Volvox-Medium:

Stammlösung (g/100 ml)	Eingesetzte Menge (ml)	
1	20	Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O
5	10	KCl
4	10	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	6	Mikroelement-Lösung
	60 mg	Na ₂ -Glycerophosphat
	500 mg	Glycylglycin
	964 ml	ddH ₂ O
	→ pH 7 – 8 (mit 1N NaOH)	

Nach dem Autoklavieren erfolgte eine Zugabe von 5×10^{-6} g Vitamin B₁₂.

Mikroelement-Lösung:

97 mg	FeCl ₃ x 6 H ₂ O
41 mg	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
5 mg	ZnCl ₂ x 6 H ₂ O
2 mg	CoCl ₂ x 6 H ₂ O
4 mg	N ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
in 1000 ml	sddH ₂ O lösen

<u>LS-Medium:</u>	100 ml	Lösung I
	10 ml	Lösung II
	1 ml	Lösung III
	10 ml	Lösung IV
	100 mg	myo-Inositol
	30 mg	Saccharose
	500 µl	2,4-D
	x ml	ddH ₂ O (ad 1000 ml)
		→ pH 6.0

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

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

<u>Lösung III (100 x):</u>	Thiamin HCl	100 mg/100ml
-----------------------------------	-------------	--------------

<u>Lösung IV (100 x):</u>	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,78 g/l
	Na-EDTA x 2 H ₂ O	3,37 g/l

2.2.3 Überimpfplan des Pflanzenmaterials

Die Überimpfungen der Organismen fanden stets unter einer Sterilbank statt (Laminar-Air-Flow, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbuhl-Genkingen). Nachfolgend ist eine Übersicht der Algen, der jeweiligen Anzuchtsmedien und der Überimpfzyklus dargestellt.

Organismus	Medium	Überimpfung
<i>Coleochaete scutata</i>	Basalmedium	Alle 3-4 Monate
<i>Closterium ehrenbergii</i>	Basalmedium	Jeden Monat
<i>Scenedesmus fusca</i>	Basalmedium	Alle 2 Wochen
<i>Gonium pectorale</i>	Basalmedium	Jeden Monat
<i>Ulothrix spec.</i>	Desmidiaceanmedium	Jeden Monat
<i>Mesostigma viride</i>	Desmidiaceanmedium	Alle 2 Monate
<i>Klebsormidium spec.</i>	Desmidiaceanmedium	Jeden Monat
<i>Cephaleuron spec.</i>	Desmidiaceanmedium	Jeden Monat
<i>Pleodorina californica</i>	Basalmedium	Jeden Monat
<i>Volvox globator</i>	Volvoxmedium	Alle 2 Wochen
<i>Volvox tertius</i>	Volvoxmedium	Alle 2 Wochen
<i>Volvox carteri</i>	Volvoxmedium	Alle 2 Wochen
<i>Volvox gigas</i>	Volvoxmedium	Alle 2 Wochen
<i>Spirogyra spec.</i>	Desmidiaceanmedium	Jeden Monat
<i>Chlorokybus atmophyticus</i>	Basalmedium (Agar)	Jeden Monat
BY2 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	LS-Medium	Alle 3 Tage

Tab.2 Übersicht der verwendeten Organismen, der Anzuchtsmedien sowie des Überimpfzykluses

2.3 Bakterienstamm

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Wirtsstamm XL 1-Blue MRF' (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Er wurde für Klonierungsversuche mit diversen Vektorensystemen verwendet.

XL 1-Blue MRF': Genotyp: $\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsd-MR-mrr})173$, endA1, supE44thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[(F' pro AB lacII^qZ Δ M15 Tn 10 tetr)]

2.3.1 Anzucht

Sämtliche Arbeiten mit Bakterien wurden unter einer Sterilbank (Laminar-Air-Flow, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbuhl-Genkingen) ausgeführt.

2.3.1.1 Plattenkulturen

Eine Plattenkultur eignet sich dazu, vereinzelte Bakterienkolonien zu erhalten. Dafür wurde von einer bei -75 °C aufbewahrten Dauerkultur mit einer Impföse eine geringe Menge entnommen und auf Agar-Platten ausgestrichen. Da, wie sich herausstellte, mehrmalige Tau/Gefrier-Zyklen die Vitalität der Bakterien beeinträchtigen, wurde die jeweils verwendete Dauerkultur verworfen und beim nächsten Ansatz frische verwendet.

Um einen gleichmäßigen Bewuchs, etwa für Transformationsansätze, zu erreichen wurden die Bakterien mit einem Drigalski-Spatel auf der Platte verteilt. Anschließend wurden die beimpften Kulturplatten durch Nescofilm (Nippon Kaisha Ltd., Osaka, Japan) vor Austrocknung geschützt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (B290, Heraeus, Hanau) inkubiert.

Bewachsene Platten konnten bei 4 °C für ca. 2 Wochen im Kühlschrank für weitere Versuche aufgehoben werden.

2.3.1.2 Flüssigkulturen

Für eine Flüssigkultur wurde eine einzelne Kolonie mit einer sterilen Impföse der bewachsenen Agarplatte entnommen und in 10 – 100 ml (je nach Versuchsansatz) des jeweils entsprechenden Anzuchtmedium gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht (ÜN) (ca. 16 h). Beim Herstellen kompetenter Bakterien dauerte die Inkubationszeit bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600} etwa 0,5) in einem Schüttelwasserbad (1086, GFL, Burgwedel) bei 37 °C (150 Zyklen/min.).

2.3.1.3 Dauerkulturen

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 1 Vol. einer über Nacht-Flüssigkultur mit 1 Vol. autoklaviertem Glycerin (65%) vermischt und aliquotiert. Die so behandelten

Kulturen konnten dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für ca. 1 Jahr bei -75 °C gelagert werden.

2.3.2 Herstellung der Bakterien-Nährmedien

Sämtliche Medien wurden autoklaviert, eine optionale Zugabe von Antibiotika zur Selektion erfolgte erst nach Abkühlung auf etwa 50 °C.

<u>LB – Medium:</u>	1 %	Bacto - Trypton
(Luria-Bertani)	0,5 %	Bacto - Hefeextrakt
	1 %	NaCl
	→	pH 7
<u>LB – Agar – Medium:</u>		LB – Flüssigmedium mit
	1,5 %	Bacto – Agar
<u>SOB – Medium:</u>	2 %	Bacto – Trypton
	0,5 %	Bacto – Hefeextrakt
	0,05 %	NaCl
	2 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
<u>SOC – Medium:</u>		SOB – Medium mit
	20 mM	Glucose
	→	pH 7
<u>TFB – Medium:</u>	10 mM	MES (pH 6)
	45 mM	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	10 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	100 mM	KCl
	3 mM	Hexamin – CoCl ₃
<u>FSB – Medium:</u>	10 mM	K – Acetat (statt MES)
	6 %	Glycerin
		übrige Komponenten wie TFB – Medium

2.3.3 Vernichtung von Bakterien

Sämtliche mit den Bakterien in Kontakt getretenen Materialien und Medien mussten bei 134 °C und 2 bar für 15 min. durch Autoklavieren vernichtet werden, bevor sie gespült bzw. entsorgt werden konnten.

2.4 Hefekulturen

Verwendet wurden zwei Hefestämme der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*. Sie zeichnen sich durch ein relativ kleines Genom (ca. 12Mb), kurze Generationszeit und einem hochgradig manipulierbaren Genom aus (GRÜNENFELDER & WINZELER 2002, SHERMAN 2003). Sie sind daher, auch aufgrund hoher Konserviertheit der meisten eukaryotischen zellulären Prozesse, für Studien über post-genetische Funktionen geeignet (GRÜNENFELDER & WINZELER 2002).

Saccharomyces cerevisiae: AH109 (JAMES et al. 1996)

Genotyp: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ,
LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3,
GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2,
URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1

Reportergene: ADE2, HIS3, MEL1, lacZ

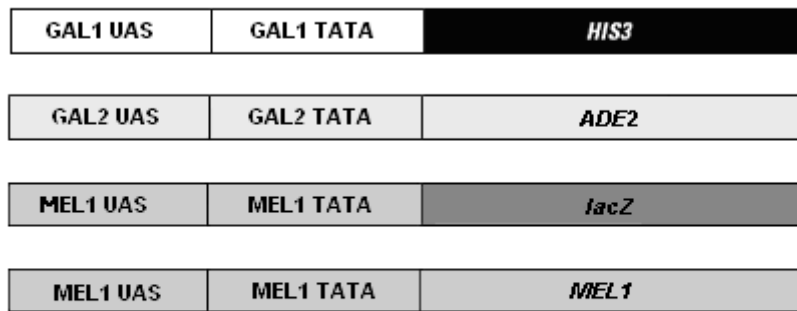
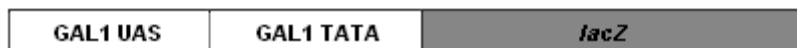
auxotrophe Marker: trp1, ura3, leu2

Saccharomyces cerevisiae: Y187 (HARPER et al. 1993)

Genotyp: MAT α, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901,
leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ,
URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ, MEL1

Reportergene: lacZ

auxotrophe Marker: trp1, leu2

Reporterkonstrukte in AH 109**Reporterkonstrukte in Y 187****Abb.10 Reporterkonstrukte der Hefestämme AH109 und Y187:**

Der Stamm AH109 kennzeichnet sich durch die Nahrungsreportergene ADE2 und HIS3. Zusätzlich trägt er die Reportergene MEL1 und lacZ, welche unter der Kontrolle der vier GAL4-Regulierten UAS- und Promoterelementen GAL1, GAL2 und MEL1 stehen. Der Stamm Y187 besitzt ein durch GAL1 und AUS reguliertes lacZ-Reportergen (MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manuel 1999, MATCHMAKER Library Construction & Screening Kits User Manuel 2006)

2.4.1 Anzucht

Sämtliche Arbeiten mit *Saccaromyces cerevisiae* wurden unter einer Sterilbank (Laminal-Air-Flow, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbuhl-Genkingen) ausgeführt.

2.4.1.1 Plattenkulturen

Für die Anzucht der Hefestämme wurde mit einer sterilen Impföse eine geringe Menge auf dem entsprechenden Agarnährmedium ausgestrichen und in einem Brutschrank (Memmert Typ BE30, Memmert, Schlabach) bei 30 °C bis zu einem Koloniedurchmesser von ca. 2 mm inkubiert. Verschlossen mit Nescofilm konnten diese für ca. 4 Wochen bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt und für Folgeversuche verwendet werden.

Im Rahmen von Transformationsversuchen oder des Matings der Hefen wurden zwischen 50 – 200µl mit einem sterilem Drigalkispatel auf entsprechenden Selektivagarnährböden ausplattiert und für 3 – 8 Tage im Brutschrank (Memmert Typ BE30, Memmert, Schlabach) bei 30°C inkubiert. Für eine spätere Vereinzlung wurden mit einer Impföse Verdünnungsausstriche durchgeführt und ebenfalls für 3-8 Tage bei 30°C inkubiert. Eine anschließende Lagerung bei 4°C für ca. 4 Wochen im Kühlschrank war möglich. Bei sämtlichen Anzuchten wurden die Petrischalen mit Nescofilm verschlossen und invertiert inkubiert bzw. gelagert.

2.4.1.2 Flüssigkulturen

Für eine Flüssigkultur wurde eine Kolonie von ca. 2-3 mm Durchmesser mit einer sterilen Impföse von einer Plattenkultur in 5 ml Flüssigmedium entsprechender Stringenz überführt. Zum Erreichen einer guten Verteilung der Zellen im Medium wurde anschließend gevortext und die Flüssigkultur 16-18 Stunden bei 30°C und 150 rpm in einem Schüttelwasserbad (GFL 1083 oder GFL 1086, Gesellschaft für Labortechnik (GFL) mbH, Burgwedel) inkubiert. Dabei erreichen die Hefezellen eine stationäre Phase ihres Wachstums ($OD_{600} > 1,5$). Zur nachfolgenden Vorbereitung der Kompetenzmachung wurde eine erforderliche Menge der ÜN-Flüssigkultur bis zum Erreichen der erforderlichen OD_{600} in frisches Flüssigmedium überführt und unter oben genannten Bedingungen ca. 4 Stunden inkubiert.

2.4.1.3 Dauerkulturen

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 1 Vol. einer über Nacht-Flüssigkultur mit 1 Vol. autoklaviertem Glycerin (65%) vermischt und aliquotiert. Die so behandelten Kulturen konnten anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für ca. 1 Jahr bei -70°C gelagert werden.

2.4.2 Herstellung der Hefe-Nährmedien

Sämtliche Medien wurden autoklaviert und nach Abkühlen auf ca. 50°C ausgegossen, um unnötige Kondenswasserbildung in den Petrischalen zu vermeiden. Anschließend wurden die Petrischalen mit Nescofilm (Carl Roth, GmbH&Co, Karlsruhe) verschlossen und konnten so in im Kühlschrank bei 4°C etwa 4 Wochen aufbewahrt werden.

YPDA- Flüssigmedium (Yeast-Peptone-Dextrose-Adenin):

2 %	Bacto-Pepton
1 %	Bacto-Hefeextrakt
2 %	Glucose
0,003 %	Adenin-Hemisulfat
→ pH 6,5	mit NaOH eingestellt

YPDA-Agar-Medium:

	YPDA-Flüssigmedium
2 %	Bacto-Agar
	→ autoklaviert

Synthetic Dropout (SD) Medium:

	0,67 %	Yeast Nitrogen Base
	2 %	Glucose
	0,064 %	DO Supplement -Leu/-Trp
oder	0,06 %	DO Supplement -Ade/-His/-Leu/-Trp
	2 %	Agar

je nach Stringenz

1 Vol.%	Leucin-Stammlösung (1000mg/100ml)
1 Vol.%	Tryptophan-Stammlösung (200mg/100ml)
1 Vol.%	Adenin- Stammlösung (200mg/100ml)
1 Vol.%	Histidin- Stammlösung (200mg/100ml)

→ pH 5,8

2.4.3 Vernichtung von Hefen

Sämtliche mit den Hefen in Kontakt getretenen Materialien und Medien mussten bei 134°C und 2 bar für 15 min. durch Autoklavieren vernichtet werden, bevor sie gespült bzw. entsorgt werden konnten.

2.5 Nukleinsäurepräparation

2.5.1 Präzipitation von Ribonukleinsäuren (RNA)

Durch Zugabe von monovalenten Kationen und Alkohol können Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen gefällt werden. Dies geschah bei allen nachfolgenden Extraktionsmethoden entweder durch Zugabe von 0,7-0,8 Vol. Isopropanol oder 2,5 Vol. Ethanol (reinst). Anschließend wurden die Proben durch Invertieren gemischt und 15 min. bei RT (Isopropanolfällung) bzw. 30 min. bei -20°C (Ethanol-fällung) zur Fällung gebracht. Bevorzugt wurde ethanolisch gefällt, da hierbei eine Kopräzipitation von Salzen und Zuckern weniger zu befürchten war (SAMBROOK et al. 1989). Nach Zentrifugation bei 4°C mit 12000x g für 30 min. (Beckman J2-21/Sigma 202-MK) wurde der Überstand vorsichtig entnommen und das Pellet zweimal mit 70 - 80 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach einer anschließenden Lufttrocknung für 5 min. bei Raumtemperatur konnte das Pellet in TE- oder Tris-Puffer jedoch bevorzugt in sddH₂O gelöst werden, um keine störenden Einflüsse in Folgereaktion zu erlangen. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -20°C.

<u>Tris-Puffer:</u>	10 mM	Tris
	→	pH 8 (mit HCl eingestellt)
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM	Tris/HCl (pH 8)
	1 mM	Na ₂ -EDTA

2.5.2 Probenvorbereitung für RNA-Extraktionen

Für alle nachfolgenden Extraktionsmethoden wurden 50 - 500 mg (Frischgewicht) Pflanzenmaterial mit einem Pistill in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem Stickstoff bis zu einem pulverigen Zustand zerkleinert. Um eine größere Aufschlussrate der Zellen zu erzielen, wurde optional eine Spatelspitze Quarzsand zugegeben. Es war darauf zu achten, dass die Probe bis zur Überführung in den jeweiligen Isolationspuffer nicht auftaute, um den Abbau der Nukleinsäure durch Endonukleasen zu verhindern.

2.5.3 Extraktion von gesamt-RNA (gRNA)

Bei allen nachfolgenden Extraktionsmethoden war exakt darauf zu achten, dass es zu keiner Kontamination kommt, um das Einschleppen von Ribonukleasen zu vermeiden. Deshalb wurden ausschließlich autoklavierte bzw. hitzesterilisierte Gerätschaften verwendet und bei sämtlichen Schritten Latexhandschuhe getragen.

2.5.3.1 Isolation nach MacDONALD et al. (1987)

Das Isolationsprinzip basiert auf der Denaturierung der zellulären Proteine durch Guanidinium-HCl (Gu-HCl), N-Laurylsarcosin und Phenol. Nach einer Phasentrennung kann durch hochmolares LiCl die gRNA präzipitiert werden.

<u>Gu-HCl-Puffer:</u>	8 M	Gu-HCl
(Guanidinium-HCl)	20 mM	MES (pH 7)
	20 mM	Na ₂ -EDTA
	0,5 %	N-Laurylsarcosin (nach Autoklavieren dazugeben)
	1%	2-Mercaptoethanol (jeweils frisch dazugeben)

Durchführung:

Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde unter dem Abzug vorsichtig mit einem sterilen, gekühlten Spatel in ein 30 ml-Teflonzentrifugenröhrchen (Nalgene, Rochester, NY, USA) mit Gu-HCl-Puffer (0,5 ml/100 mg Frischgewicht) überführt. Dabei war darauf zu achten, dass das Homogenat erst im Isolationspuffer auftaute, um einen Abbau der RNA durch gewebeeigene RNasen zu verhindern. Die Probe wurde sofort

gründlich geschüttelt und für 5 min. bei RT belassen. Nach Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:48:2) wurde erneut kräftig geschüttelt und für 5 min. bei 8000x g bei RT zentrifugiert (Sigma 202MK, 30 ml-Winkelrotor). Die wässrige, nukleinsäurehaltige Oberphase wurde in ein frisches Gefäß überführt und anschließend die Ph/Chl/IAA-Extraktion wiederholt. Der neuerlich in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführte Überstand wurde mit 1 Volumen Chl/IAA versetzt, gemischt, zentrifugiert und aus dem Überstand die RNA mit 0,5 Vol. 8 M LiCl mindestens für 2 h bei -20°C gefällt. Dabei blieben die noch vorhandene DNA und Proteine in Lösung während die RNA präzipitierte. Anschließend wurde die RNA mit 12000x g (30 min., 4°C) pelletiert, zweimal mit 70 %igem EtOH gewaschen und in 1 ml sddH₂O aufgenommen. Die Ph/Chl/IAA-Extraktion wurde wie beschrieben wiederholt und im Anschluss die RNA-haltige, wässrige Oberphase ethanolisch gefällt.

2.5.3.2 Isolation mit PeqGold RNAPure™ (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Das gebrauchsfertige Reagenz peqGOLD RNAPure™ enthält Phenol und Guanidin-isothiocyanat in einphasiger Lösung. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenisat in drei Phasen auf und die RNA befindet sich in der wässrigen Oberphase (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Standardprotokoll).

Durchführung:

Nach dem Zermörsern in flüssigem Stickstoff wurde das Gewebe in ein 12 ml Teflonzentrifugenröhrchen mit 1 ml/100 mg Frischgewicht peqGOLD RNAPure™ überführt, durch kurzes schütteln homogenisiert und für 5 min. bei RT stengelassen, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Anschließend wurde pro eingesetztem ml peqGOLD RNAPure™ 0,2 ml Chloroform zugegeben, für 15 sek. kräftig geschüttelt und 3-10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min. bei 12000x g und RT (Beckman J2-21, Rotor JS 13.1) erhielt man eine Auftrennung der Probe in drei Phasen. Die ausschließlich in der wässrigen Oberphase befindliche RNA wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und abweichend vom Protokoll ethanolisch gefällt.

<u>Puffer R3:</u>		Puffer R0
	1150 mM	KCl
	→	pH 6,3
<u>Puffer R4:</u>		Puffer R0
	1150 mM	KCl
	6 M	Harnstoff
	→	pH 6,3
<u>Puffer W1:</u>	50 mM	Tris/Acetat
	4 M	GuSCN
	→	pH 7,8
<u>Puffer W3:</u>	20 %	Triton X 100
<u>Puffer W4:</u>	3 M	Na-Acetat
	→	pH 6,5
<u>Puffer W5:</u>	10 mM	Tris/Acetat
	1 mM	EDTA
	→	pH 7,8
<u>Puffer W6:</u>	200 mM	Tris/Acetat
	1,5 M	KCl
	→	pH 6,3
<u>Puffer N5:</u>	100 mM	Tris/H ₃ PO ₄
	15 %	Ethanol
	1000 mM	KCl
	→	pH 8,5

2.5.3.4 Isolation mit NucleoSpin®-RNA-Plant-Kit (Macherey & Nagel, Düren)

Nach Zermörserung des Pflanzenmaterials in flüssigen Stickstoff erfolgt bei dieser Methode eine Inkubation in einer Lösung chaotropischer Salze. Der Lysispuffer inaktiviert die vorhandenen Ribonukleasen, welche in allen biologischen Geweben vorhanden sind. Zusätzlich ermöglicht er die Bindung der RNA an die NucleoSpin®

RNA Plant Extraktionssäulen. Zuvor wird die Zelldebris des Lysates mittels einer Filtrationssäule entfernt. Nach Beladen der Extraktionssäule wird durch Zugabe einer DNase die unerwünschte DNA denaturiert. Anschließend werden mit 2 Pufferlösungen Salze, Metabolite und makromolekulare Komponenten entfernt. Mit ddH₂O wird letztlich die RNA eluiert und für weitere Versuche bei -20 °C aufbewahrt.

Die Durchführung der RNA-Extraktion erfolgte nach dem Originalprotokoll des Extraktions-Kit (Macherey & Nagel, Düren), welches nachfolgend im Schema gezeigt wird.













1	Homogenization of sample		100 mg
2	Cell Lysis		350 µl RA1 3.5 µl β-mercaptoethanol or 350 µl RAP 3.5 µl β-mercaptoethanol Mix
3	Filtration of lysate	 	1 min 11,000 x g
4	Adjust RNA binding conditions		350 µl 70 % ethanol
5	Bind RNA	 	30 sec 11,000 x g
6	Desalt silica membrane		350 µl MDB 1 min 11,000 x g
7	Digest DNA		95 µl DNase reaction mixture RT 15 min
8	Wash and Dry silica membrane	  	1 st wash 200 µl RA2 2 nd wash 600 µl RA3 3 rd wash 250 µl RA3 1 st and 2 nd 30 sec 11,000 x g 3 rd 2 min 11,000 x g
9	Elute highly pure RNA	 	60 µl H ₂ O (RNase free) 1 min 11,000 x g

Abb. 11 Übersichtsschema der Versuchsdurchführung des NucleoSpin® RNA Plant Kit
(Quelle: Macherey & Nagel, Düren)

2.6. Plasmidextraktion

2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mittels alkalischer Lyse

Bei der alkalischer Lyse werden die Bakterien zunächst in einen EDTA-haltigen Puffer gebracht. Das EDTA bewirkt durch Komplexierung der für die Bakterienzellwand wichtigen zweiwertigen Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) ihre Destabilisierung. Anschließend erfolgt durch Zugabe von SDS und NaOH eine Denaturierung der Proteine sowie der chromosomalen und Plasmid-DNA (pDNA). Wird das Lysat mit Kaliumacetat-Puffer rechtzeitig neutralisiert kann die pDNA renaturieren. Denaturierte Proteine, chromosomale DNA und bakterielles Zelldebris bilden hingegen mit dem Kaliumacetat unlösliche Komplexe und können mittels Zentrifugation pelletiert werden. Der pDNA-haltige Überstand kann schließlich präzipitiert werden.

2.6.1.1 Isolierung ohne Säulenaufreinigung (SAMBROOK et al. 1989)

Für die pDNA-Präparation wurde eine Flüssigkultur des entsprechenden Klons in 10 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelwasserbad angezogen. Je 1 ml der frischen Flüssigkultur wurden in ein Eppendorfgefäß gefüllt und für 30 sek. bei 14000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Tisch-Zentrifuge 5415C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II, welche die alkalische Lyse bewirkte, wurde der Ansatz durch invertieren durchmischt. Nach maximal 5 min. wurde 150 µl eiskalte Lösung III zugegeben, für 5 min. auf Eis gestellt und anschließend für 5 min bei 12000x g zentrifugiert (4 °C, 202MK Sigma, Winkelrotor). Der pDNA-haltige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und ethanolisch präzipitiert.

<u>Lösung I:</u>	50 mM	Glucose
	25 mM	Tris-HCl (pH 8)
	10 mM	Na ₂ -EDTA (pH 8)
<u>Lösung II:</u> (frisch ansetzen)	0,2 N	NaOH
	1 %	SDS
<u>Lösung III:</u>	3 M	K-Acetat
	11,5 %	Essigsäure

Für eine schnelle Überprüfung von Transformanten konnten auch direkt einzelne Bakterienkolonien von der Agarplatte entnommen und nach dem oben beschriebenen Protokoll behandelt werden. Hierbei wurden lediglich die verwendeten Puffervolumen halbiert. Mittels PCR konnte anschließend überprüft werden, ob die Transformation erfolgreich war.

2.6.1.2 Säulenchromatographische Isolierung (Qiagen, Hilden)

Bei dieser Methode wird pDNA nach einer alkalischen Lyse in Gegenwart chaotropischer Salze an eine Glasfasermembran (Qiagen-tip 500, Qiagen, Hilden) gebunden und nach Waschschritten mit einer wässrigen Lösung eluiert. Man erhält dadurch bis zu 500 µg pDNA.

<u>Puffer P1:</u>	50 mM	Tris
	10 mM	Na ₂ -EDTA
	100 mg	RNase A (nach dem Autoklavieren zugeben)
	→	pH 8 (mit HCl einstellen)
<u>Puffer P2:</u>	200 mM	NaOH
	20 % (w/v)	SDS
<u>Puffer P3:</u>	3 M	K-Acetat
	→	pH 5,5 (mit ca. 110 ml Eisessig)
<u>Puffer QBT:</u>	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS
	→	pH 7 (mit NaOH einstellen)
	15 % (v/v)	Isopropanol
	1,5 % (v/v)	10 % Triton
<u>Puffer QC:</u>	1 M	NaCl
	50 mM	MOPS
	→	pH 7 (mit NaOH einstellen)
	15 % (v/v)	Isopropanol
<u>Puffer QF:</u>	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris
	→	pH 8,5 (mit HCl einstellen)

Lösungen mit MOPS-Puffer bzw. Isopropanol wurden nicht autoklaviert, sondern sterilfiltriert.

Durchführung:

Eine Einzelkolonie, welche zuvor über Nacht auf einer LB-Ampicillin (LB_{amp})-Platte gewachsen war, wurde für eine Vorkultur in 10 ml LB_{amp}-Flüssigmedium überimpft und für ca. 6 h im Schüttelwasserbad bei 37 °C, 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde 1 ml der Vorkultur zu 100 ml LB_{amp}-Flüssigmedium in eine 500 ml Schraubdeckelflasche überführt und über Nacht (16 Std.) weiter inkubiert. Die Bakterienkultur wurde in ein steriles 250 ml Zentrifugengefäß überführt, bei 6000x g für 15 min. bei 4 °C pelletiert (Kühlzentrifuge J2-21, Beckman, Rotor JA 14) und der Überstand verworfen. An dieser Stelle konnte das Protokoll unterbrochen werden und die Bakterien bei -20 °C eingefroren werden. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 durch kräftiges Schütteln (Vortex-Gerät Heidolph REAX 2000) vollständig gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml Puffer P2 und das Vermischen der Probe durch leichtes Schwenken. Es sollte hier nicht geschüttelt werden, da hierdurch entstehende Scherkräfte die pDNA zerstören konnten. Nach einer Inkubation von maximal 5 min wurden 10 ml gekühlter Puffer P3 hinzugefügt und wiederum vorsichtig durch Schwenken durchmischt. Es erfolgte eine Inkubation für 20 min. auf Eis. Die zu beobachtende weiße Ausflockung enthält genomische DNA, Proteine, Zelldebris und SDS. Nach anschließender Zentrifugation bei 4 °C und 20000x g für 15min. wurde der Überstand mit einer weitlumigen Glaspipette in ein steriles 30 ml Corex-Zentrifugenröhrchen überführt, mit Nescofilm (Nippon Kaisha Ltd., Osaka, Japan) verschlossen und erneut unter den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Währenddessen wurde eine Qiagen-Tip 500-Säule an einem Stativ befestigt und mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Danach wurde der Überstand auf die Säule gebracht, zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und anschließend mit 15 ml Puffer QF in ein frisches Corex-Zentrifugenröhrchen eluiert. Gefällt wurde die pDNA mit 10,5 ml (0,7 % Volumen) Isopropanol. Den nachfolgenden Waschschritten folgte die Aufnahme in 0,5 ml sddH₂O. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.1.3 Säulenextraktion mit NucleoSpin® Plasmid-Kit (Macherey&Nagel, Düren)

Diese Extraktionsmethode basiert ebenfalls auf der alkalischen Lyse. Die durch Zentrifugation pelletierten Bakterienzellen werden in Puffer A1 resuspendiert, durch den Puffer A2 gelöst und anschließend durch den Puffer A3 neutralisiert, so dass die Plasmid-DNA letztlich an die Silicamembran der NucleoSpin®-Säule gebunden werden kann. Anschließend werden präzipitierte Proteine, genomische DNA und Zelldebris mittels Zentrifugation nach Zugabe eines ethanolischen Puffers (A4) entfernt und die Plasmid-DNA mit ddH_2O eluiert.

Die Durchführung der Plasmid-Extraktion erfolgte nach dem Originalprotokoll des Extraktions-Kit, welches nachfolgend im Schema gezeigt wird.








1	Cultivate and harvest bacterial cells		30 sec 11,000 x g
2	Cell lysis		Buffer A1 250 µl Buffer A2 250 µl Buffer A3 300 µl
3	Clarification of lysate		5 - 10 min 11,000 x g
4	Bind DNA		load supernatant 1 min 11,000 x g
5	Wash silica membrane		(optional: Buffer AW 500 µl) Buffer A4 600 µl 1 min 11,000 x g
6	Dry silica membrane		2 min 11,000 x g
9	Elute highly pure DNA		50 µl Buffer AE RT 1 min 1 min 11,000 x g

Abb. 12 Übersichtsschema der Versuchsdurchführung des NucleoSpin® Plasmid Kit
(Quelle: Macherey & Nagel, Düren)

2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Auch die Isolierung der Plasmid-DNA aus Hefen erfolgte mittels alkalischer Lyse. Die Isolation der Plasmid-DNA aus Hefezellen gestaltet sich jedoch aufgrund der robusten Zellwand etwas schwieriger als bei Bakterien, sodass zusätzliche Schritte zur Lyse der Zellen durchgeführt werden müssen. Dies wird durch eine Inkubation der Hefezellen mit dem Enzym Lyticase in Verbindung mit einem Sorbitol-Puffer erzielt. Es kommt zur Auflösung der Zellwände und zur Bildung von Sphäroblasten (Protoplasten, die sich durch das Vorhandensein von Zellwandresten auszeichnen), aus denen die Plasmide nach der in 2.6.1.3 dargestellten Standardmethode NucleoSpin® Plasmid-Kit (Macherey&Nagel, Düren) isoliert werden konnten.

Enzymatischer Aufschluss der Hefezellen mit Lyticase

Der enzymatische Aufschluss der Hefezellen erfolgte nach einem Zusatzprotokoll der Firma Macherey & Nagel, Düren, das prinzipiell auf den Entwicklungen von LING et al. (1995) beruht.

Benötigte Lösungen:

Sorbitol-Puffer:

1,2 M	Sorbitol
0,01 M	CaCl ₂
0,1 M	Tris/HCl (pH= 7,5)
	→ autoklaviert
0,35 M	β-Mercaptoethanol
	→ erst unmittelbar vor dem Gebrauch hinzugefügt
	0,01 M EDTA-Na ₂
	→ pH= 8

Durchführung:

Eine Übernacht-Kultur der Hefezellen wurde bis zu einer OD600 von 1,8-2,0 in Flüssigmedium kultiviert. 3-5 ml dieser Kultur wurden durch eine 10minütige Zentrifugation bei 5.000 x g und RT pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 1 ml 0,01 M EDTA-Na₂-Lösung durch Auf- und Abziehen in der Pipette gewaschen. Nach

einer weiteren Zentrifugation bei 5.000 x g und RT für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 600 µl Sorbitol-Puffer resuspendiert. Daraufhin wurden 40 µl Lyticase (5 u/µl in TE, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) hinzugegeben und der Ansatz für 30 min. in einem Wasserbad bei 30°C inkubiert. Die Isolation der Sphäroblasten erfolgte durch eine 10minütige Zentrifugation bei 2.000 x g und RT. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen. Die weitere Extraktion der Plasmide konnte mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey & Nagel, Düren) durchgeführt werden.

2.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können nach ihrer Größe (Molekulargewicht) in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Dies geschieht in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer bei neutralem pH-Wert negativ geladenen Phosphatgruppen. Die Auftrennung der Nukleinsäuren basiert darauf, dass die Agarose-Matrix kleineren Fragmenten weniger Widerstand bietet als größeren.

Durch zusätzliches Auftragen von DNA-Längenstandards ist es möglich, die Größe der aufgetrennten Nukleinsäuren zu bestimmen. Dies geschieht mit Hilfe einer Ethidiumbromid- oder der SYBR® Gold-Anfärbung (2.8.2 und 2.8.3), welche es anschließend möglich die Nukleinsäuren im Gel unter UV-Licht sichtbar zu machen und zu dokumentieren.

2.7.1 DNA-Längenstandards

Die nachfolgenden DNA-Längenstandards stammten mit Ausnahme der 100 bp-Leiter (Roth, Karlsruhe) von der Firma MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot.

- FastRuler™ DNA Ladder High Range (Fragmentgrößen von 500 bp bis 10000 bp)
- MassRuler™ DNA Ladder High Range (Fragmentgrößen von 1500bp bis 10000 bp)
- GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fragmentgrößen von 250 bp bis 10000 bp)
- 100 bp Ladder (Fragmentgrößen von 100 bp bis 1000 bp)

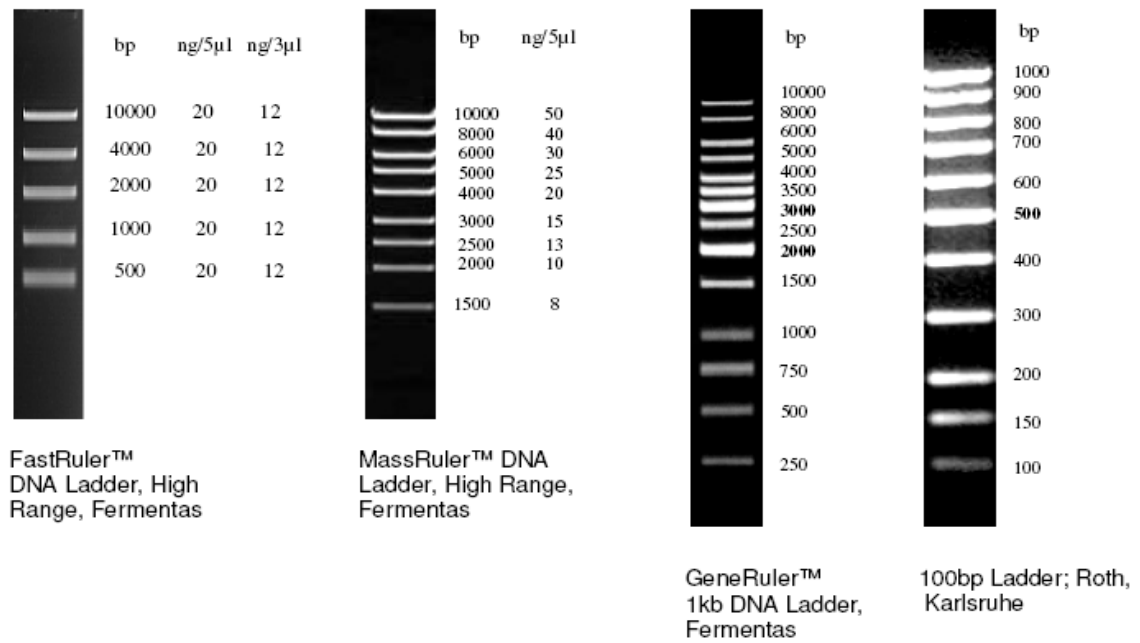


Abb. 13 Langenmarker (von links): FastRuler™ DNA Ladder High Range, MassRuler™ DNA Ladder High Range, GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, 100 bp Ladder

2.7.2 Probenvorbereitung und Gelelektrophorese (Mini-Gel)

Je nach Anzahl der Proben kamen zur Analyse der Nukleinsäure-Fragmente zwei verschiedene, horizontale Elektrophoresekammern zum Einsatz (Mini sub cell und Mini wide sub cell, Biorad, München). Die entsprechenden Gelträger hatten eine Größe von 7 x 6 bzw. 7 x 15 cm. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Gele verschiedener Konzentration verwendet.

Agarose[%]	Größe der zu trennenden DNA-Fragmente [kb]
0,7	1 - 30
1,0	0,5 - 10
1,2	0,4 - 7
1,5	0,2 - 3
2,0	0,05 - 2

Tab.3 Übersicht der geeigneten Gelstärke für die Auftrennung verschieden großer DNA-Fragmente

Für die Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in 30 bzw. 60 ml 0,5x TBE-Puffer gegeben, gewogen und anschließend in einem Mikrowellengerät (Micro Chef FM 350, Moulinex) aufgekocht und gelöst bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Nachdem das verdampfte H₂O (Gewichtsverlust) im entsprechenden Volumen wieder ergänzt wurde, konnte das Gel auf dem im Gelgießstand eingespannten Gelträger ausgegossen werden. War kein Gelgießstand vorhanden, wurde die Gelkammer mit Klebestreifen abgedichtet. Das fertig ausgehärtete Gel wurde anschließend in der mit 0,5x TBE-Puffer beladenen Elektrophoresekammer platziert.

Die entsprechende Menge der aufzutrennenden Proben wurde auf einen Streifen Nescofilm pipettiert, mit 1/6 Volumen 6x Probenpuffer oder 6x Orange G-Puffer versetzt und mit ddH₂O auf das Endvolumen gebracht (meist 20 µl). Nach dem Beladen der Geltaschen wurde der Anodenkammer 0,7 µl EthBr ([20 mg/ml Stammlösung) zugegeben, wodurch die Fluoreszenzaktivität für die anschließende Detektierung unter UV-Licht erhöht wurde. Bei einer Anfärbung mit SYBR[®]Gold fand die Elektrophorese ausschließlich in 0,5x TBS statt. Die Anfärbung erfolgt hier erst danach. Es wurde eine Spannung von 80 V (4 V/cm) am Spannungsgeber (Power Pac, Biorad, München) angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Front das Ende des Gels erreichte. Die Mobilität von Bromphenolblau in einem 1 %igen Agarosegel entspricht in etwa einem DNA-Fragment von 300 bp Länge. Beim Farbstoff Orang G liegt die Mobilität bei etwa 80 bp.

<u>0,5x TBE-Puffer:</u>	89 mM	Tris
(5x konz. ansetzen)	89 mM	Borat
	2 mM	Na ₂ -EDTA
	→	pH 8
<u>6x Probenpuffer:</u>	30 %	Glycerin
	0,25 %	Xylencyanolblau
	0,25 %	gesättigtes Bromphenolblau
	0,4 mg/ml	Ethidiumbromid
		in 0,5x TBE-Puffer
<u>6x Orange-G Probenpuffer:</u>	0,2 %	Orang G
	0,05 %	Xylen Cyanol FF
	60 %	Glycerol
	60mM	EDTA-Na ₂

2.7.3 Dokumentation der Gele

Das Ergebnis der Elektrophorese wurde auf dem UV-Tisch (TF-20.M-Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich) kurz betrachtet, da sich die Fluoreszenz mit der Zeit zunehmend abschwächt. Anschließend konnten die Ergebnisse mit Hilfe einer Kamera (CF 8/1 FMCC Air, Kappa, Göttingen) fotografiert und die Bilddaten auf dem PC mit WinTV 2000 (Hauppauge Computer Works GmbH, Mönchengladbach) dokumentiert werden. Die anschließende Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm AdobeTMPhotoshopTMCS (Adobe Systems Inc., San Jose, USA).

2.8 Nukleinsäure-Nachweismethoden

2.8.1 Photomerische Bestimmung

Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht in einem Wellenlängenbereich von 250 -270 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Ein Absorptions-Wert (A) von 1 bei 260 nm entspricht einer DNA- bzw. pDNA-Konzentration von 50 µg/ml, bei einer RNA-Konzentration entspricht er 40 µg/ml (SAMBROCK et al. 1989).

Für die Messung wurden 5 µl (DNA) bzw. 4 µl (RNA) der Lösung in eine Quarzglasküvette pipettiert und mit dem entsprechenden Puffer bzw. sddH₂O auf 1ml aufgefüllt. Als Referenz diente der reine Puffer (bzw. sddH₂O). Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer (Typ U-1100, Hitachi). Die Reinheit einer Präparation kann über den Quotienten (Q) von A_{260}/A_{280} bestimmt werden. Für reine DNA- bzw. pDNA erhält man einen $Q_{260/280}$ von 1,8 - 1,9. Bei reiner RNA liegt der Wert bei $Q_{260/280}$ von 1,9 -2,0 (SAMBROCK et al. 1989). Niedrigere Werte sprechen für eine Verunreinigung mit Phenolen und/oder Proteinen.

2.8.2 Anfärbung mit Ethidiumbromid

Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) ist ein organischer Farbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur zwischen den Basenpaaren von Nukleinsäuren interkalieren kann. Nach Anregung mit UV-Licht (254 – 366 nm) emittiert es rot-oranges Licht der Wellenlänge 590 nm. Die Bindung an Nukleinsäuren

bewirkt eine Verstärkung der Fluoreszenz, so dass die Färbung auch in Gegenwart von freiem Ethidiumbromid im Agarosegel gut zu sehen ist.

Wegen seiner interkalierenden Wirkung und der daraus resultierenden Mutagenität sollte beim Umgang mit Ethidiumbromid größte Vorsicht geboten sein. Ausserdem mussten sämtliche mit dem Farbstoff in Kontakt getretenen Materialien gesondert entsorgt werden.

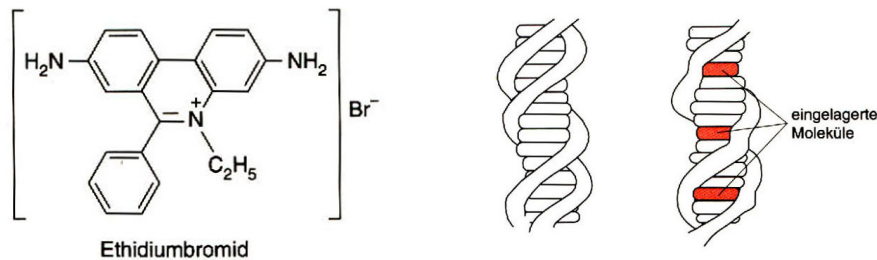


Abb.14 Strukturformel von Ethidiumbromid. Interklaierte Moleküle in doppelsträngiger DNA
(Quelle: Lottspeich und Zorbas 1998)

2.8.3 Anfärbung mit SYBR[®] Gold

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Gold (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) ist um ein vielfaches sensitiver als Ethidiumbromid. Nach Anregung mit UV-Licht (254 – 366 nm) emittiert es gelb-goldenes Licht der Wellenlänge mit einem Maximum bei 537 nm. Die Färbung mit SYBR[®] Gold wurde nach der Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurde das Gel für ca. 20 Min. in einer 0,1 %igen SYBR[®] Gold-Lösung auf einem Schüttler (Heidolph, Schwabach) inkubiert.

2.9 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ermöglicht es, RNA in cDNA (complementary DNA) umzuschreiben, welche dann in einer anschließenden Polymerasekettenreaktion (PCR) weiter charakterisiert werden kann. Die Synthese der cDNA wird von viralen Polymerasen, den reversen Transkriptasen, bewerkstelligt. Eingesetzt wurde das Enzym RevertAid[™] H Minus M Mu-LV Reverse Transkriptase (MMLV-RTase, Fermentas,

St.Leon-Rot), das aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus isoliert wurde und durch seine hohe Prozessivität in der Lage ist, cDNA bis zu einer Länge von 10kb zu synthetisieren (LOTTTSPEICH und ZORBAS 1998). Ausgehend von einem oligo(dT)-Primer synthetisiert dieses Enzym beginnend vom Poly-A-Schwanz der mRNA in 3'-Richtung selektiv den Komplementärstrang, so dass ein Hybriddoppelstrang (DNA/RNA) entsteht. Die reverse Transkription kann alternativ auch durch einen random Hexamerprimer (Oligonukleotide bestehend aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden) erfolgen.

Durchführung:

Die Durchführung erfolgte nach einem Standardprotokoll von MBI Fermentas (St.Leon-Rot).

Hierbei wurden zunächst

13 μ l gRNA (10ng – 5 μ g)
1 μ l Oligo-(dT)15 Primer (500u/ μ l)
oder random Hexamer Primer (500/ μ l)

in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipetiert, vorsichtig durchmischt und kurz anzentrifugiert. Anschließend erfolgte zur Entfernung der Sekundärstrukturen eine Inkubation für 5 Min. bei 70°C in einem Wasserbad (GLF-Labortechnik mbH & Co.,Hannover-Vinnhorst). Nachfolgend wurden auf Eis

4 μ l MMLV-RTase 5x Reaktionspuffer (MBI Fermentas, St.Leon-Roth)
1 μ l dNTP-Mix (10mM)

zugegeben, erneut vorsichtig durchmischt und kurz anzentrifugiert. Nach Zugabe von

1 μ l MMLV RTase (MBI Fermentas, St.Leon-Roth)

erfolgte eine Inkubation für 60 Min. bei 42°C, ehe die Reaktion durch einen 10minütigen Schritt und bei 70°C abgestoppt wurde. Zur Verringerung der Ionenkonzentration wurde der Versuchsansatz mit 1 Volumen sddH₂O verdünnt. Die cDNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.10 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Bevor die gewünschten PCR-Produkte in der Ligation eingesetzt werden konnten, war es notwendig, sie aus dem Agarosegel oder dem PCR-Ansatz aufzureinigen und zu isolieren, um eine Fehlligation mitamplifizierter Fragmente (z.B. Primer-Dimere) zu verhindern. Für die Aufreinigung wurde das NucleoSpin® Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Durchführung der Aufreinigung erfolgte nach dem Originalprotokoll des Extraktions-Kit, welches nachfolgend im Schema gezeigt wird.

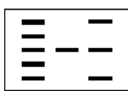









1 Excise DNA fragment		
2 Gel lysis / Adjust binding conditions	 200 µl NT / 100 mg 50°C 5-10 min	 200 µl NT / 100 µl
3 Bind DNA	  1 min 11,000 x g	
4 Wash silica membrane	  1 min 11,000 x g	600 µl NT3
5 Dry silica membrane	 2 min 11,000 x g	
6 Elute DNA	  1 min 11,000 x g	15-50 µl NE 1 min RT

Abb.15 Übersichtsschema der Versuchsdurchführung des NucleoSpin® Extract II Kit
(Quelle: Macherey & Nagel, Düren)

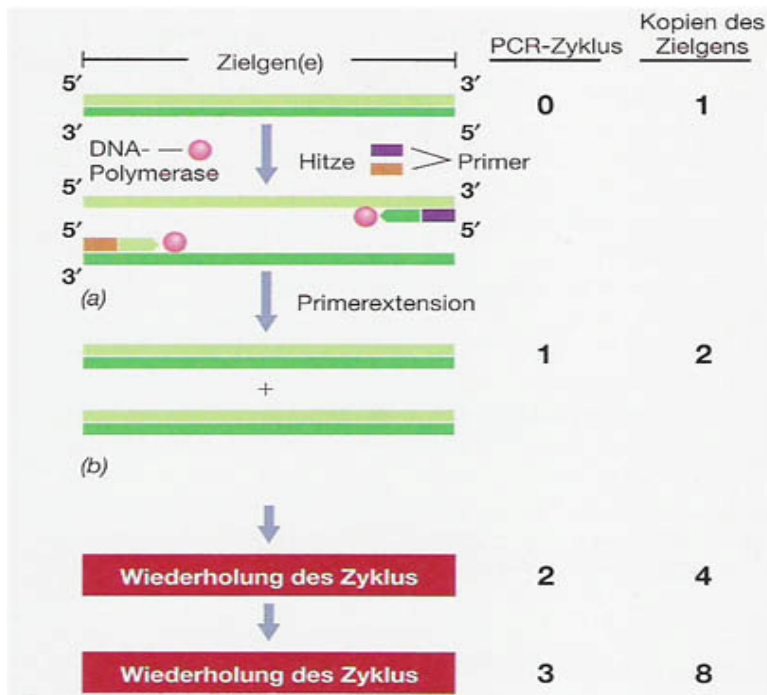
Das System basiert auf der reversiblen Bindung von DNA an eine Silikamembran, unter Anwesenheit chaotropischer Salze. Die Agenzien entziehen den DNA-Molekülen die Hydrathülle und die DNA wird nach Beladen der NucleoSpin[®] Extract II Säulen an deren Silikamembran gebunden. Durch anschließende ethanolische Waschschriffe werden die unerwünschten Verunreinigungen (Agarose, Proteine, Salze und Farbstoffe) entfernt. Abschließend kann die DNA mit ddH_2O oder einem leicht alkalischen Puffer (5 mM Tris-Cl, pH 8,5) eluiert werden.

2.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaktion) ermöglicht eine selektive logarithmische Vermehrung von DNA-Sequenzen. Das Prinzip beruht auf einer Hitzedenaturierung eines zu amplifizierenden DNA- (bzw. RNA/DNA-) Doppelstrangs mit anschließender Anlagerung von Oligonukleotid-Primern (15 - 30 bp) mit definierter Sequenz. Die synthetischen Oligonukleotide binden an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA und leiten die Amplifikation des dazwischen gelegenen Sequenzabschnitts ein. Die Synthese des Gegenstrangs erfolgt vom 3-Ende der Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (GoTaq Polymerase, Promega, Mannheim). Nach einer erneuten Hitzedenaturierung beginnt der Zyklus von neuem. Auf diese Weise erreicht man eine theoretisch exponentielle Amplifikation der durch die Primer flankierten DNA-Sequenz. Limitierender Faktor der PCR-Reaktion sind die beteiligten Komponenten (Taq-Polymerase, dNTP's, Primer).

Zahl der Zyklen	Denaturierung	Annealing	Polymerisation
1	95 °C, 90 s		
39	94 °C, 30 s	50 °C, 30 s	72 °C, 2 min.
1	94 °C, 30 s	50 °C, 30 s	72 °C, 10 min.

Tab. 4 Darstellung eines typischen PCR-Programms



Tab. 16 Übersichtsschema über die Funktionsweise der PCR-Reaktion

Nach Denaturierung des DNA-Templates bei 95 °C in Einzelstränge erfolgt die Hybridisierung der Primer an die komplementären Sequenzabschnitte bei jeweils spezifischen Temperaturen. Nachfolgend synthetisiert die Taq-Polymerase bei ihrem Temperaturoptimum von 72 °C den jeweiligen Komplementärstrang. Das mehrmalige Wiederholen des Zyklus ermöglicht eine logarithmische Vermehrung des Templates

Die PCR-Experimente wurden in einem Thermocycler (Primus 25, MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Der Thermocycler besitzt einen temperierbaren Reaktionsraum, in dem die Proben platziert werden.

PCR-Ansatz (50 µl)

10 µl	5x Green GoTaq® Flexi Puffer
6 µl	MgCl ₂ (25 mM, Promega, Mannheim)
1 µl	dNTPs (10 mM, Carl Roth, Karlsruhe)
0,5 µl	Upstream-Primer (100 pM)
0,5 µl	Downstream-Primer (10 pM)
0,25 µl	(5u/ µl)
30,75 µl	sddH ₂ O
5 µl	Template-DNA

Die PCR-Reaktion wurde meist in 50 µl-Ansätzen durchgeführt. Die verwendeten Komponenten wurden auf Eis pipettiert, vermischt und anschließend kurz an zentrifugiert. Nachdem der PCR-Block auf 95°C vorgeheizt war, konnten die Ansätze durch kurzes Öffnen des Deckels eingesetzt werden.

2.12 Verwendete Oligonukleotid-Primer

Die verwendeten Primer wurden bei MWG-Biotech, Ebersberg zur Herstellung in Auftrag gegeben.

Vektorprimer:

M13 universal	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT- 3'
M13 reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC- 3'
T7-Sequencing	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
3'DNA-AD-Sequencing	5'-AGA TGG TGC ACG ATG CAC AG-3'
3'DNA-BD-Sequencing	5'-TAA GAG TCA CTT TAA AAT TTG TAT-3'

Die Vektor-Primer wurden in der vorliegenden Arbeit zur Überprüfung der Insertlängen verwendet. Des weiteren kamen sie bei den Sequenzierungsreaktionen der Amplifikate zum Einsatz.

γ-Tubulin spezifische Primer:

Vorne 4	5'-CA(AG) AC(ACT) TA(CT) AG(CT) GT5 TT(CT) CC- 3'
Hinten	5'-AC(CT) TCT CC(CT) TG5 AT(AGT) AT(AG) TT- 3'
AB_fw	5'-ATGC GAATTC ACA CTA CGT TAC CCA GG-3'
AB_rw	5'-ATGC GTCGAC CCC CAG TCA ATA AA-3'
AB+_fw	5'-ATGC GAATTC ACA CTA CGT TAC CCA GG-3'
AB+_rw	5'-ATGC GTCGAC CTG GAC ATA AGG AGA-3'
g-Tub_fw	5'-ATGC GAATTC CAA CAA GGG AAA A-3'
AB_C-Term_rw	5'-ATGC GTCGAC ATA AAC CAT ACG ACC CT-3'

Die degenerierten Primer „Vorne“ und „Hinten“ wurden für die Sequenzuntersuchungen der γ -Tubulin-Teilsequenzbereiche des A- und B-Peptidbereichs verschiedener Organismen verwendet. Die Primer AB_fw, AB_rw, AB+_fw, AB+_rw, γ -Tub_fw und AB_C-Term_rw wurden für die Konstruktion der Köderplasmide AB, AB+, AB_{C-Term} und γ -Tub verwendet, welche im Y2H-System eingesetzt wurden.

2.13 Erstellung einer c-DNA Bibliothek

Für die Herstellung einer c-DNA Bibliothek für die spätere Verwendung im Y2H-System wurde gRNA aus einer drei Tage alten BY2-Kultur benutzt. Die Kultur wurde in 2,4-D haltigem LS-Medium angezogen, um zum Zeitpunkt der Extraktion eine hohe Teilungsaktivität der Zellen zu garantieren und somit eine hohe Repräsentanz der in diesem Stadium vorkommenden Sequenzen zu erhalten.

Die Herstellung der c-DNA Bibliothek basiert auf der SMART (Switching Mechanism at 5' end RNA Transcript) Technologie nach ZHU et al. (2001). Hierbei erfolgt zunächst die Erststrangsynthese mit Hilfe der MMLV-Reversen Transkriptase unter Verwendung des CDS III Oligo(dT) Primers und des BD Smart IIITM Primers. Der CDS III Oligo(dT) Primer hybridisiert zunächst am poly(A)-Schwanz am 3'Ende der RNA und die MMLV-Reverse Transkriptase beginnt mit der Synthese des DNA/RNA-Hybridstrangs. Am Ende angelangt hängt sie zusätzliche Nukleotide an das c-DNA-3'Ende an, bevorzugt Desoxycytidin. Dies macht sich das System zunutze. Der BD Smart IIITM Primer besitzt eine Oligo(dG)-Sequenz am 3'Ende und hybridisiert an den Poly-(C)-Schwanz. Anschließend wechselt die MMLV-Reverse Transkriptase das Template und komplettiert die Erweiterung der c-DNA. In der folgenden Zweitstrangsynthese bieten die Sequenzenden komplementäre Enden als universelle Bindestelle für die Primer 3'PCR und 5'PCR (MATCHMAKERTM Library Construction & Screening Kits User Manual 2006)

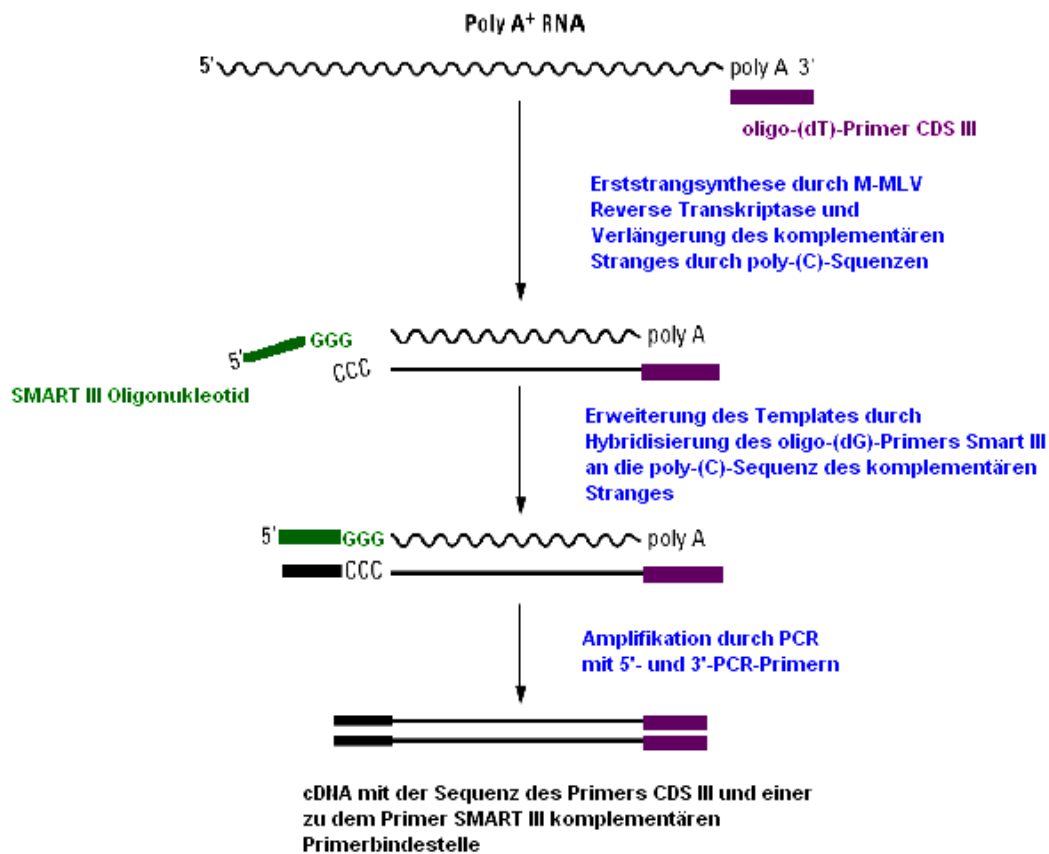


Abb.17 Synthese der ds cDNA mittels BD SMART™ Technologie (Switching Mechanism at 5' end RNA Transkript), (verändert nach MATCHMAKER™ Library Construction & Screening Kid, User Manual 2006)

2.13.1 Primer für die cDNA-Bibliothek Synthese

Die Oligonukleotidprimer, die zum Erstellen der cDNA-Bibliothek zum Einsatz kamen, entstammen dem MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 und wurden bei Bedarf von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, zur Neusynthese in Auftrag gegeben.

Erststrangsynthese:

BD Smart III™ 5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ATG
GCC GGG-3'

CDS III Oligo(dT) 5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG TTT TTT
TTT TTT TTT TTT TTT (AGC) (AGCT)-3'

Zweitstrangsynthese:

5'PCR	5'-TTC CAC CCA AGC AGT GGT ATC AAC GCA GAG TGG-3'
3'PCR	5'-GTA TCG ATG CCC ACC CTC TAG AGG CCG AGG CGG CCG ACA-3'

Das Vorhandensein der SMART III und CDS III- Sequenzen ermöglicht später bei der Transformation eine homologe Rekombination der cDNA mit dem pGADT₇-Rec-Vektor innerhalb der Hefezellen.

2.13.2 Erststrangsynthese**Reaktionsansatz:**

1-2 µl	gRNA (1-2 µg)
1 µl	Primer CDS III (10 µM)
X µl	sddH ₂ O (ad 4 µl)

Der Reaktionsansatz wurde in einem PCR-Reagiergefäß gemischt und kurz anzentrifugiert. Es folgte eine Inkubation für 2 Min. bei 72 °C und anschließend eine Kühlung auf Eis für 2 Min.. Anschließend wurden folgende Komponenten hinzugegeben:

2 µl	Transkriptasepuffer (5x)
1 µl	DDT (20mM)
1 µl	dNTPs (10mM)
1 µl	Reverse Transkriptase (200u/µl, Promega, Mannheim)

Nach erneutem Durchmischen und kurzer Abzentrifugation wurde der Ansatz in einem Wasserbad für 10 Min. bei 42 °C inkubiert. Nachfolgend wurde

1µl	Primer SMART III (10µl)
-----	-------------------------

hinzupipettiert und nach Mischen und kurzem Zentrifugieren für 1 Std. bei 42 °C inkubiert, ehe die Reaktion bei 75 °C für 10Min. abgestoppt wurde. Dieser

Inkubationsschritt wurde in einem Thermocycler (Primus Thermocycler, MWG-Biotech GmbH, Ebersberg) durchgeführt.

2.13.3 Zweitstrangsyntese

Die Synthese erfolgte mittels PCR. Verwendet wurde dazu der Extensor Hi-Fidelity PCR Enzyme Mix von ABgene (Hamburg).

Reaktionsansatz:

In einem PCR-Reagiergefäß wurden

10 µl	Extensor-Puffer
1 µl	Hi-Fidelity PCR Enzym-Mix (5u/µl)
10 µl	MgCl ₂
20µl	20 µl dNTPs (10mM)
2µl	Primer 3' PCR (10µM)
2µl	Primer 5' PCR (10µM)
2 µl	c-DNA-Erststrang
53 µl	sddH ₂ O

pipettiert, gemischt, kurz abzentrifugiert und in einem Thermocycler mit dem Programm zur Zweitstrangsynthese amplifiziert.

Zahl der Zyklen	Denaturierung	Annealing	Polymerisation
1	95 °C, 1Min.		
25	95 °C, 15sec.	68 °C, 6 min.	

Tab. 5 PCR-Programm zur Zweitstrangsynthese

Im Anschluß wurde die cDNA auf einem Agarosegel überprüft, die Anfärbung erfolgte hierbei auf Grund der sensibleren Detektion mit SYBRTMGold. Der komplette Ansatz

wurde mittels NucleoSpin® ExtractII Kit (Macherey und Nagel, Düren) aufgereinigt für weitere Versuche bei -20 °C aufbewahrt.

2.14 Nachweis von Protein-Interaktionen mittels Y2H-System

Die Ausbildung zellulärer Strukturen wie dem Cytoskelett basiert, wie fast alle essentiellen biologischen Prozesse, auf komplexen, spezifischen Interaktionen zwischen Proteinen (CHIEN 1991; VAN CRIEKINGE und BEYAERT 1999). Durch den Versuch Protein-Wechselwirkungen aufzuklären, kam es zur Entwicklung verschiedener chemischer und biologischer Methoden. Von FIELDS und SONG wurde das Yeast two-hybrid System etabliert. Es bietet neben relativ gerinem technischen Aufwand die Möglichkeit, Proteininteraktionen *in vivo* auf genetischer Basis nachzuweisen. Wegen der Detektion von Interaktionen *in vivo* in einem eukaryotischen Organismus besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Proteine posttranslationale Modifikationen tragen und in ihrer natürlichen Konformation vorliegen. Somit kann diese Methode den hohen Ansprüchen hinsichtlich Sensitivität und Genauigkeit gerecht (FIELDS 1993, MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual 1999, VAN CRIEKINGE & BEYAERT 1999).

Das Prinzip der Yeast Two-Hybrid Methode beruht auf der funktionellen Rekonstruktion modular strukturierter, eukaryotischer Transkriptionsfaktoren. Diese bestehen aus mindestens zwei strukturell und funktionell distinkten Polypeptid-Domänen. Der N-terminalen Domäne, die an eine upstream-Aktivatorsequenz (UAS, Upstream Activating Sequence) bindet und somit die Lokalisation des Transkriptionsfaktors nahe des zu transkribierenden Reportergens im Zellkern bewirkt, sowie einer C-terminalen Aktivierungsdomäne, welche mit dem basalen Transkriptionsapparat interagiert und die Transkription auslöst (CHIEN *et al.* 1991, FIELDS und SONG 1989; FIELDS 1993; LOTTSPREICH & ENGELS 2006). Das natürliche Protein enthält beide Domänen. Sie werden jedoch getrennt in unterschiedliche Expressionsvektoren ligiert. Diese Tatsache, dass die Bindedomäne ohne Kontakt zur Aktivierungsdomäne ungeeignet ist, die Transkription zu initiieren und umgekehrt, nutzt die Yeast Two-Hybrid Methode aus (VAN CRIEKINGE und BEYAERT 1999; FIELDS und SONG 1989). Infolge dessen fusioniert man jedes Modul des Transkriptionsfaktors mit einem Protein. Die Kopplung der Domänen durch

eine nicht-kovalente Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen stellt die Funktionsfähigkeit des Transkriptionsfaktors wieder her (FIELDS 1993). Um mögliche Interaktionen zwischen zwei Proteinen zu verifizieren, fusioniert man die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors mit einem Köder-Protein. Die Aktivierungsdomäne mit dem Beute-Protein fusioniert. Wenn man bisher unbekannte Interaktionspartner eines bekannten Köder-Proteins ermitteln möchte, fusioniert man die Aktivierungsdomäne mit einer cDNA-Bibliothek, die möglichst alle Sequenzen repräsentieren soll, die zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung in einem bestimmten Gewebe exprimiert werden.

Das Reportergen stellt mit regulatorischen Sequenzen für die basale Transkription eine weitere notwendige Komponente des Systems dar. Die Promotorregion dieses Gens muss die DNA-Sequenz enthalten, die mit der DNA-Bindedomäne interagiert. Die durch die Protein-Protein-Wechselwirkung bedingte Expression muss phänotypisch leicht messbar sein (LOTTSPEICH & ENGELS 2006), sei es durch die Rate enzymatischer Aktivität oder durch Wachstum auf bestimmten Selektivmedien (ENDO *et al.* 2002).

Y2H-Systeme basieren neben dem bakteriellen LexA häufig auf dem GAL4-Protein der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Um eine Interferenz des endogenen GAL4 zu verhindern, kommen im GAL4 Two-Hybrid System nur Hefestämme zum Einsatz, welchen das GAL4-Protein fehlt (FIELDS & SONG 1989, VAN CRIEKINGE & BEYAERT 1999). Die Reportergenaktivierung kann nun nur durch das künstlich eingeführte GAL4 ausgelöst werden. MEL1 ist ein Mitglied der GAL-Genfamilie und kann alternativ zu lacZ als Reportergen zum Einsatz kommen (AHO *et al.* 1997). Durch Binden von GAL4 an die MEL1 UAS bzw. an die lacZ UAS, werden die Genprodukte (α - bzw. β -Galactosidase) exprimiert und sekretiert. Sie katalysieren eine Hydrolyse von X- α -Gal bzw. X- β -Gal. Dadurch kann über die Intensität der Blaufärbung nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Auswertung erfolgen. Häufig werden Gene, die an der Aminosäure-Biosynthese beteiligt sind (HIS3, ADE2) zusätzlich als Reportergene verwendet. Es wird dadurch eine Wachstumsselektion auf Minimalnährmedien ermöglicht, was vor allem hinsichtlich des Screenings einer cDNA-Bibliothek von Vorteil ist.

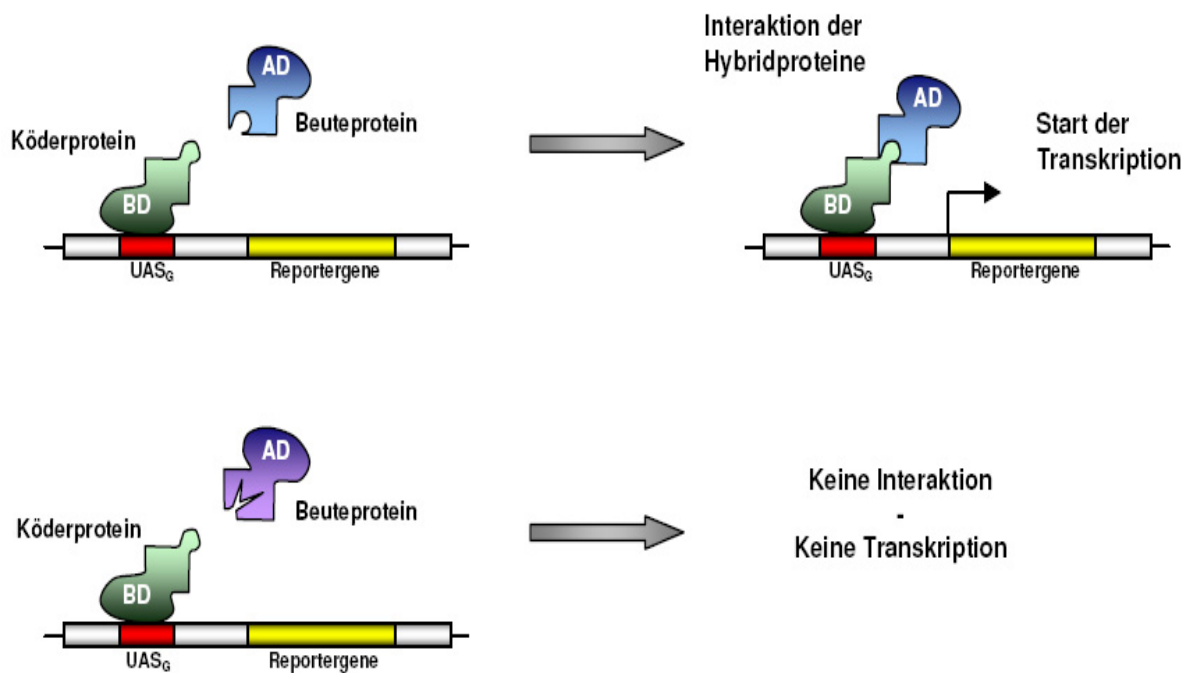


Abb.18 Transkription im Y2H-System. Unter Anwendung der Y2H-Technik werden Interaktionen zwischen zwei Proteinen mittels Transkription von Reportergenen detektiert. Erfolgt eine Interaktion zwischen dem fusionierten Protein X der Bindedomäne und dem fusionierten Protein Y in der Aktivierungsdomäne, kommt es zu einer Kopplung dieser Domänen. Die Funktionsfähigkeit des Transkriptionsfaktors wird somit wieder hergestellt, und es kommt zur Transkription der Reporterogene.

2.15 Verwendete Vektoren

2.15.1 Klonierungsvektor

Der pGEM®-T Vektor (Promega, Mannheim) ist speziell zur Klonierung von PCR-Produkten konstruiert worden. Bei diesem System macht man sich die Eigenschaft der Taq-Polymerase zunutze, welche an den 3`Enden der PCR-Produkte unspezifisch Adenin-Überhänge produziert. Der pGEM®-T Vektor weist eine dazu passende Modifikation eines komplementären 3`terminalen Thymin-Überhangs auf. Das PCR-Produkt kann somit über eine TA-Klonierung in den Vektor eingebracht werden.

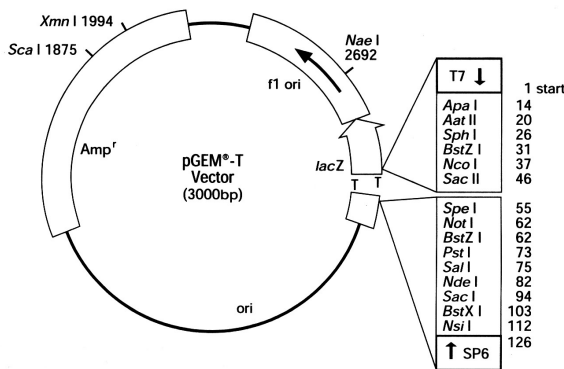


Abb. 19 Der verwendete pGEM[®]-T Vektor: Der 3kb große Vektor besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen, das den Bakterien, die den Vektor enthalten, erlauben auf Ampicillin-haltigen Medium zu wachsen. Die Ligation erfolgt in die für β -Galctosidase kodierenden Bereich (*lacZ*) und ermöglicht die Überprüfung über Blau-Weiss-Selektion. Der Replikationsursprung (*ori*) ist ein spezifischer Bereich, der für die selbständige Replikation notwendig ist.

2.15.2 Vektoren des Yeast-Two-Hybrid-System

Alle verwendeten Vektoren wurden im Rahmen des MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 Kits von BD Biosciences Clontech (Heidelberg) bezogen. Der von Clontech zur homologen Rekombination produzierte pGADT7-Rec-Vektors wurde freundlicherweise von Alexander Rotthues (TU Carola-Wilhelmina, Institut für Genetik, Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Die Vektoren wurden dauerhaft bei -20°C gelagert. Die Vektoren verfügen alle über entsprechende Replikationsstartpunkte (origin of replication – *ori*), welche zur autonomen Vermehrung in *E.coli* (pUC *ori*) und *Saccharomyces cerevisiae* (2μ *ori*) dienen. Sie besitzen zur Selektion in Bakterien Gene für eine Antibiotikaresistenz. In Hefen erfolgt die Selektion über Gene des Aminosäurestoffwechsels, die ihnen das Wachstum auf entsprechenden Mangelmedium ermöglicht. Die Expression der Hybridmoleküle wird in der Hefe über den konstitutiven Promoter ADH1 gesteuert.

2.15.2.1 GAL4-Klonierungsvektoren

Der Bindedomänenvektor pGBDT₇ wird verwendet, um ein gewünschtes Köderprotein als Hybridprotein mit der GAL4 DNA-Bindedomäne (DNA-BD) zu exprimieren. Hierfür wird das einklonierte Gen mit den Aminosäuren 1-147 der GAL4 DNA-BD fusioniert. Wie alle Bindedomänenvektoren verfügt auch der pGBKT7 über eine Resistenz für Kanamycin für die Selektion in *E.coli* und das TRP1 Gen für die Nahrungsselektion in *S.cerevisiae*.

Für die vorliegende Arbeit wurden in den pGBKT₇-Vektor vier unterschiedliche Inserts des γ -Tubulin-A/B-Peptidbereichs (AB, AB+, AB_{C-Term} und γ -Tub.) aus BY2-Zellen (*Nicotiana tabacum*) inseriert.

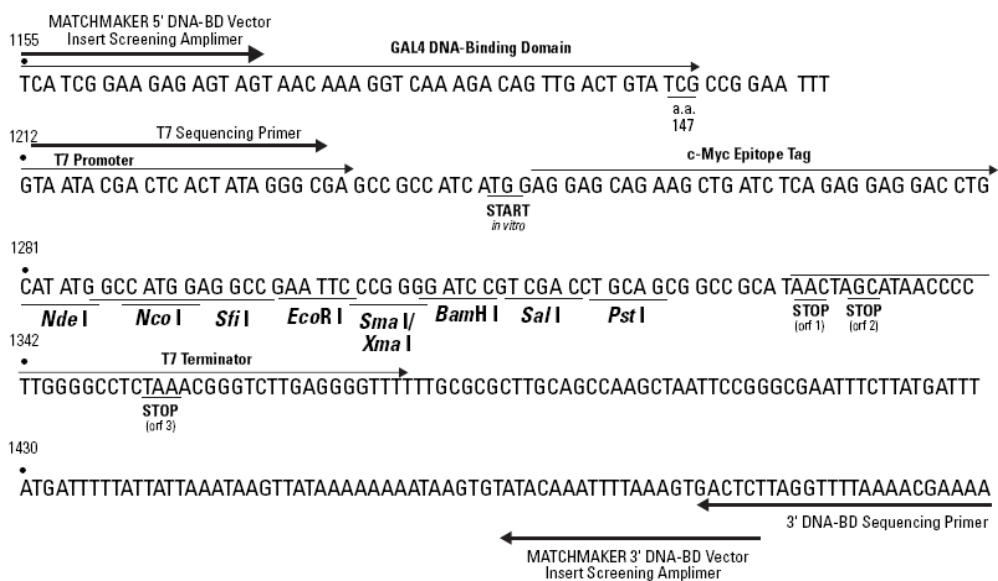
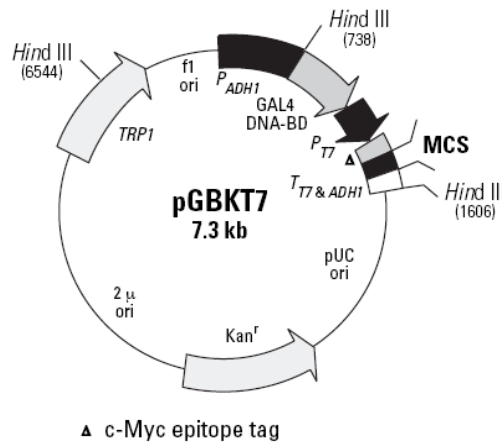
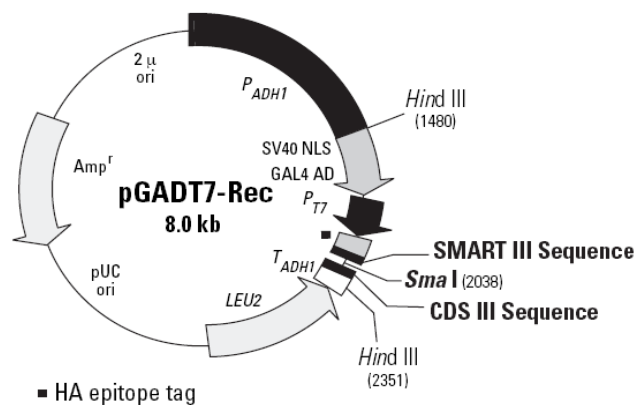
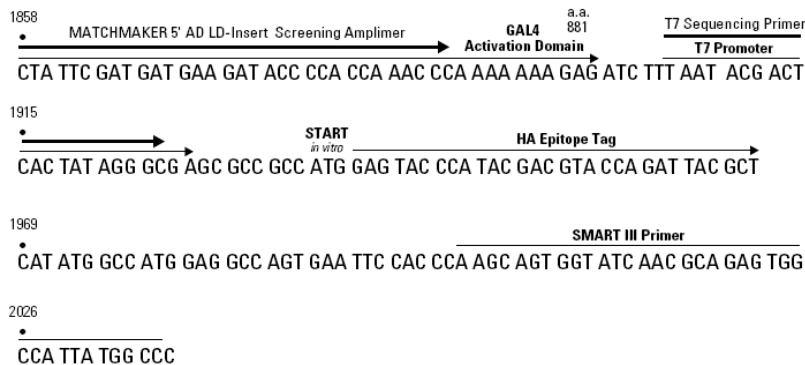


Abb. 20 Restinktionskarte der Multiple Cloning Site des pGBKT7 Bindedomänenvektors

Der Aktivierungsdomänenvektor pGADT7-Rec dient der Expression von Beuteproteinen, welche mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert sind. Die Fusionierung erfolgt durch homologe Rekombination. Zur Verlagerung der mit ihr fusionierten Sequenzen in den Zellkern der Hefen besitzt er das Signal SV 40 NLS (nuclear lokalisation signal). Der Vektor verfügt wie alle Aktivierungsdomänenvektoren über ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion in *E.coli* und das LEU2 Gen für die Nahrungsselektion in *S.cerevisiae*.



SMART III™ terminus



CDS III terminus

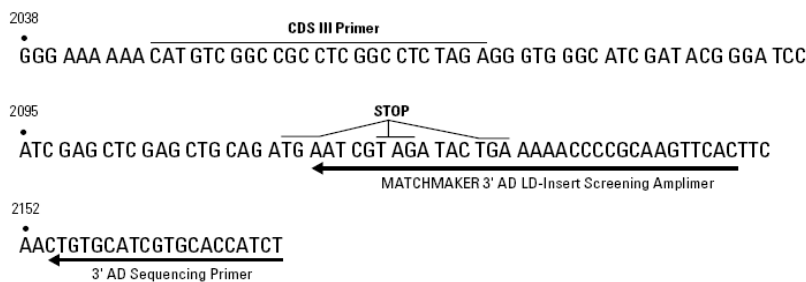


Abb. 21 Restriktionskarte der Multiple Cloning Site des pGADT7-Rec Aktivierungsdomänenvektors

Prinzip des pGADT7-Rec Vektors:

Der pGADT7-Rec Vektor wurde konstruiert, um in der Hefe GAL4 DNA-AD/cDNA Bibliotheken durch homologe Rekombination zu erstellen. Für die Generierung der DNA-AD Hybridproteine, wurde die Hefe mit dem linearisierten pGADT7-Rec Vektor und doppelsträngiger cDNA aus der BY-2 Zellkultur kotransformiert. Der pGADT7-Rec-Vektor wurde hierfür zunächst mit dem Restriktionsenzym *Sma I* linearisiert. Die cDNA weist auf Grund der für die Erststrangsynthese verwendeten Primer (CDS III und BD SMART III) an ihren Enden Sequenzen auf, die der homologen Rekombination dienen, da der pGADT7-Rec Vektor diese auch auf beiden Seiten der Schnittstelle durch *Sma I* aufweist. Nach erfolgter homologer Rekombination, die durch hefeeigene Reparaturenzyme bewerkstelligt wird, erhält der Vektor seine zur Replikation und Transkription notwendige ringförmige Struktur. Es kommt zur Expression der inserierten cDNA-Sequenz als GAL4 DNA-AD Hybridprotein.

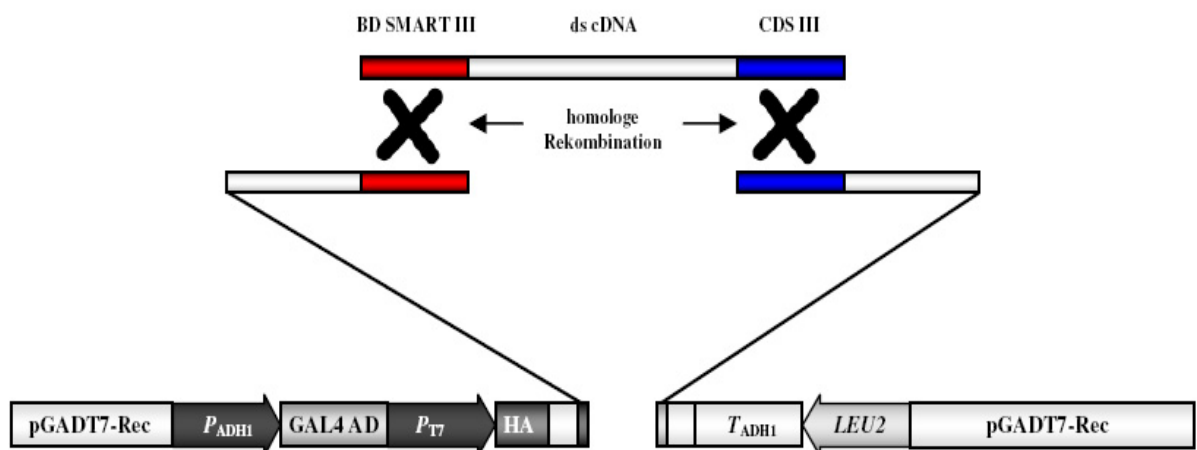


Abb. 22 Prinzip der Homologen Rekombination der c-DNA mit dem pGADT7-Rec-Vektor:

Die cDNA und der *Sma I* linearisierte pGADT7-Rec Vektor weisen zur homologen Rekombination befähigte Enden auf. In der Hefe wird diese durch hefeeigene Reparaturenzyme bewerkstelligt.

2.15.2.2 Kontrollvektoren

In sämtlichen Kontrollansätzen wurde der Aktivierungsdomänenvektor pGADT₇-T eingesetzt. Er kodiert für ein Hybridprotein, das sich aus der GAL4 DNA-AD und dem T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) zusammensetzt. Die Interaktion des Vektors mit dem Tumorsupressorgen p53 ist experimentell bestätigt (LI & FIELDS 1993).

Positivkontrolle:

Für die Positivkontrolle wurde der Aktivierungsdomänenvektor pGADT₇-T daher in Kombination mit dem pGBKT₇-53 eingesetzt. Das Plasmid kodiert für die mit der GAL4-Bindedomäne fusionierten Aminosäuren 72-390 des Tumorsupressorproteins p53. Das GAL4-BD-p53-Hybridplasmid bedingt keine autonome Aktivierung der Transkription (LI & FIELDS 1993). Analog zu den übrigen BD-Vektoren trägt das 8,3 kb umfassende Plasmid das Nahrungsreportergen TRP1 zur Selektion in *S. cerevisiae* und ein Kanamycinresistenzgen zur Selektion in *E. coli*.

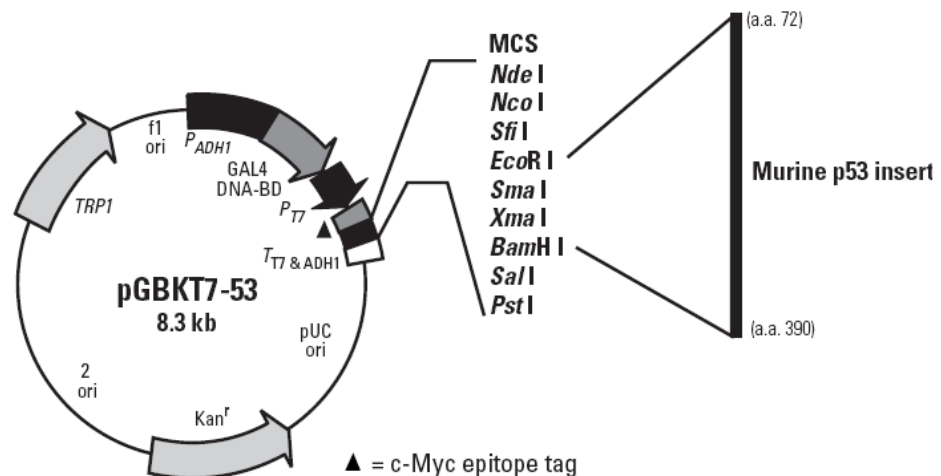


Abb.23 Der Positivkontrollvektor pGBKT₇-53:

Der für das Protein p53 kodierende Vektor pGBKT₇-53 wurde in Verbindung mit dem pGADT₇-T-Vektors als Positivkontrolle verwendet. Die Interaktion des T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) mit dem Protein p53 bedingt die Transkription der GAL4 induzierten Reportergene (verändert nach MATCHMAKER™ Library Construction & Screening Kits User Manual, 2006)

Negativkontrolle:

Für die Negativkontrolle wurde der pGBKT₇-Lam-Vektor in Kombination mit dem pGADT₇-T-Vektor verwendet. Der pGBKT₇-Lam-Vektor kodiert für ein Hybridprotein aus der GAL4-BD und den Aminosäuren des menschlichen Lamin C-Proteins. Lamin C bildet keine Komplexe und interagiert nicht mit den meisten anderen Proteinen (YE & WORMAN 1995).

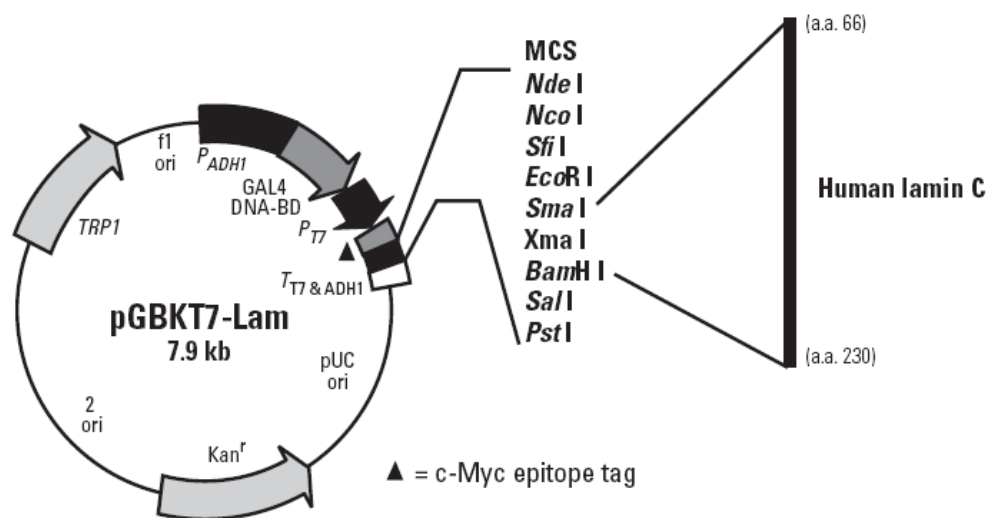


Abb. 24 Der Negativkontrollvektor pGBKT₇-Lam:

Die Interaktionsträgheit des menschlichen Lamin C-Proteins, das als Hybridprotein durch den pGBKT₇-Lam-Vektor exprimiert wurde, bildet die Voraussetzung für dessen Verwendung als Negativkontrolle in Kombination mit dem pGADT₇-T-Vektor (verändert nach MATCHMAKER™ Library Construction & Screening Kits User Manual, 2006).

2.15.2.3 Referenzkontroll-Vektor

Der Referenzkontroll-Vektor pCL1 codiert für die Volllänge des wildtypischen GAL4-Proteins und aktiviert somit alle unter der Kontrolle der GAL4-UAS befindlichen Reportergene. Der Vektor findet als Positivkontrolle der Nahrungsreportersysteme Verwendung. Außerdem dient er als Referenz zu der durch die Expression des MEL1

Reportergens und die dadurch bedingte Spaltung von X- α -Gal hervorgerufenen Blaufärbung der Hefezellen in den Ansätzen des Mating und der sequentiellen Transformation.

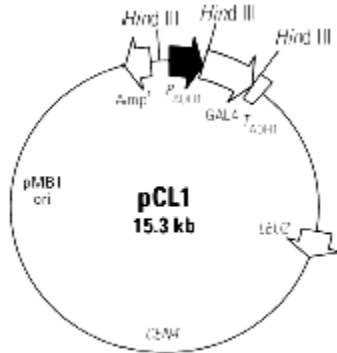


Abb.25 Der Vektor pCL1:

Er kodiert für die Volllänge des wildtypischen GAL4-Proteins und dient als Kontroll- und Referenzvektor der Reportergene.

2.16 Konstruktion der Y2H-Köderplasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der pGBKT₇-Vektor mit vier unterschiedlichen Inserts des γ -Tubulin-A/B-Peptidbereichs (AB, AB⁺, AB_{C-Term.} und γ -Tub) aus BY2-Zellen fusioniert, welche anschließend im Y2H-System verwendet wurden. Die in den Vektor ligierten Sequenzen unterscheiden sich in der Länge der den γ -Tubulin-A/B-Peptidbereich flankierenden Bereiche. Die Sequenz AB codiert für die γ -Tubulin-Peptidbereiche A und B, die dazwischen liegende Helix und partiell für die C-terminal folgende Faltblattstruktur. AB⁺ umfasst die flankierenden Faltblattstrukturen vollständig. AB_{C-Term.} codiert ausgehend von der Helix und der Faltblattstruktur N-terminal zum γ -Tubulin-A/B-Peptidbereich bis zum C-Terminus. γ -Tub codiert für die Volllänge des γ -Tubulin-Peptids.

Bezeichnung	Lokalisation innerhalb des γ -Tubulin-Gens	Länge der Sequenz
γ -Tub	76-1608 bp	1532 bp
AB	824-1061 bp	237 bp
AB+	761-1096 bp	336 bp
AB _{C-term.}	761-1608 bp	848 bp

Tab.6 Übersicht über die zur Herstellung vorgesehenen γ -Tubulin-Ködersequenzen

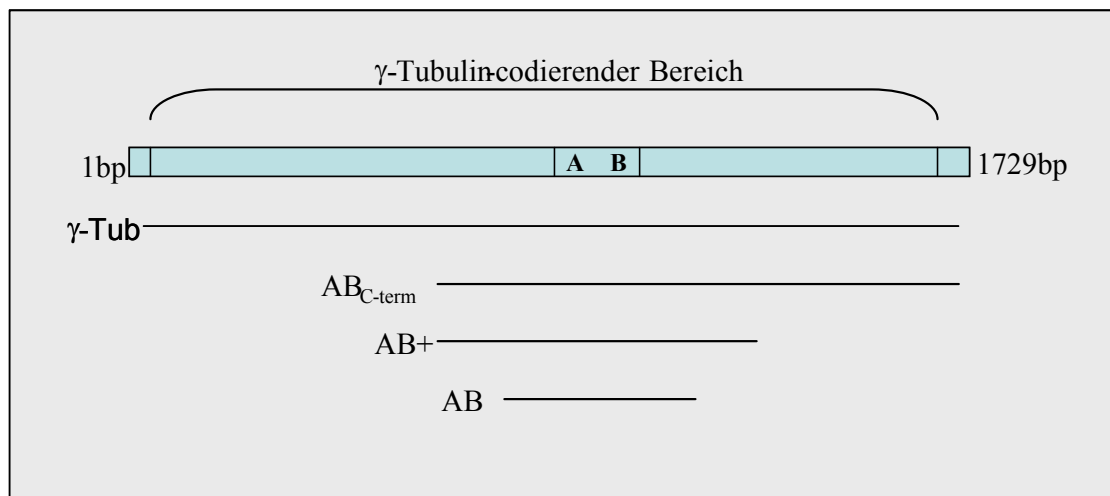


Abb.26 Übersicht über die Lage der zur Herstellung vorgesehenen γ -Tubulin-Ködersequenzen

Zur Herstellung der Köderplasmide wurden der pGBKT7 Bindedomänenvektor und die jeweiligen Inserts mit zwei verschiedenen Enzymen geschnitten, die überhängende Enden produzierten. Dies ermöglichte eine gerichtete Ligation. Die einzelnen Inserts und der pGBKT7 Bindedomänenvektor wurden mit den Enzymen *Eco* RI und *Sal* I geschnitten. Die γ -Tubulin-Sequenzen wurden zuvor nach ihrer Amplifizierung und Aufreinigung im pGEM®-T Vektor (Promega, Mannheim) zwischenkloniert, um beim Enzymverdau genügend flankierende Nukleotide an den Schnittstellen zu garantieren. Da die Pufferbedingungen der Restriktionsendonukleasen variieren, wurde jeweils ein Einzelverdau angesetzt und dieser im Anschluss aufgereinigt. Es wurde darauf geachtet, zunächst mit *Sal* I und anschließend mit *Eco* RI zu schneiden, da *Sal* I für seine volle Aktivität mehr Nukleotide neben seiner Schnittstelle benötigt. Diese würden durch einen vorgeschalteten Verdau mit *Eco* RI wegfallen.

2.17 Restriktion

Restriktionsendonukleasen erkennen kurze Nucleotidsequenzen und spalten daraufhin die Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge mittels Hydrolyse. Man unterscheidet drei verschiedene Typen von Restriktionsendonukleasen (Typ I, II, III). Die verwendeten Restriktionsenzyme vom Typ II sind Endonukleasen, die doppelsträngige DNA an sequenzspezifischen Stellen schneiden. Die Enzyme haben eine palindromische Erkennungssequenz von meist 4 – 8 Nukleotiden, welche auch die Schnittstelle festlegen. In der vorliegenden Arbeit wurden sie für die Restriktion der zirkulären pDNA verwendet. Die Typ II Restriktionsendonukleasen unterscheiden sich deutlich von Typ I und Typ III, da ihre Schnittstelle innerhalb der Erkennungssequenz liegt und sie für ihre enzymatische Aktivität kein ATP benötigen.

Enzyme	Schnittstelle
<i>Bam</i> HI (MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)	G GATCC
<i>Eco</i> RI (MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)	G AATTC
<i>Sma</i> I (MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)	GAT ATC
<i>Hae</i> III (MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)	A AGCTT
<i>Sal</i> I (AGS, Heidelberg)	G TCGAC
<i>Xho</i> I (MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)	C TCGAG

Tab. 7 Restriktionsendonukleasen und ihre spezifische Erkennungssequenz

Die vertikalen Markierungen zeigen die Schnittstellen innerhalb der Sequenz

Bei einem Restriktionsverdau sollte das Reaktionsvolumen so gering wie möglich gehalten werden (SAMBROOK et al. 1989). Das eingesetzte Enzymvolumen darf dabei 1/10 des Gesamtvolumens nicht übersteigen, da sonst das in der Enzymlösung enthaltene Glycerol die Reaktion hemmt. Der Restriktionsansatz wurde für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert, doch erfolgte vorzugsweise über Nacht. Anschließend konnte der Ansatz elektrophoretisch untersucht werden oder nach einer Hitzedenaturierung bei 70 °C für 10 min. für weitere Untersuchungen im Kühlschrank über mehrere Tage aufbewahrt werden.

Einige Restriktionsenzyme benötigten DTT (Dithiothreitol, Serva GmbH, Heidelberg) um ihre volle Aktivität erreichen zu können. War dies der Fall, wurde ein frisch aufgetautes Aliquot der Stammlösung verwendet, da die durch mehrere Tau-/Gefrierzyklen einhergehende Oxidation des DTT und die dabei entstehenden Produkte enzymhemmende Eigenschaften besitzen.

Reaktionsansatz:	1 µg	DNA
(20 µl-Ansatz)	1/10 Vol.	10x Restriktionspuffer (je nach Enzym und Herstellerangabe)
	5 - 10 U	Restriktionsenzym
Für einige Enzyme wurde weiterhin benötigt:		
	1mM	DTT
	0,01 mg/ml	BSA

2.18 Ligation

Um γ -Tubulin-Teilsequenzbereiche mittels Bakterien vermehren zu können, mussten diese zunächst in geeignete Vektor-Plasmide ligiert werden. Hierfür wurde das pGEM[®]-T Vektor-System (Promega, Mannheim) verwendet. Eine T4-Ligase katalysiert hier die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den Thymidinüberhängen am 3'-Ende des mit *EcoR* V linearisierten Vektor-Plasmids und den Adenosinüberhängen des PCR-Produktes.

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

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

Bsp.:
$$\frac{(50 \text{ ng} \times 0,5 \text{ kb})}{3 \text{ kb}} \times 3/1 = 25 \text{ ng}$$

Ligationsansatz pGEM[®]-T Vektor:

5 µl	2x Ligations-Puffer
1 µl	pGEM [®] -T Vektor (50 ng)
x µl	PCR-Produkt
1 µl	Ligase (3u/µl)
auf 10 µl	mit sdd H ₂ O auffüllen

Ligationsansatz in Y2H-Vektoren:

X µl	Insert
1 µl	Ligase (3u/µl)
1 µl	10x Puffer
X µl	Vektor
Auf 10 µl	mit sdd H ₂ O auffüllen

Der zusammenpipettierte Ligationsansatz wurde gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert, bevor er für nachfolgende Transformationen zum Einsatz kam.

2.19 Transformation von Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA musste diese von Bakterien aufgenommen werden (Transformation). Das hier verwendete Verfahren (SAMBROOK et al. 1989) basiert auf der CaCl₂-vermittelten Aufnahme von Plasmid-DNA durch Bakterien.

2.19.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Methode ermöglicht es, eine Transformationsrate von 5×10^6 - 2×10^7 Kolonien pro µg DNA zu erreichen (SAMBROOK et al. 1989). Von einer über Nacht angezogenen Bakterien-Plattenkolonie (XL1-Blue MRF') wurde etwas Material in 100 ml SOB-Medium überimpft, in einem Schüttelwasserbad bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert und für 10 min. auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min. bei 4 °C und 7000x g (Kühlzentrifuge Beckman J2-21, Rotor JA 14) in einem 250 ml Zentrifugengefäß. Anschließend wurde der Überstand gründlich entfernt, dem Bakterienpellet 20 ml eiskaltes TFB-Medium hinzugefügt, resuspendiert, in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt und auf Eis für 45 min. inkubiert. Nach erneuter

Zentrifugation für 10 min. bei 4 °C mit 7000x g (Kühlzentrifuge 202 MK, Rotor 12040, Sigma, Braun, Melsungen) wurde der Überstand abgezogen, das Pellet nach Umdrehen des Zentrifugenröhrchens für 1 min. getrocknet und nachfolgend in 4 ml FSB-Medium resuspendiert und für weitere 30 min. auf Eis inkubiert. Erfolgte die Transformation nicht sofort, konnten die Bakterien über Nacht, allerdings mit leichtem Verlust ihrer Vitalität, auf Eis bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.19.2 Transformation mit anschließender Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion dient zur Überprüfung der erfolgreich transformierten Bakterien. Der Vektor pGEM[®]-T (Promega, Mannheim) besitzt neben einem Ampicillinresistenz-Gen ein lacZ-Gen, welches einen Teil des Enzyms β -Galactosidase kodiert. X-Gal, eine farblose Substanz, besteht aus einer chromophoren Gruppe, die β -1,4-glykosidisch an Galaktose gebunden ist. In Anwesenheit von β -Galactosidase erfolgt eine Abspaltung der chromophoren Gruppe, und über den chemischen Induktor IPTG eine Blaufärbung. Wird durch Insertion von Fremd-DNA das β -Galactosidase-Gen unterbrochen, kann diese Reaktion nicht stattfinden. Nach Bebrütung der Bakterien über Nacht erkennt man positiv transformierte Bakterien mit DNA-Insert an ihren normalgefärbten weißen Kolonien.

Durchführung:

Zunächst wurden auf LB_{amp}-Selektivplatten je 4 μ l IPTG (200 mg/ml) und 40 μ l X-Gal (20 mg/ml DMF) mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Die Platten kamen anschließend für ca. 2-3 h in den Wärmeschrank (37 °C), um die Flüssigkeiten in das Medium einziehen zu lassen.

Für die Transformation wurden 3 μ l des Ligationsansatzes mit 50 μ l kompetent gemachter Bakterien (XL1-Blue MRF') in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert, vorsichtig vermischt und für 20 min. auf Eis gestellt. Nach einem anschließendem Hitzeschock für 45 sek. bei 42 °C, der die m-RNA-Produktion und dadurch die Vitalität der Bakterien erhöht, wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt. Nach 2 min. erfolgte eine Zugabe von 950 μ l SOC-Medium und eine Inkubation für 1,5 h bei 37 °C in einem

Schüttelwasserbad (150rpm). Danach wurden für die Blau-Weiß-Selektion 100 - 200 μ l mit einem Drigaski-Spatel ausplattiert und über Nacht bebrütet.

2.20 Herstellung chemisch kompetenter Hefen für die Transformation

Die Transformation der Hefezellen erfolgte nach der Lithium/Acetat Methode (ITO 1983; GIETZ et al. 1992). Hierbei werden die höchsten Transformationsraten bei Verwendung von bis zur stationären Phase in YPDA-Medium gewachsenen Hefezellen erzielt. Diese werden zusammen mit Lithium/Acetat, der Plasmid-DNA, sowie einzelsträngiger Träger-DNA (Heringhoden-DNA) in Anwesenheit von Polyethylenglykol (PEG) inkubiert. Nach einem Hitzeschock in Anwesenheit von Dimethylsulfoxid (DMSO) werden die Zellen veranlasst, größere Mengen an Plasmid-DNA aufzunehmen (HILL et al. 1991). Man geht davon aus, dass die einzelsträngige Träger-DNA Bindungsstellen der Zellwand bzw. Zellmembran der Hefe sättigt und so die spezifische Absorption doppelsträngiger DNA fördert (SCHIESTL 1993). Das negativ geladene PEG bewirkt Änderungen in den Membraneigenschaften und deponiert die Vektor- und Träger-DNA auf den Zellen (ITO 1983; SCHIESTL 1993). Aufgenommen werden kann sowohl zirkuläre als auch linearisierte DNA, wobei die Aufnahmeeffizienz linearisierter DNA geringer ist (ITO 1983).

Benötigte Lösungen:

10 x TE-Puffer:

0,1 M	Tris-HCl
10 mM	EDTA.

Die Lösung wurde auf pH = 7,5 eingestellt und autoklaviert.

10 x LiAc-Stammlösung:

1 M Lithiumacetat-Lösung wurde mit Essigsäure auf pH = 7,5 eingestellt und autoklaviert.

PEG-Stammlösung (50%)

Die gewünscht Menge PEG wurde in sddH₂O gelöst. Um das Lösen von PEG zu erleichtern, konnte sie auf 50°C erwärmt werden. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

1xTE/1xLiAc-Lösung:

1 ml	10x TE
1 ml	10x LiAc-Stammlösung
8 ml	sddH ₂ O

PEG/LiAc-Lösung:

8 ml	PEG 3400-Stammlösung (50%)
1 ml	10 x TE-Stammlösung
1 ml	10 x LiAc-Stammlösung

Diese Lösung sollte erst unmittelbar vor dem Gebrauch angesetzt werden!

NaCl-Lösung (0,9%):

autoklaviert

Durchführung:

50 ml YPDA-Flüssigmedium wurden mit einigen 2-3mm großen Hefezellen, die nicht älter als drei Wochen waren, angeimpft und bei 30°C 16-18 Stunden im Schüttelwasserbad (GFL 1083, GFL-Labortechnik GmbH, Burgwedel) inkubiert. Die Zellen sollten sich dann in einer stationären Phase des Wachstums befinden und somit die optische Dichte OD₆₀₀ der Zellsuspension größer als 1,5 sein. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mittels Einweg-Küvetten (Carl Roth, Karlsruhe) bei 600nm im Photometer (U1100 Spectrophotometer, Fa. Hitachi, Japan).

Von der Übernachtskultur wurde soviel in 300ml YPDA-Flüssigmedium überführt, dass die OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,3 lag. Die Kultur wurde anschließend bei 30°C und 150 rpm inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5 ± 0,1 erreicht hatte. Lag sie darüber, musste die Zellsuspension mit YPDA-Medium entsprechend verdünnt werden.

300 ml dieser Hefezellkultur wurden bei 1.000 x g und RT für 5 Minuten zentrifugiert (Beckmann JS 21, Krefeld, Rotor JA 14). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 ml sddH₂O resuspendiert. Die Zellkultur wurde bei 1.000 x g und RT für 5 Minuten zentrifugiert (Sigma 202 MK, Winkelrotor 12043), der Überstand verworfen

und das Pellet in 1,5ml frisch angesetzter, steriler 1xTE/1xLiAc-Lösung resuspendiert. Um eine hohe Transformationseffizienz zu gewährleisten, sollte die Transformation der chemisch kompetenten Hefezellen innerhalb einer Stunde nach Resuspendierung in der 1xTE/1xLiAc-Lösung erfolgen (YEAST PROTOCOLS HANDBOOK 2001).

2.20.1 Co-Transformation von Hefen

Für einen Small-Scale Transformationsansatz wurden in einem 1,5 ml Reagiergefäß

	0,1 µg	DNA-BD/Köderplasmid,
bzw.	0,1 µg	AD/Beuteplasmid und die gesamte aufgereinigte cDNA
und	0,1 mg	Träger-DNA

zusammengeführt. Als Träger-DNA wurde Heringssperma-DNA (10 mg/ml, Promega, Mannheim) verwendet, die vor Gebrauch für 20 Min. zwecks Denaturierung gekocht wurde. Anschließend wurde sie bis zu ihrer Verwendung auf Eis gestellt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Um Renaturierungsprozessen entgegenzuwirken, wurde sie vor jedem Gebrauch nach dem Auftauen erneut denaturiert.

Durchführung:

Zum denaturierten Ansatz wurden 100 µl der kompetenten Hefezellen hinzupipettiert und durch Vortexen gemischt (Reax 2000, Fa. Heidolph, Schwabach). Anschließend wurde 600 µl PEG/LiAc-Lösung hinzugegeben und ebenfalls durch Vortexen gemischt. Nach einer Inkubation im Schüttelwasserbad (200rpm) bei 30°C für 30 Minuten wurden jeweils 70 µl DMSO hinzugefügt und die Transformationsansätze durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Vortexen zerstört zu diesem Zeitpunkt die Transformationskompetenz der Hefezellen. Nachfolgend wurden die zu transformierenden Hefezellen für 15 Minuten in einem 42°C warmen Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen, 2 Minuten auf Eis gekühlt und für 5 Sekunden bei 15.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 500µl steriler NaCl-Lösung (0,9%) aufgenommen und das Pellet durch Vortexen vollständig gelöst.

2.20.1.1 Ausplattierung der transformierten Hefen

Die Transformationsansätze wurden auf dem jeweils entsprechenden, stringenten Medium mit einem sterilen Drigalski-Spatel gleichmäßig aufgetragen. Die Platten wurden mit Nescofilm (Carl Roth, Karlsruhe) verschlossen und die Kulturen 4 - 7 Tage in einen Brutschrank (Typ BE80, Memmert Elektronik, Schwabach) bei 30°C inkubiert. Auf dem Selektivnährmedium gewachsene Kolonien wurden mittels eines Replikationsstempels auf Nährmedien der nächst höheren Stringenz überführt und erneut für 4 - 6 Tage bei 30°C kultiviert. Dies erfolgte zur Überprüfung und Bestätigung des Phänotyps potenziell positiver Kolonien. Alternativ wurden die Kolonien in einem entsprechenden Selektivmedium resuspendiert und durch einen Verdünnungsausstrich auf die höher stringenten Medien überimpft.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 30 µl eines Transformationsansatz mit 720 µl NaCl-Lösung (0,9%) um den Faktor 25 verdünnt. Jeweils 3 x 150 µl dieses verdünnten Ansatzes wurden auf den entsprechenden Mangelnährmedien ausgestrichen und ebenfalls bei 30 °C für 4-7 Tage inkubiert.

Medium	Zusammensetzung	Stringenz	Ausplattierungsvolumen
DO	SD -Trp oder SD -Leu	niedrig	50-100 µl
DDO	SD -Trp/-Leu	niedrig	50-100 µl
TDO	SD -Trp/-Leu/-His	mittel	150 µl
QDO	SD -Trp/-Leu/-His/-Ade	hoch	150-200 µl

Tab.8 Auf entsprechenden Mangelnährmedien ausplattiertes Volumen der Transformationsansätze

2.20.1.2 Berechnung der Transformationseffizienz

Zur Berechnung der Transformationseffizienz wurde die Formel aus dem Clontech Yeast Protokoll (clontech Yeast Protocols Handbook) verwendet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{kbE} \times \text{Gesamtvolumen Hefe-NaCl}_2\text{-Lösung } (\mu\text{l})}{V_{\text{ausplattiert}} (\mu\text{l}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Vektormenge } (\mu\text{g})}$$

Die Bestimmung der Anzahl der gescreenten Klone erfolgte durch:

$$\text{Anzahl gescreenter Klone} = \text{kbE}/\mu\text{g DNA} \times \mu\text{g pGADT7-Rec}$$

2.20.2 Mating der Hefen AH 109 und Y 187

Zur Vorbereitung für das Mating wurden im Rahmen eines Small-Scale Transformationsansatzes die Hefezellen des Stamms Y 187 mit dem pGBKT₇-Vektoren, mit den inserierten Ködersequenzen AB, AB⁺ und AB_{C-Term.}, transformiert. Parallel erfolgte die Transformation des Stammes AH 109 mit der cDNA und dem pGADT₇-Rec-Vektor. Als Kontrollen kamen mit pGADT₇-T transformierte AH 109-Kolonien in Kombination mit Y 187-Kolonien zum Einsatz, die zur Positivkontrolle den Vektor pGBKT₇-53 und für die Negativkontrolle den Vektor pGBKT₇-Lam enthielten. Alle transformierten Hefestämme wurden 5 Tage auf entsprechenden Selektivnährmedien kultiviert.

Für die Matingansätze wurden zunächst Übernachtskulturen der haploiden Stämme angesetzt. Dazu wurde jeweils eine 2-3 mm große Kolonie der die Bindedomänenvektoren tragenden Y 187-Kulturen in 10 ml YPDA-Medium überführt. Gleiches galt für die Stämme, die die Kontrollvektoren trugen. Die AH 109-Kulturen einer Platte, die mit cDNA und dem pGADT₇-Rec-Vektor transformiert worden waren, wurden gepoolt und ebenfalls in 10 ml YPDA-Medium überführt. Alle Kulturen wurden über Nacht bei 30°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden in einem 2 l-Glasgefäß 45 ml YPDA-Medium mit 45 µl Kanamycin (50 mg/ml) versetzt. 5 ml der Y 187-Zellsuspensionen und 1 ml der AH 109-Zellsuspensionen wurden in folgenden Kombinationen hinzugegeben:

Y 187/ pGBKT ₇ (AB)	-	AH 109/ Rec-Vektor/cDNA	
Y 187/ pGBKT ₇ (AB ⁺)	-	AH 109/ Rec-Vektor/cDNA	
Y 187/ pGBKT ₇ (AB _{C-Term.})	-	AH 109/ Rec-Vektor/cDNA	
Y 187/pGBKT ₇ (/γ-Tub)	-	AH 109/ Rec-Vektor/cDNA	
Y 187/pGBKT ₇ -53	-	AH 109/pGADT ₇ -T	(pos.-Kontr.)
Y 187/pGBKT ₇ -Lam	-	AH 109/pGADT ₇ -T	(neg.-Kontr.)

Um die Zellkulturen zu resuspendieren, wurde der Ansatz anschließend auf einem Vortexgerät (Reax 2000, Heidolph, Schwabach) gut gemischt. Die Inkubation erfolgte für 20 Stunden bei 30°C und 75 rpm in einem Schüttelwasserbad (Gesellschaft für Labortechnik (GFL) mbH, Burgwedel). Das Schütteln ist notwendig, um die Sedimentation der Hefezellen zu verhindern. Mehr als 80 rpm können die Matingeffizienz jedoch signifikant reduzieren. Anschließend wurden die Ansätze unter einem Mikroskop (Axioplan, Carl Zeiss, Jena; Kamera CCD s/w Typ CF 8/1 DXC und Steuereinheit ACC1, Kappa, Göttingen) betrachtet. Wenn noch Zellakkumulationen und Zygoten zu erkennen waren, wurde die Inkubation um vier Stunden verlängert.

2.20.2.1 Ausplattieren der Matingansätze

Da beide Hybridplasmide bereits in den Parentalzellen repliziert und exprimiert wurden, konnte unmittelbar nach dem Mating eine Selektion auf *triple dropout*-Medien erfolgen (FROMONT-RACINE *et al.* 2002). Mit einem sterilen Drigalski-Spatel wurden 100 µl des jeweiligen Mating-Ansatzes auf TDO-Platten ausplattiert. Die Platten wurden mit Necsofilm (Carl Roth, Karlsruhe) verschlossen und die Kulturen 4-7 Tage in einen Brutschrank (Typ BE80, Memmert Elektronik, Schwabach) bei 30°C inkubiert. Auf diesem Mangelnährmedium gewachsene Kolonien wurden mittels eines Replikationsstempels auf Selektivnährmedien höherer Stringenz überführt und unter oben genannten Bedingungen kultiviert, um den Phänotyp dieser offensichtlich positiven Kolonien zu verifizieren.

Zur Bestimmung der Mating-Effizienz wurden 10 µl des unverdünnten Ansatzes und 10µl eines 1:10 verdünnten Ansatzes auf jeweils SD-Leu, SD-Trp und SD-Leu/-Trp (DDO) - Selektivnährmedien ausplattiert.

2.20.2.2 Berechnung der Mating-Effizienz

Die Matingeffizienz gibt den Anteil diploider Hefezellen in der Matingkultur in Prozent an. Zu ihrer Berechnung wird sowohl die Wachstumsfähigkeit jedes einzelnen Stammes als auch die des diploiden Stammes bestimmt. Die genaue Zahl der koloniebildenden

Einheiten (kbE) kann ermittelt und die jeweilige Wachstumsfähigkeit nach folgender Formel errechnet werden. Zur Bestimmung der jeweiligen Wachstumsfähigkeit des Stammes wurden die koloniebildenden Einheiten pro ml berechnet.

$$\text{Wachstumsfähigkeit (kbE/ml)} = \frac{\text{kbE x 1000 } \mu\text{l/ml}}{V_{\text{ausplattiert}} (\mu\text{l}) \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Der Matingstamm mit der geringeren Wachstumsfähigkeit ist der limitierende Stamm und geht in die Berechnung der Matingeffizienz ein. Diese errechnet sich als Quotient aus der Wachstumsfähigkeit der Diploiden und der des limitierenden Stammes:

$$\text{Matingeffizienz (\% Diploide)} = \frac{\text{kbE/ml an Diploiden x 100}}{\text{kbE/ml des limitierenden Stammes}}$$

Die Matingeffizienz sollte über 5% liegen. Die Anzahl der gescreenten Klone konnte mit der nachfolgenden Formel bestimmt werden:

$$\text{Anzahl gescreenter Klone} = \text{kbE/ml an Diploiden} \times \text{Resuspensionsvolumen}$$

2.20.3 Blau-Weiss-Selektion mittels X- α -Gal

Diese Methode zum qualitativen Nachweis wird eingesetzt, um Protein-Protein-Interaktionen in *Saccharomyces cerevisiae* nachzuweisen. Die von den Hefezellen als Folge der Expression des MEL1 Reportergens sekretierte α -Galaktosidase setzt beim enzymatischen Abbau des Indikators X- α -Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-galactopyranosid) das blaue Spaltprodukt 5-Brom-4-chlor-3-indol frei, sodass diese Hefezellen anhand ihrer Färbung identifiziert werden können (AHO *et al.* 1997, LOTTSPREICH & ENGELS 2006, YEAST PROTOCOLS HANDBOOK 2001).

Zur Herstellung der XGal-Stammlösung wurden 20 mg/ml in DMF gelöst und bei -20°C gelagert.

Einem Liter eines autoklavierten Agar-Nährmediums wurden nach Abkühlen auf etwa 55°C 750 µl dieser Stammlösung zugegeben, die Platten ausgegossen und bei Raumtemperatur ausgehärtet. Der Nachweis konnte trotz des pH-Optimums der α -Galaktosidase bei ≈ 4 direkt auf den Nährmedien (pH=5,8) erfolgen, da das Wachstum der Hefen zu einer Versauerung der Medien führt (RUPP 2002). Die Zellsuspensionen konnten daher auf den Selektivplatten ausplattiert bzw. auf QDO-Selektivnährmedien gewachsene Zellen auf diese überimpft werden. Die Identifizierung der potentiell positiven blaue Kolonien konnte nach 5 - 6 Tagen Inkubation bei 30 °C erfolgen.

2.21 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der potenziell positiven Plasmide erfolgte mit den jeweiligen Vektorprimern mittels Cycle Sequencing unter Verwendung von fluoreszierenden Nukleotiden. Die Probe konnte anschließend zur Sequenzierung eingereicht werden (GENterprise Genomics, Mainz). Diese Sequenzierungsreaktion basiert auf der Didesoxymethode. Der Primer wird im Cycle Sequencing durch die Aktivität der *Taq*-Polymerase mit Desoxynukleotiden verlängert. Aus der Anwesenheit der Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Didesoxynukleotide resultiert der Abbruch der DNA-Synthese. Folge dieser Reaktion ist eine Reihe von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, die komplementär zum Template und mit Fluorochrom markiert sind (ALBERTS *et al.* 2004). Sie werden in einem automatischen Sequenzierer elektrophoretisch auf einem Polyacrylamidgel der Größe nach getrennt und von einem Laser angeregt. Mittels der vier basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffe, die Licht mit charakteristischer Wellenlänge emittieren, wird die Sequenz der cDNA ausgewertet (ALBERTS *et al.* 2004). Die Ergebnisse konnten mit dem Programm ChromasLITE Version 2.01 bearbeitet und über die NCBI Blast Datenbank mit bereits bekannten Sequenzen verglichen werden.

2.22 Computergestützte Sequenz- und Proteinanalysen

- Restriktionskarten und Ableitung von Aminosäuresequenzen:
Clone Manager 4.0, Scientific & Educational Software
- Gensequenzsuche in der Genbank:
SearchGenbank, National Center for Biotechnology Information
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Sequenzvergleiche und Ableitung von Aminosäuresequenzen:
AlignPlus 2.0, Scientific & Educational Software
ClustalX 1.81
- Editierung von Sequenzierungsrohdaten automatischer Sequenziergeräte:
Chromas Lite 2.01, McCarthy, C. School of Biomolekular and Biomedical
Science, Faculty of Science and Technologie, Griffith, Brisbane, Queensland,
Australia
<http://trishul.sci.gu.edu.au/~conor/chromas.html>
- Globale Sequenzvergleiche:
National Center for Biotechnology Information, USA
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>
- Sequenzvergleiche, Ableitung von Aminosäuresequenzen
BioEdit 5.0.6
- Überprüfung der korrekten Proteinfaltung
SwissProt
<http://www.expasy.org/spdbv>
- Konstruktion von Oligonukleotidprimern
PrimerPremier 5.0

3. Ergebnisse zur Untersuchung von γ -Tubulin-Teilsequenzen

3.1 Auswahl des Pflanzenmaterials

Die Auswahl des Pflanzenmaterials für die Untersuchungen der γ -Tubulin-Teilsequenzen um das A- und B-Peptidmotiv fiel in die noch bestehende phylogenetische Lücke zwischen den einzelligen Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii*, und *Chlorella spec.*, sowie dem Lebermoos *Marchantia polymorpha*. Während der Arbeit wurden die Grünalgen *Closterium ehrenbergii*, *Spirogyra spec.*, *Scenedesmus fusca*, *Gonium pectorale*, *Volvox globator*, *Volvox tertius*, *Volvox carteri*, *Volvox gigas*, *Ulothrix spec.*, *Pleodorina illinoisiensis*, *Cephaleuros spec.*, *Chlorokybus atmophyticus*, *Mesostigma viride*, *Coleochaete scutata* und *Klebsormidium spec.* für die Untersuchungen ausgedeutet.

Die Auswahl der untersuchten Grünalgen erfolgte hinsichtlich ihrer Ein- und Mehrzelligkeit, dem Vorhandensein von Begeißelung und Besitz von Centriolen. Gegen Ende der Versuchszeit wurden, aufgrund phylogenetischer Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (TURMEL, OTIS, LEMIEUX 2002; GRAHAM, COOK, BUSSE 2000; BHATTACHARYA, WEBER, SOOK BERNING-KOCK 1998; KAROL, MCCOURT, CIMIO, DELWICHE 2001; QUI, PALMER 1999; LEMIEUX, OTIS, TURMEL 2000), hauptsächlich Grünalgen untersucht, welche der Streptophytenlinie zugeschrieben werden.

3.2 Ribonukleinsäure (RNA)-Extraktion

Für die vorliegende Arbeit mussten zunächst die RNA aus den Organismen in ausreichender Menge und Qualität extrahiert werden. Die RNA-Extraktionen wurden für eine spätere RT-PCR mit γ -Tubulin-spezifischen Primern durchgeführt.

3.2.1 Resultate der RNA-Extraktionen

Für die Extraktion von RNA kamen drei verschiedene Methoden zum Einsatz. Die Guanidinium-HCL-Extraktionsmethode stellte sich als recht zeitaufwendig dar und

wurde daher nur selten angewandt. Die meisten Extraktionen wurden mit dem kommerziellen Medium peqGold RNAPure™ (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) oder dem NucleoSpin®-RNA-Plant-Kit (Macherey & Nagel, Düren) durchgeführt. Der Vorteil dieser Methoden lag bei der leichteren Handhabung und den wenigen Arbeitsschritten, die sich zeitsparend auswirkten und zusätzlich die Gefahr der Kontamination mit RNA-abbauenden Enzymen verringerte. Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von RNA war die Isolation über Nucleobond AXR 400-Säulen. Die Versuchsdurchführung war ein wenig zeitaufwendiger als jene mit peqGold RNAPure™ und dem NucleoSpin®-RNA-Plant-Kit, bot jedoch eine alternative Möglichkeit reine RNA zu gewinnen.

Die Resultate der Extraktionen mittels peqGold RNAPure™ und NucleoSpin®-RNA-Plant-Kit, sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die Ausbeute war zufriedenstellend und lag zwischen 0,64 und 0,97 µg/mg eingesetztem Frischgewicht. Die Extinktionsquotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ lagen zwischen 1,69 und 1,99 und bestätigten die Reinheit der extrahierten Ribonukleinsäuren.

Organismus	eingesetzte Frischmasse	Gesamtmenge RNA	Ausbeute RNA/ eingesetzte Frischmasse	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	Extraktions-Methode
	mg	µg	µg/mg		
<i>Closterium</i>	56	44	0,78	1,86	Nukleospin
<i>Spirogya</i>	287	213	0,74	1,80	peqGold
<i>Scenedesmus</i>	334	323	0,97	1,77	peqGold
<i>Gonium</i>	59	47	0,80	1,99	Nukleospin
<i>Volvox gl.</i>	137	122	0,89	1,74	PeqGold
<i>Volvox gi.</i>	164	146	0,89	1,83	PeqGold
<i>Volvox ter.</i>	177	143	0,81	1,90	PeqGold
<i>Volvox car.</i>	99	87	0,87	1,75	peqGold
<i>Ulothrix</i>	47	42	0,89	1,83	Nukleospin
<i>Pleodorina</i>	112	98	0,87	1,76	peqGold
<i>Cephaleuros</i>	44	33	0,75	1,69	Nukleospin
<i>Chlorokybus</i>	76	49	0,64	1,94	Nukleospin
<i>Mesostigma</i>	63	57	0,90	1,89	Nukleospin
<i>Coleochaete</i>	189	154	0,81	1,83	peqGold

Tab. 9: Resultate der RNA-Extraktionen mittels peqGold RNAPure™ (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) und NucleoSpin®-RNA-Plant-Kit (Macherey & Nagel, Düren)

3.2.2 Gelelektrophorese der RNA

Mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der Nukleinsäure-Extraktionen konnte gezeigt werden, ob diese erfolgreich verlaufen sind. Indiez für eine saubere Präparation waren klar erkennbare Banden ribosomaler RNA. Bei der RNA hätte eine Anwesenheit von Ribonukleasen zum schnellen Abbau der typischen cytosolischen rRNA-Banden geführt.

Generell wurden alle extrahierten Nukleinsäuren einer gelelektrophoretischen Überprüfung unterzogen, ehe sie in weiteren Arbeitsschritten eingesetzt wurden. Eine zusätzliche Überprüfung musste nach längerer Lagerung aufgrund möglicher Degradation der Nukleinsäuren durchgeführt werden.

Nachfolgend sind für die mit peqGold RNAPureTM und NucleoSpin®-RNA-Plant-Kit extrahierte RNA exemplarisch die Ergebnisse abgebildet. Die Ergebnisse aller untersuchten Organismen sind im Anhang auf CD-Rom als Bilddateien einzusehen.

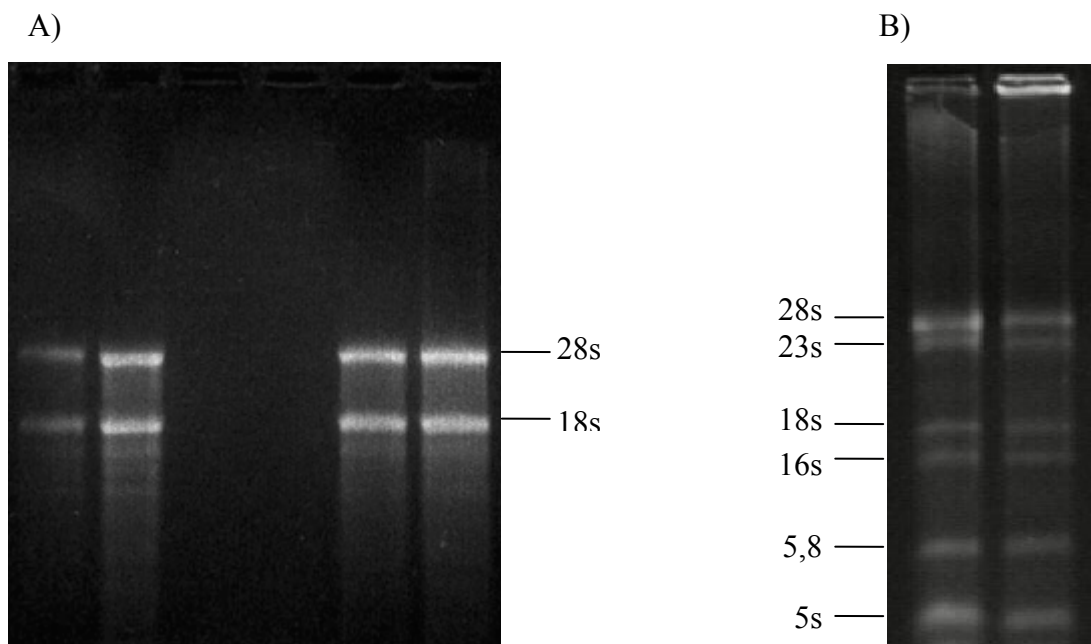


Abb. 27: Beispiele der RNA-Extraktionen: A) peqGold RNAPureTM (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) und B) NucleoSpin®-RNA-Plant-Kit (Macherey & Nagel, Düren). Man erkennt die distinkten prokaryotischen und eukaryotischen ribosomalen Banden, welche ein Indiez für eine saubere Extraktion lieferten. Aufgetrennt auf einem 1,8 %igen Agarosegel.

3.3 Amplifikationen der γ -Tubulin-Teilsequenzen mittels PCR

Die in der PCR und RT-PCR eingesetzten degenerierten „Vorne4“ und „Hinten“ wurden anhand eines Alignments bereits bekannter γ -Tubulin-Sequenzen designt. Die Primer wurden dazu an einer Position gewählt, an der die γ -Tubulin-Sequenzen der verschiedenen bereits bekannten Organismen große Homologien aufweisen. Zusätzlich wurden die Primer degeneriert, um eine mögliche Abweichung an der dritten Base eines Triplets zu kompensieren. Des Weiterem wurde dem Primer „Vorne4“ an der sechsten Position ein Deoxyinosin eingefügt, welches in der Lage ist, mit allen vier Basen (Adenosin, Cytosin, Guanin, Thymin) zu hybridisieren. Aufgrund der Homologie innerhalb der γ -Tubulin-Sequenzen war nach einer reversen Transkription bei diesen Primern ein RT-PCR-Amplifikat von ca. 500 bp zu erwarten.

γ -Tubulinspezifische Primer

upstream: Vorne4 5'-GA(CT) GT5 TT(CT) TT(CT) TA(CT) CA(AG) GC- 3'

downstream: Hinten 5'-AC(CT) TCT CC(CT) TG5 AT(AGT) AT(AG) TT- 3'

(5 = Deoxyinosin)

Bei den Untersuchungen der verschiedenen Organismen konnten in der RT-PCR mit den eingesetzten Primern die erwarteten Produkte mit ca. 500 bp amplifiziert werden (Abb.28). Die Negativkontrollen, in denen statt Template-DNA ddH_2O eingesetzt wurde, zeigten erwartungsgemäß keine Amplifikation, so dass eine Kontamination der Proben unwahrscheinlich war.

Nachfolgend sind exemplarisch Ergebnisse der Amplifikationen abgebildet. Sämtliche Ergebnisse aller Organismen sind im Anhang auf CD-Rom verfügbar.

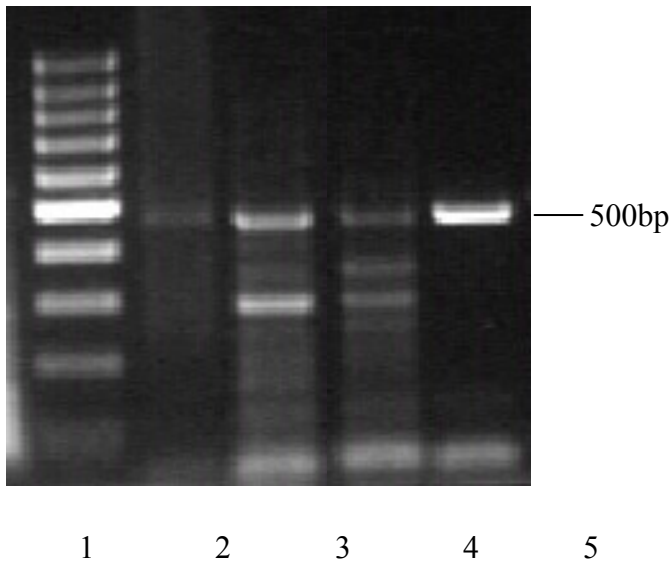


Abb. 28: RT-PCR-Ergebnisse mit den γ -Tubulin spezifischen Primern „Vorne4“ und „Hinten“: Gezeigt sind exemplarisch die Amplifikationen von *Mesostigma viride* (Spur 2), *Chlorokybus atmophyticus* (Spur 3), *Spirogyra spec.* (Spur 4) und *Nicotiana tabacum* (Spur 5), Marker 100 bp Ladder (Spur 1). PCR-Protokoll: 30 sek. 94°C, 1 min. 45 °C, 2 min 72°C für 40 Zyklen. Je 5 μ l PCR-Produkt elektrophoretisch in einem 1,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. EtBr-Färbung.

3.4 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Für eine spätere Ligation in das Vektorplasmid pGEM[®]-T (Promega, Mannheim) wurden die PCR-Produkte aufgereinigt, um eventuelle Fehlligationen zu vermeiden. Dies geschah nach Erhalt einer distinkten Bande bei ca. 500 bp in der Regel mittels Aufreinigung direkt aus dem PCR-Ansatz zur Entfernung der Primerdimere. Waren bedingt durch das Primerpaar mehrere Amplifikationen erfolgt, wurde die entsprechende Bande bei ca. 500 bp ausgeschnitten und aus dem Agarosegel aufgereinigt. Dazu wurde eine große Menge des PCR-Ansatzes in einem möglichst gering konzentrierten Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht ausgeschnitten.

Nach der Aufreinigung konnten die Ergebnisse mittels Gelelektrophorese überprüft werden. Das verwendete NucleoSpin[®] Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren) erbrachte zufriedenstellende Ergebnisse, was an den klaren Banden der aufgereinigten Amplifikaten zu erkennen war. Ein exemplarisches Ergebnis ist in Abb.29 aufgezeigt.

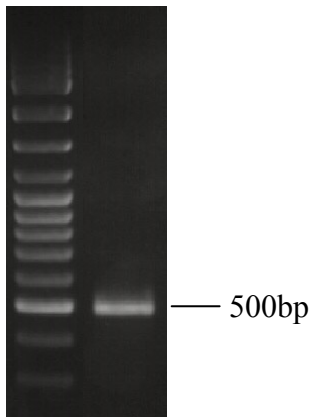


Abb. 29: Beispielergebniss einer Aufreinigungen der RT-PCR-Amplifikate mittels NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren) Elektrophoretisch aufgetrennt in einem 1,8 %igen Agarosegel. Marker 100 bp Ladder. EtBr-Färbung

3.5 Klonierungsergebnisse mittels Blau/Weiß-Screening

Mit dem Blau/Weiß-Screening konnte ein erster Eindruck über den Erfolg der durchgeführten Ligationen und Transformationen gewonnen werden. Hierfür wurden 100 – 200 µl der transformierten Bakterien auf x-Gal/IPTG-LB-Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Der Anteil der positiven weißen Kolonien lag in der Regel bei 70 – 80%. Die Dokumentation eines typischen Ergebnisses ist in der nachfolgenden Abbildung gezeigt.

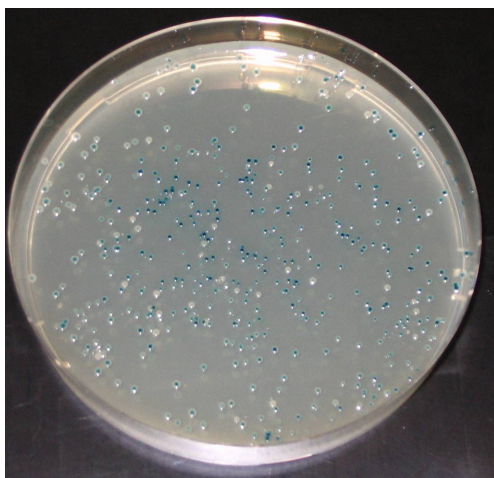


Abb. 30: Typische Selektions-Resultate mit x-Gal/IPTG-LB-Selektivplatten

Die transformierten Bakterien mit einem Insert im Vektor-Plasmid erscheinen im Bild weiß.

Die Kolonien ohne ligiertem Insert im Vektor-Plasmid erscheinen blau.

3.6 Charakterisierung der Klone mittels Kolonie-PCR

Die potentiell positiven Klone der Transformation mit dem cDNA-Insert wurden mittels Kolonie-PCR mit den Vektorprimern M13 universal und revers untersucht. Bei einer Klonierung des gewünschten Inserts war aufgrund der durch die M13-Primer bedingten Vektorsequenz eine Länge von etwa 700 bp zu erwarten. Dies war in der Regel bei 40 - 70 % der Klone der Fall (Abb.31). Die als positiv erachteten Klone wurden einer Sequenzierungsreaktion unterzogen und bei der Firma GENTERprise Genomics (Mainz) zur Sequenzierung in Auftrag gegeben. Nachfolgend ist ein exemplarisches Beispiel einer Charakterisierung von Transformanten mittels Gelelektrophorese gezeigt. Alle weiteren Untersuchungsergebnisse sind als Bilddatei im Anhang auf CD-Rom einzusehen.

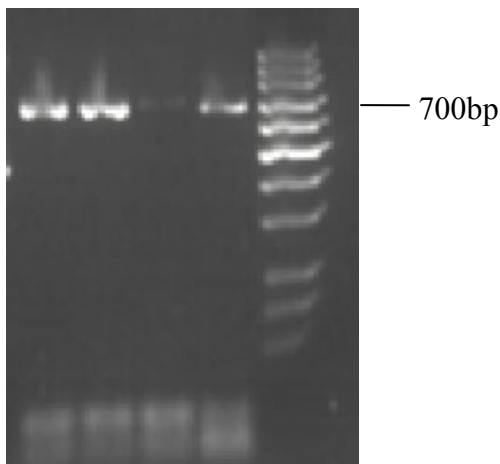


Abb. 31: Exemplarisches Beispiel einer Kolonie-PCR der Klone mit den Vektorprimern M13.
Marker 100 bp Ladder. EtBr-Färbung.

3.7 Mengenabschätzung der Klone für die Cycle-Sequenzierungs-Reaktion

Erfolgreich transformierte Amplifikate wurden mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren) aufgereinigt. Für die Mengenabschätzung wurde neben einer Referenz mit definierter Menge (200 ng) unterschiedliche Volumina des Klons auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

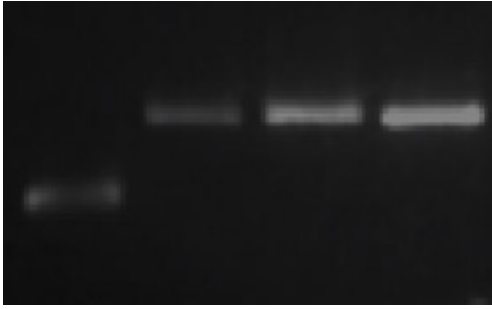


Abb. 32: Mengenabschätzung des eines positiven Klons: 1) Referenz mit definierter Menge (200µg). In Spur 2 - 4 wurden 2, 4, 6 µl des aufgereinigten Amplifikats aufgetragen. Für das folgende Cycle-Sequencing-PCR-Programm wurde nachfolgend die entsprechende Menge des Amplifikats eingesetzt. Die Probe wurde anschließend von der Firma Genterprise (GENTERprise Genomics, Mainz) ausgewertet.

3.8 Sequenzierungsergebnisse

Zur Sequenzierung wurden nach einer Cyclesequenzierung-Reaktion die Proben zur Auswertung bei der Firma GENTERprise Genomics (Mainz) zum sequenzieren eingereicht. Die Rohdaten der einzelnen Sequenzierungen, sowie die Umschrift der Sequenzen in Aminosäuresequenzen sind im Anhang auf CD-Rom einzusehen. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Vektor-Primern M13 universal (MWG Biotech, Ebersberg).

3.9 Alignment der ermittelten γ -Tubulin-Aminosäuren-Teilsequenzen

Die ermittelten Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programm Clone in Aminosäuresequenzen umgeschrieben und anschließend mit dem Programm ClustelX allignt. Eine weitere Bearbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Genedoc. Hierbei konnten identische Aminosäuren im Bezug auf die Referenzsequenz (*Nicotiana tabacum*) zur besseren Übersicht durch Punkte und eventuelle Deletionen durch Striche ersetzt werden. In der nachfolgenden Abbildung sind die konservierten Bereiche im γ -Tubulin A- und B-Peptid farblich unterlegt. Die Konservierungen sind ausschließlich bei Organismen aufzufinden, welche der Streptophytenlinie angehören. Auffallend sind die beiden untersuchten Jochalgen *Spirogyra spec.* und *Closterium spec.*, welche

ebenfalls der Streptophytenlinie angehören, jedoch nur im A-Peptidbereich eine Konservierung aufzeigen.

	A-Peptid				B-Peptid				
	*	20	*	40	*	60	*	80	
NICOTIANA	:	LLASLIPTPRCHFLMTGYTPLT	VE	-----RQANVIRK	TTVLDVMRRLQLQTKNIMVS	S	-YARTKEASQAKY	ISILNIIQGE	: 74
ARABIDOPSIS1	:N.....	: 74
ARABIDOPSIS2	:N.....	: 74
HORDEUM	:V.....	: 74
ZEA1	:V.....	: 74
ZEA2	:V.....	: 74
ORYZA	:V.....N.....	: 74
ANEMIA	:A.....A.....	: 74
PHYSCOMITRELLA	:A.....A.....	: 74
MARCHANTIA	:A.....A.....D.....	: 74
CONOCEPHAL	:A.....A.....D.....	: 74
HAPLOMITRIUM	:A.....A.....	: 74
COLEOLEOCHAETE	:A.....A.....I.....	: 74
CHARA	:I.....G.A.....P.....	: 74
KLEBSORMIDIUM	:A.....G.A.....A.....G.A.....A.....	: 74
MESOSTIGMA	:T.....G.A.....A.....V.....	: 74
CHLOROKYBUS	:G.....	: 74
SPIROGYRA	:V.T.Q.....P.....H.PQ.MINS.....Y.....	: 74
CLOSTERIUM	:S.....L.....S.....S.....QQ.Q.....F.....PP.W.....QH.G.....DT.A.....PAAM.....	: 74
CEPHALEURON	:F.F.K.....GDKG-FTST.....S.....H.A.....T.....	: 77
VOLVOX_GLOBATOR	:A.NAAG-QATSN.....P.....HT.....DIAN.....	: 78
VOLVOX_GIGAS	:A.NAAG-QVTSN.....P.....HT.....DI.A.....	: 78
VOLVOX_TERTIUS	:A.NAAG-QVTSN.....P.....HT.....DM.SV.....	: 78
VOLVOX_CARTERI	:A.NAAG-QVTSN.....P.....HT.....DM.S.....	: 78
PLEODORINA	:A.NAAG-QVTSN.....P.....HT.....DI.S.....	: 78
CHLAMYDOMONAS	:A.NAAG-QVTSN.....P.....HT.....DIAN.....	: 78
SCENEDESMUS.S	:S.....Q.....NESG-QVNSS.....P.....P-H.A.DL.SS.....	: 78
CHLORELLA	:Q.....DSEAG-PVSSS.....P.....P-H.A.DL.TS.....	: 78
GONIUM	:NETGGQLNSS.....P.....P-H.N.DLLS.....	: 79
ULOTHRIX	:-EGG-MAS.Q.....A-H.A.DSLTS.....	: 75
Euglena	:T.....D---P-NIQMT.....SP.....A-ST.-.---GC.....D.....	: 70

Abb. 33: Alignment aller bekannten pflanzlichen γ -Tubulin-Teilsequenzen: Dargestellt sind die Aminosäuresequenzbereiche um das A- und B-Peptidmotiv. Identische Aminosäuren hinsichtlich der Referenz sind durch Punkte, Deletionen durch Striche dargestellt. Farblich unterlegt sind die Aminosäurebereiche, welche die Konservierung im A- und B-Peptid zeigen.

3.10 Phylogenetischer Stammbaum aller bekannten und ermittelten pflanzlichen γ -Tubulin-Teilsequenzen

Der phylogenetische Stammbaum aller bekannten und ermittelten pflanzlichen γ -Tubulin-Sequenzen wurde mit dem Programm ClustalX erstellt. Hierfür wurden die Aminosäure-Teilsequenzen um das γ -A- und B-Peptidmotiv verwendet. Als Outgroup-

Organismus wurde der Einzeller *Euglena spec.* hinzugezogen. Zu erkennen ist ein deutliches Cluster innerhalb der Streptophytenlinie. Einzig die ebenfalls den Streptophyten zugehörigen beiden Jochalgen *Spirogyra spec.* und *Closterium spec.* reißen ein wenig aus dem Cluster aus, da diese eine Konservierung nur im A-Peptid-Motiv aufweisen.

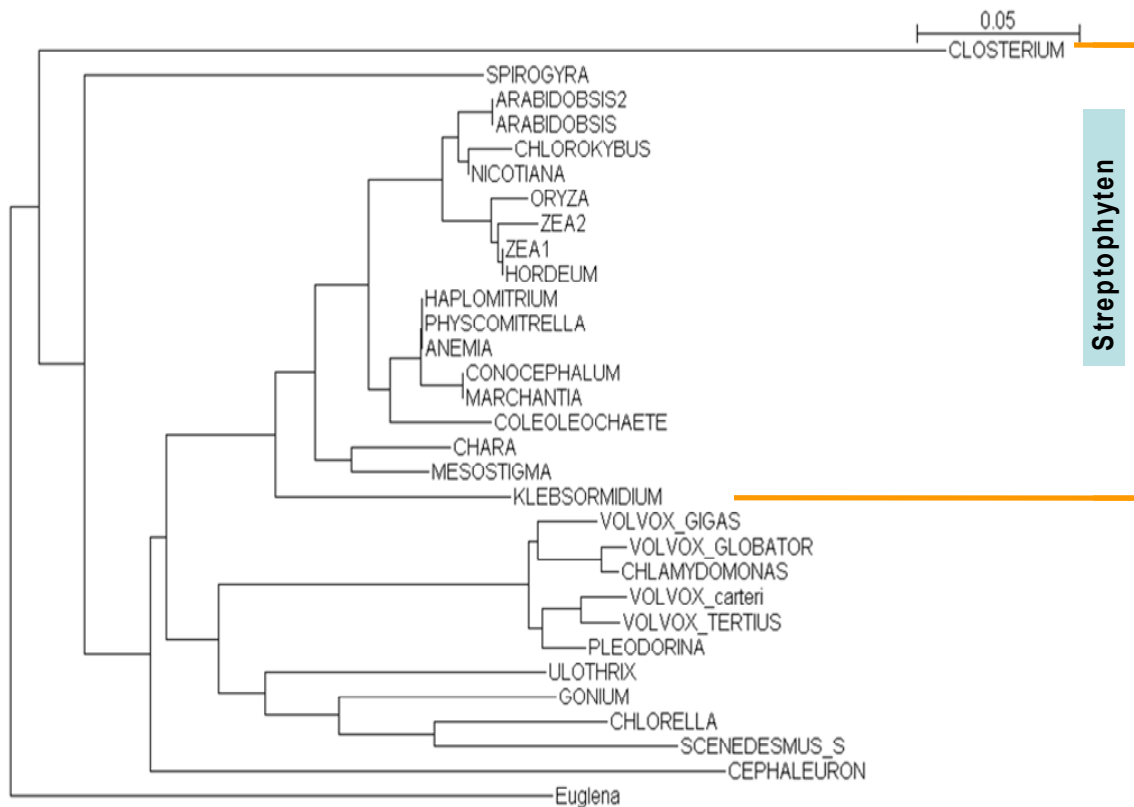


Abb. 34: Phylogenetischer Stammbaum aller bekannten pflanzlichen γ -Tubulin-Teilsequenzen im Bereich der A- und B-Peptidsequenz, ermittelt mit dem Program ClustelX.

3.11 Merkmalsübersicht der Pflanzen bekannter γ -Tubulin-Teilsequenzen

In einer Übersicht sind nachfolgend die Merkmale aller bekannten und ermittelten pflanzlichen Organismen hinsichtlich der der Einzelligkeit, dem Besitz von Centriolen und Geißeln, Zugehörigkeit zur Streptophytenlinie, sowie der Konservierung im γ -A- und B-Peptidmotiv dargestellt. Man erkennt eine Korrelation des γ -A- und B-Peptidmotivs mit den Angehörigen der Streptophytenlinie. Einzelligkeit, Besitz von Geißeln oder Centriolen sind mit dem Motiv nicht in Einklang zu bringen. Interessant

ist die Tatsache, dass die Jochalgen *Spirogyra spec.* und *Closterium spec.*, welche ebenfalls der Streptophytenlinie angehören, nur im γ -A-Peptidmotiv konserviert sind.

Spezies	Einzellig	Centriolen	Geißeln	Streptophyt	Konserviert
<i>Chlamydomonas</i>	+	+	+	-	-
<i>Chlorella</i>	+	+	-	-	-
<i>Scenedesmus</i>	-/+	+	-	-	-
<i>Gonium</i>	-	+	+	-	-
<i>Pleodorina</i>	-	+	+	-	-
<i>Volvox globator</i>	-	+	+	-	-
<i>Volvox gigas</i>	-	+	+	-	-
<i>Volvox carteri</i>	-	+	+	-	-
<i>Volvox tertius</i>	-	+	+	-	-
<i>Ulothrix</i>	+	+	+	-	-
<i>Cephaleuros</i>	-	+	+	-	-
<i>Closterium</i>	+	+	-	+	A
<i>Spirogyra</i>	-	+	-	+	A
<i>Chlorokybus</i>	+	+	-	+	A/B
<i>Mesostigma</i>	+	+	+	+	A/B
<i>Chara</i>	-	+	-/+	+	A/B
<i>Klebsormidium</i>	-	+	-	+	A/B
<i>Coleochaete</i>	-	+	-/+	+	A/B
<i>Haplomitrium</i>	-	-/+	-/+	+	A/B
<i>Conocephalum</i>	-	-/+	-/+	+	A/B
<i>Marchantia</i>	-	-/+	-/+	+	A/B
<i>Physcomitrella</i>	-	-/+	-/+	+	A/B
<i>Anemia, Zea,</i> <i>Oryza, Hordeum,</i> <i>Nicotiana,</i> <i>Arabidopsis</i>	-	-	-	+	A/B

Tab. 10: Übersicht der Merkmale untersuchten und bekannten pflanzlichen Organismen hinsichtlich Einzelligkeit, Besitz von Centriolen, Geißeln, Zugehörigkeit zur Streptophytenlinie und Konservierung im γ -A- und γ -B-Peptidmotiv.

4. Ergebnisse zur Ermittlung von Interaktionspartnern

4.1 Phänotypentest der Hefen und Y187AH109

Alle folgenden Ergebnisse der Hefekulturen und Hefetransformationen waren mehrfach deutlich reproduzierbar.

Abb. 35 zeigt das Ergebnis eines Phänotypentests des Hefestamms AH109. Auf dem Adenin-, Tryptophan- und Leucinmangelmedium erfolgt kein Wachstum. Auf dem Uracilmangelmedium lässt sich volles Wachstum erkennen. Die Hefekolonien gleichen im Wachstum und in der Anzahl der Ausplattierung auf Vollnährmedium (YPDA). Dies wird im Vergleich mit Abb. 36 deutlich, in dem ein Ausstrich von AH109 auf YPDA auf Vollnährmedium gezeigt ist, welches das Antibiotikum Cycloheximid (CHX) enthält. Es erfolgte kein Wachstum der Hefekulturen.

Ein geringeres Wachstum zeigt die Ausplattierung auf Methioninmangelmedium. Auf Histidinmangelmedium ist ein schwaches Wachstum zu erkennen.

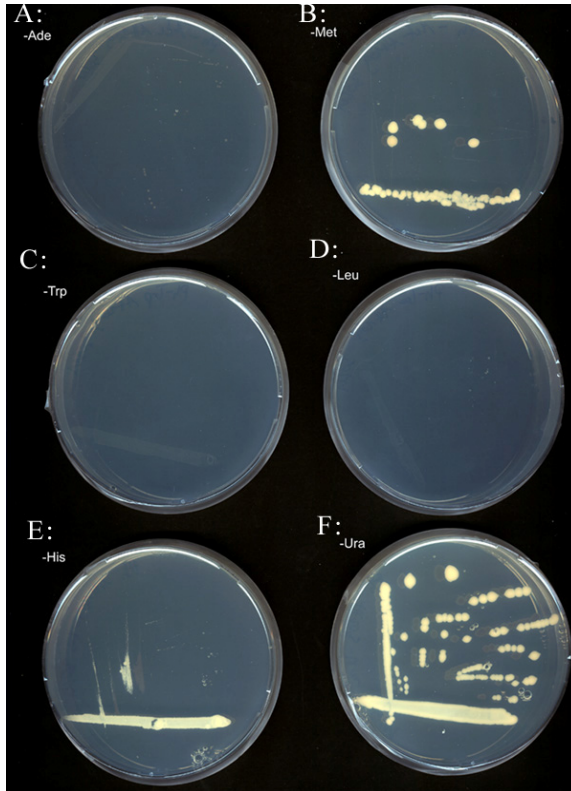


Abb.35: Hefestamm AH109 auf verschiedenen SD-Mangelmedien. Inkubationszeit 3 Tage. Verdünnungsausstrich auf YNB A: SD-Medium -Ade, B:SD-Medium -Met, C: SD-Medium -Trp, D: SD-Medium -Leu, E: SD-Medium -His, F: SD-Medium -Ura.

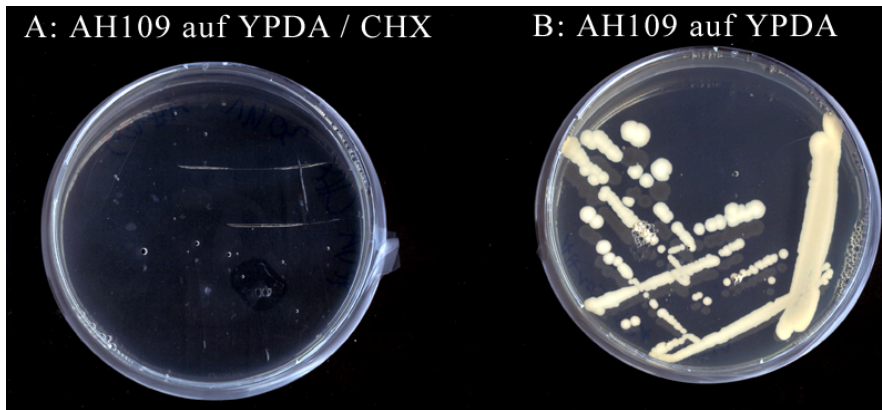


Abb.36: Hefestamm AH109 auf YPDA Vollnährmedien. Inkubationszeit 3 Tage. Verdünnungsausstrich. Kommerzielle YNB. A: YPDA Medium mit Cycloheximid, B: YPDA Medium enthält ohne Cycloheximid.

Der Phänotypentest des Hefestammes Y187 bietet ein ähnliches Bild. Auf Methioninmangelmedium kommt es zu einem geringen Wachstum, auf Histidin-Mangelmedium ist kein Wachstum zu erkennen.

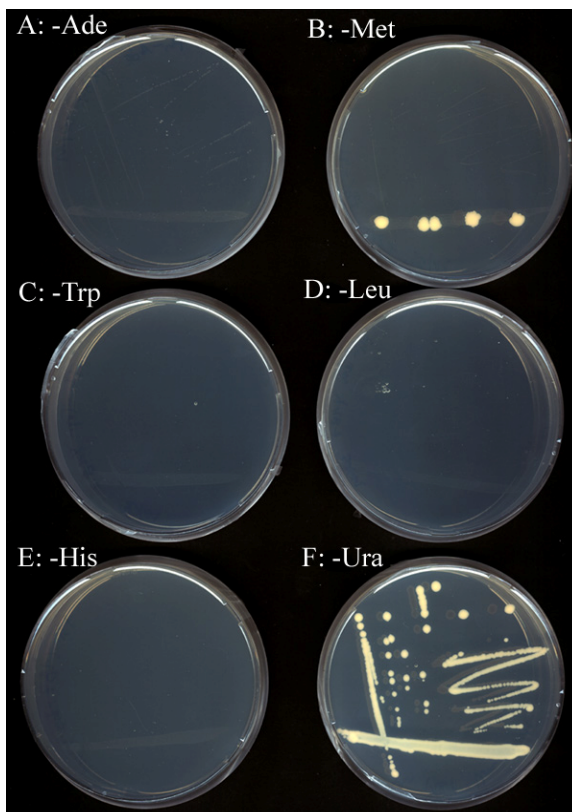


Abb.37: Hefestamm Y187 auf verschiedenen SD-Mangelmedien. Inkubationszeit 3 Tage. Verdünnungsausstrich auf YNB A: SD-Medium -Ade, B:SD-Medium -Met, C: SD-Medium -Trp, D: SD-Medium -Leu, E: SD-Medium -His, F: SD-Medium -Ura.

4.2 Gesamt-RNA-Extraktion (gRNA) von BY2-Zellen (*Nicotiana tabacum*)

Die Qualität der gRNA-Extraktion wurde auf einem 1 %igen Agarosegel kontrolliert. Distinkte Banden eukaryotischer, ribosomaler RNA (28 S und 18 S) wiesen auf die Intaktheit der extrahierten Ribonukleinsäure hin. Die Messenger-RNA unterschiedlicher Größe ist als Hintergrundschmier zu erkennen. Die extrahierte gRNA konnte daher als Template zur Erstellung einer cDNA-Bibliothek und für eine reverse Transkription mit nachfolgender Amplifikation der γ -Tubulin-Sequenzen eingesetzt werden. Der Anteil an mRNA wird im allgemeinen auf etwa 2 % geschätzt (MÜLHARDT 2003).

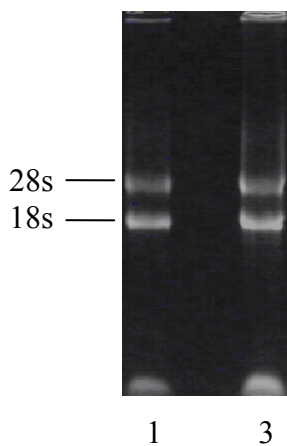


Abb.42 Gesamt-RNA-Extraktion von BY2-Zellen (*Nicotiana tabacum*). Die distinkten Banden bei 28 S und 18 S deuten auf die Intaktheit der RNA hin. Sie konnte daher zur folgenden reversen Transkription bzw. Erststrangsynthese eingesetzt werden. Aufgetragen wurden auf einem 1 %iges Agarosegel 4 μ l (Spur 1) bzw. 8 μ l gRNA (Spur 3).

Die gelelektrophoretische Kontrolle war ein Indiz, dass die extrahierte RNA relativ intakt war. Zusätzlich wurden jedoch Reinheit und Konzentration der RNA durch Photometrie bestimmt. Der Quotient aus dem Absorptionswert bei 260 nm und bei 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der extrahierten RNA. Ein Wert zwischen 1,9 und 2,0 spricht für eine besonders reine RNA. Niedrigere Werte lassen auf Verunreinigungen durch Phenole und Proteine schließen. Die Reinheit der extrahierten RNA lag bei 1,84. Trotz dieser geringfügigen Verunreinigung wurde die RNA als für die Erststrangsynthese qualitativ geeignet erachtet. Aufgrund der Konzentration von 0,85 μ g/ μ l wurden 2 μ l gRNA in die Erststrangsynthese und 8 μ l bei der reversen Transkription eingesetzt.

4.3 Konstruktion der Köder- und Beuteplasmide

4.3.1 Amplifikation der γ -Tubulin-Sequenzen AB, AB+, AB-c-term und γ -Tub

Die Amplifikation der Sequenzen von γ -Tubulin erfolgte mit sequenzspezifischen Oligonukleotidprimern. Diese lagen für die γ -TubulinVolllängensequenz im nichtkodierenden Bereich. Für die Amplifikation der γ -Tubulin-Teilsequenz „AB“ wurden Primer in mittelbarer Nähe des γ -A- und B-Peptidmotivs gewählt. Für das Konstrukt „AB+“ wurde der Bereich zweier flankierenden α -Helices hinzugenommen. Eine weitere Sequenz wurde im Bereich vor dem γ -A- und B-Peptidmotiv bis zum c-Terminus amplifiziert (AB-c-term). Die hierfür eingesetzte cDNA wurde aus gRNA einer BY- Zellkultur gewonnen. Die erwarteten Größen der γ -Tubulin-Amplifikate lagen bei 1622bp (γ -Tub), 848bp (AB-c-term), 336bp (AB+) und 214bp (AB). Die Amplifikate der Sequenzen konnten mittels PCR ermittelt werden..

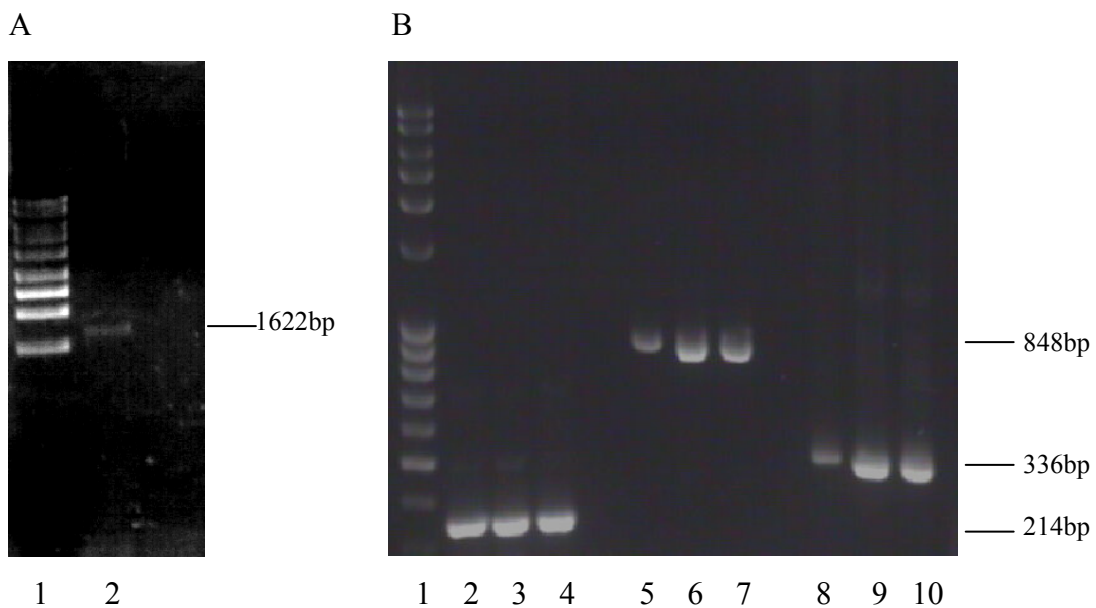


Abb.37: Amplifikate der γ -Tubulinsequenzen: **A:** Marker Mass Ruler™ DNA Ladder, High Range (Spur 1), γ -Tub (Spur 2). **B:** Marker GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Spur 1), γ -Tubulin_{AB} (Spur 2-4), γ -Tubulin_{c-Term} (Spur 5-8), γ -Tubulin_{AB+} (Spur 8-10); EtBr-Färbung, 1%iges Agarosegel

Nach Gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die mit den γ -Tubulin spezifischen Oligonukleotidprimern erhaltenen Amplifikate aus dem Gel ausgeschnitten und für eine Subklonierung in den pGEM®-T Vektor aufgereinigt.

4.3.2 Subklonierung in den pGEM[®]-T Vektor

Um die gerichtete Ligation der Amplifikate der γ -Tubulin-Teilsequenzen in den Bindedomänenvektor des Yeast Two-Hybrid Systems zu erleichtern, erfolgte zunächst eine Subklonierung in den pGEM[®]-T Vektor. Dadurch erhöht man eine verlängerte Erkennungssequenz einen erfolgreichen enzymatischen Verdau wahrscheinlicher macht. Nach der Ligation der potentiellen γ -Tubulin-Amplifikate in den pGEM[®]-T Vektor, erfolgte eine Transformation in Bakterien mit anschließender Blauweiß-Selektion. Eine Identifizierung potetiell positiver (weißer) Klone wurde mittels Kolonie-PCR mit dem Vektorprimer M13 universal (uni) und M13 reverse (rev) durchgeführt. In einer anschließenden Gelelektrophorese war für einen pGEM[®]-T Vektor mit den inserierten γ -Tubulin-Sequenzen Banden bei 1859bp (γ -Volllängeensequenz), 1085bp (γ -AB_{c-term}), 573bp (γ -AB⁺) und 451bp (γ -AB) zu erwarten gewesen. Diese ergaben sich aus der Größe des γ -Tubulin-Amplifikats und der von den Vektorprimern umschlossenen Sequenz des Vektors um die MCS (multiple cloning site) von 237bp. Es konnten Amplifikate des jeweiligen Größenbereichs nachgewiesen werden.

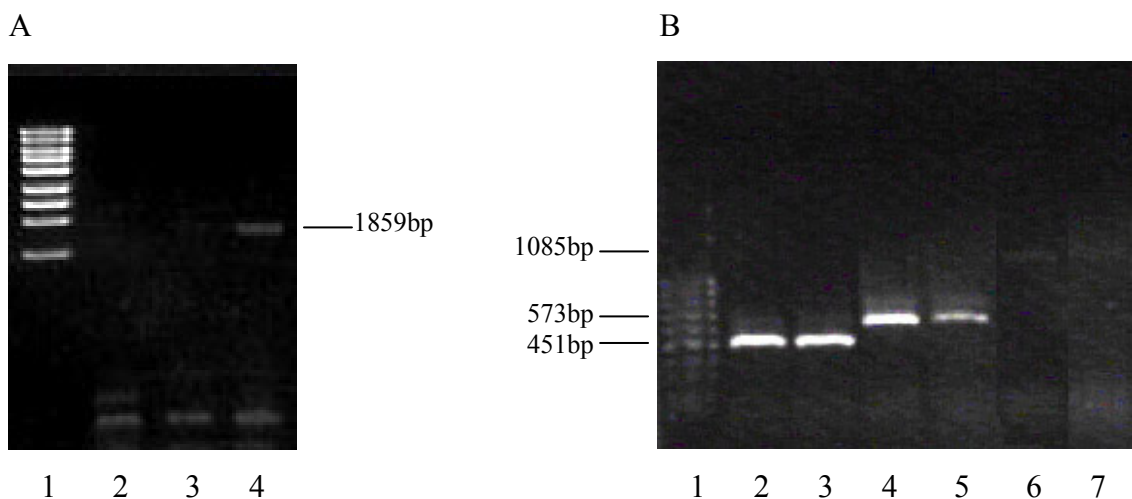


Abb.38: Kolonie-PCR der mit dem Ligationsansatz von pGEM[®]-T Vektor und den mit γ -Tubulinsequenzen transformierten Bakterien mit den Vektorprimern M13 uni und rev:

A: Marker Mass Ruler[™] DNA Ladder, High Range (Spur 1) γ -TubulinVolllängeensequenz (Spur 4), Zwei der getesteten Kolonien (Sp γ -Tubulin_{AB} ur 2 und 3) waren negativ; **B:** Marker 100 bp Ladder (Spur 1), γ -Tubulin_{AB} (Spur 2 und 3), γ -Tubulin_{AB} (Spur 4 und 5), γ -Tubulin_{C-Term} (Spur 6 und 7); EtBr-Färbung, 1%iges Agarosegel.

4.3.3 Klonierung in die Yeast Two-Hybrid Vektoren

Um eine gerichtete Ligation der γ -Tubulin-Sequenzen in den Bindedomänenvektor pGBKT7 zu erreichen, wurden die jeweiligen Ligationskomponenten zunächst mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Oligonukleotidprimer zur Amplifikation der γ -Tubulin-Sequenzen enthielten die Schnittstellen für die Enzyme *Eco* RI und *Sal* I. Das Amplifikat und somit auch die in den pGEM[®]-T Vektor inserierte Sequenz des γ -Tubulins wurde folglich von diesen Schnittstellen flankiert und konnte aus dem pGEM[®]-T Vektor herausgeschnitten werden. Der Bindedomänenvektor pGBKT₇ verfügt in seiner MCS ebenfalls über die entsprechenden Schnittstellen. Die γ -Tubulin-Sequenzen und der Bindedomänenvektor wiesen somit nach den Restriktionen mit *Eco* RI und *Sal* I jeweils zwei verschiedene zueinander komplementäre Enden auf, was eine gerichtete Integration der γ -Tubulin-Sequenzen ermöglichte.

Die einzelnen Restriktionen der Ligationskomponenten erfolgte mit zwischengeschalteten Aufreinigungen. Der pGBKT₇ Bindedomänenvektor wurde zunächst mit *Sal* I, anschließend mit *Eco* RI restringiert.

Es erfolgte eine Ligation der γ -Tubulin-Sequenzen in die Vektoren und anschließend eine Transformation in Bakterien. Die Yeast Two-Hybrid Vektoren verfügen über Antibiotika-Resistenz-Gene, welche es den Bakterien ermöglichen auf dem entsprechenden Selektivmedium zu wachsen. Bakterien mit einem aufgenommenen Vektor sollten auf diesem Medium wachsen. Die Yeast Two-Hybrid Vektoren verfügen über kein *lacZ*-Gen zur visuellen Selektion. Zur Überprüfung, ob die aufgenommenen Vektoren auch über ein Insert verfügten, wurde eine Kolonie-PCR mit den Vektorprimern T7 Sequenz-Primer und 3'DNA-BD durchgeführt. Diese amplifizieren einen 282bp großen Bereich um die MCS des pGBKT₇-Vektor.

Bei der Transformation mit dem pGBKT₇ Bindedomänenvektor konnten potentiell positive Kolonien identifiziert werden. Die erhaltenen Amplifikate hatten eine erwartete Größe von 1904bp (γ -Volllängensequenz), 1130bp (γ -AB-_{c-term}), 618bp (γ -AB+) und 494bp (γ -AB), was der Summe von 282bp des Vektors und der jeweiligen Basenpaaranzahl der γ -Tubulin-Sequenz entsprach.

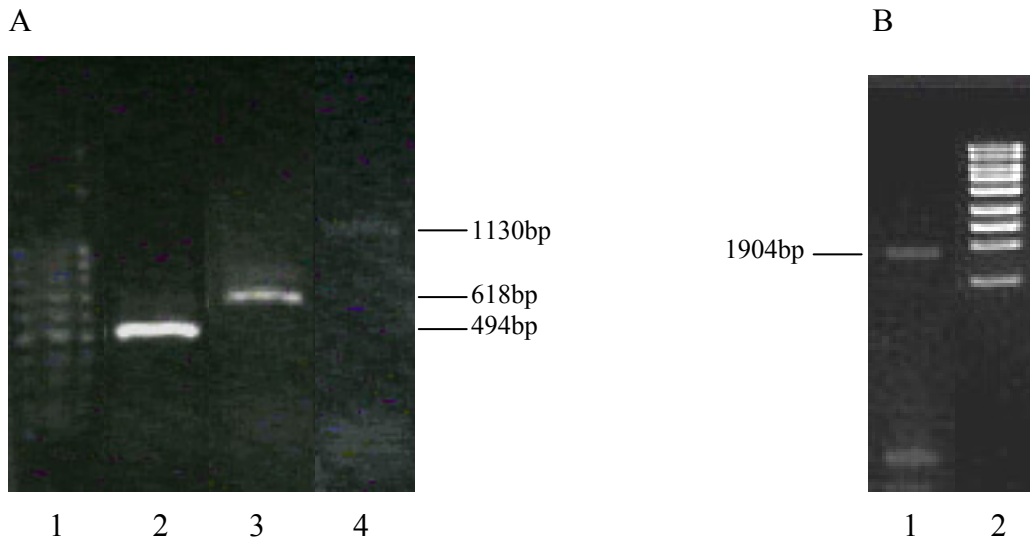


Abb.40 : PCR der isolierten Plasmide aus Bakterien, die mit dem Ligationsansatz aus pGBKT7 und γ -Tubulin-Sequenzen transformiert wurden: A: Marker 100 bp Ladder (Spur 1), γ -Tubulin_{AB} (Spur), γ -Tubulin_{AB} (Spur 3), γ -Tubulin_{C-Term} (Spur 4); **B:** Marker Mass Ruler™ DNA Ladder, High Range (Spur 1) γ -Tubulin-Volllängensequenz (Spur 2); EtBr-Färbung, 1%iges Agarosegel.

4.3.4 Sequenzierung der in den Bindedomänenvektor inserierten Sequenz

Bevor die erhaltenen pGBKT₇ Bindedomänenvektoren als Köderplasmid in Transformationsversuche mit der Hefe einfließen konnten, musste sichergestellt werden, ob es sich bei dem jeweiligen Insert auch die gewünschten γ -Tubulin-Sequenzen handelte. Des Weiteren war wichtig, zu überprüfen, ob die Sequenzen im richtigen Leserahmen inseriert waren. Hierfür wurde die MCS der Plasmide einer der als positiv erachteten Kolonien sequenziert (GENterprise Genomics, Mainz). Ein Abgleich mit Hilfe der Internet-Sequenzdatenbank NCBI identifizierte die einzelnen γ -Tubulin-Sequenzen. Die konstruierten Köderplasmide konnten folglich für die anschließenden Versuche im Yeast Two-Hybrid zum Einsatz kommen.

Exemplarisch ist nachfolgend die γ -Tubulin-Volllängen-Sequenz abgebildet. Die Bindestellen der verwendeten Primer für die jeweiligen γ -Tubulin-Sequenzen sind eingezeichnet. Die Rohdaten der einzelnen Sequenzierungen sind im Anhang auf CD-Rom einzusehen.

2	gcg cga ggg aac aa	c aag gga aaa	cag caa agg aaa atg ccg aga	46
1	A R G N N	K G K	Q Q R K M P R	15
47	gaa att ata aca ctg caa gtt gga caa tgc ggg aac cag atc gga			91
16	E I I T L Q V G Q C G N Q I G			30
92	atg gag ttc tgg aaa cgg ctg tgc ctc gaa cac ggt atc agt aaa			136
31	M E F W K R L C L E H G I S K			45
137	gaa ggc att ctt gaa gat ttt gct act cag gga ggt gat aga aaa			181
46	E G I L E D F A T Q G G D R K			60
182	gat gta ttt ttc tat caa gcg gac gac caa cac tac ata cct cga			226
61	D V F F Y Q A D D Q H Y I P R			75
227	gca tta ttg atg gat cta gag ccc aga gtg att aac ggt ata caa			271
76	A L L M D L E P R V I N G I Q			90
272	aat ggt gaa tat agg aat ctc tac aat cat gag aat gta ttc att			316
91	N G E Y R N L Y N H E N V F I			105
317	gca gat cat gga gga ggt gct gga aat aat tgg gca agc gga tat			361
106	A D H G G G A G N N W A S G Y			120
362	cat cag ggt aag caa tat gag gag gat cta atg gac atg att gat			406
121	H Q G K Q Y E E D L M D M I D			135
407	agg gaa gca gat gga agc gat agt ctc gag ggt ttt gtt cta tgc			451
136	R E A D G S D S L E G F V L C			150
452	cat tca att gcc ggt gga act ggc tca ggc atg ggc tca tat ata			496
151	H S I A G G T G S G M G S Y I			165
497	ttg gaa act ctg aat gat cgc tac agc aaa aag ctt gtt caa acc			541
166	L E T L N D R Y S K K L V Q T			180
542	tac agc gtt ttt cct aac caa aat gag aca agt gat gtg gtt gta			586
181	Y S V F P N Q N E T S D V V V			195
587	caa cct tat aat tcc ctt ttg aca ctc aag cgt ctg aca ttg aat			631
196	Q P Y N S L L T L K R L T L N			210
632	gcg gat tgt gta gtt gta ctt gat aat acc gca ctc aat aga att			676
211	A D C V V V L D N T A L N R I			225
677	gct gtg gaa cgc ctg cat att aca act ccc act ttt gct caa aca			721
226	A V E R L H I T T P T F A Q T			240
722	aat tca tta gtc tct act gta atg tca gca agt aca acc	aca cta		766
241	N S L V S T V M S A S T T T L			255
767	ggt tac cca gga	tac atg aat aac gac ttg gtt ggc ctc ctt gct		811
256	R Y P G Y M N N D L V G L L A			270
812	tcg ttg ata cct aca	cca aga tgc cat ttt ctt	atg acc ggg tat	856
271	S L I P T P R C H F L M T G Y			285
857	act cca ctc act gtg gaa cgt caa gct aat gta att cgg aag aca			901
286	T P L T V E R Q A N V I R K T			300
902	act gta ctt gat gtc atg aga agg ctc ctt cag acc aag aat atc			946
301	T V L D V M R R L L Q T K N I			315

```

947   atg gtt tcc tcc tat gct cga aca aag gaa gcc agt cag gct aaa 991
316   M  V  S  S  Y  A  R  T  K  E  A  S  Q  A  K  330

992   tac ata tcc ata tta aac att att cag gga gaa gtt gat ccc act 1036
331   Y  I  S  I  L  N  I  I  Q  G  E  V  D  P  T  345

1037  cag gtc cat gaa agc ctg cag aga ata agg gaa aga aag ctt gtt 1081
346   Q  V  H  E  S  L  Q  R  I  R  E  R  K  L  V  360

1082  aat ttt att gac tgg ggc cct gct agc att cag gtt gct tta tct 1126
361   N  F  I  D  W  G  P  A  S  I  Q  V  A  L  S  375

1127  agg aag tct cct tat gtc cag acg gct cat agg gtt agt ggt ctc 1171
376   R  K  S  P  Y  V  Q  T  A  H  R  V  S  G  L  390

1172  atg ctc gct agc cat act ggc atc cgg cac tta ttc agc aag tgt 1216
391   M  L  A  S  H  T  G  I  R  H  L  F  S  K  C  405

1217  ttg agc cag tac gat aaa ttg aga aag aga caa gcc ttc ctt gac 1261
406   L  S  Q  Y  D  K  L  R  K  R  Q  A  F  L  D  420

1262  aac tat agg aat cat cca acg ttt gcc gac aat gac cta tca gaa 1306
421   N  Y  R  N  H  P  T  F  A  D  N  D  L  S  E  435

1307  ttt gac gaa tct aga gat gtg att gaa agt cta gtt gac gag tac 1351
436   F  D  E  S  R  D  V  I  E  S  L  V  D  E  Y  450

1352  aag gct tgt gag tcc cca gat tac atc aaa cgg gga atg gag gat 1396
451   K  A  C  E  S  P  D  Y  I  K  R  G  M  E  D  465

1397  ccc gac cat gtt cta aca ggc gaa gga aat gct agt ggg aca gtt 1441
466   P  D  H  V  L  T  G  E  G  N  A  S  G  T  V  480

1442  gat ccc aag tta tct tta tga gca agc tta cta ttc tgt att tta 1486
481   D  P  K  L  S  L  End A  S  L  L  F  C  I  L  495

1487  att ttg cag aac aaa aag gag aat tta ttc gat gta att atc tct 1531
496   I  L  Q  N  K  K  E  N  L  F  D  V  I  I  S  510

1532  gca att taa ccc tga tta gtt ttc tgt atg tga ttc aat ttg ggg 1576
511   A  I  End P  End L  V  F  C  M  End F  N  L  G  525

1577  ctc aac tta ttt gtt agg gtc gta tgg ttt atg gtt acc ggt agt 1621
526   L  N  L  F  V  R  V  V  W  F  M  V  T  G  S

```

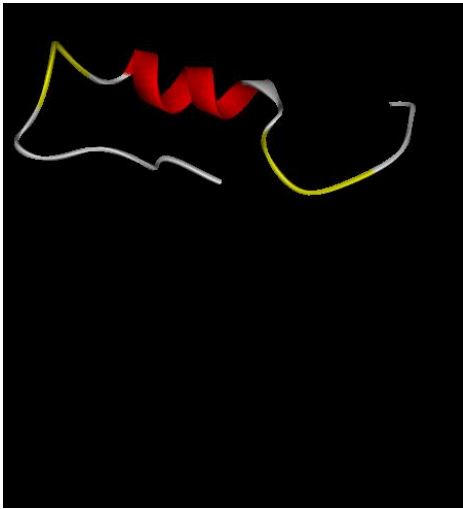
Abb.43: Die Primerbindestellen für die γ -Tubulin-Teilsequenzen sind farblich unterlegt. „ γ -AB“ blau, „ γ -AB+“ orange, sowie „ γ -Tub“ grau. Die Kennzeichnung für die Primerbindestellen für ABC-term. resultiert aus dem forward-Primer „AB+_fw“ (orange) und „AB_C-Term_rw“ (orange/grau).

4.4 Überprüfung der Tertiärstruktur der γ -Tubulin-Konstrukte

Die Fusion mit der GAL4-Bindedomäne kann die natürlich in der Zelle vorkommende Konformation der Köderproteine beeinträchtigen und ihre Funktionalität verändern. Dies kann zur Abnahme der Aktivität und zu einer Unzugänglichkeit der Bindestellen führen (VAN CRIEKINGE & BEYAERT 1999). Die Tertiärstruktur der Konstrukte wurde daher überprüft. Dazu wurden die Sequenzen in die Sequenzdatenbank SwissProt (<http://www.expasy.org/spdbv>) geladen. Durch die Programme *Swiss-PdbViewer*, *Swiss-Model* und *WebLabViewerLITE35* zur dreidimensionalen Illustration der Tertiärstruktur von Proteinen konnten die Proteinstrukturen übereinandergelegt werden, um strukturelle Alignments abzuleiten und die Struktur der aktiven Zentren oder anderer relevanter Domänen mit der homologer Proteine zu vergleichen. Die Datenbank lieferte jeweils eine starke Homologie zu menschlichem γ -Tubulin mit über 90 %iger Übereinstimmung der Tertiärstruktur (Abb. 41). Die Abweichungen sind wahrscheinlich auf die Bereiche der Bindedomäne zurückzuführen, welche die γ -Teilsequenzen flankierten. Die charakteristische Konformation des γ -Tubulin-A/B-Peptidbereichs in einer M-förmigen Schleife (M-Loop) ist vermutlich für eine natürliche Interaktion erforderlich. Die Schleife ist an der Oberfläche des Proteins exponiert und bedingt vermutlich Interaktionen. Der M-Loop konnte auch in einer Fusion mit der Bindedomäne bestätigt werden. Diese Ergebnisse geben Gewissheit bezüglich der korrekten Faltung der Köderkonstrukte, jedoch nur unabhängig von den zellulären Bedingungen der Hefe.

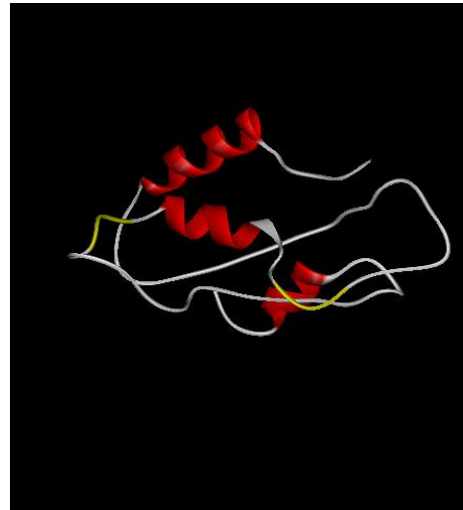
Die Tertiärstrukturen der Köderkonstrukte unter Angabe der Sequenzen des γ -Tubulin-A/B-Peptidbereichs und der GAL4-Bindedomäne ist nachfolgend abgebildet (Abb 41). Die charakteristische Konformation des γ -Tubulin-A/B-Peptidbereichs in einer M-förmigen Schleife ist jeweils deutlich erkennbar (gelb dargestellt). Die Sequenz „ γ -AB“ codiert für die A- und B- γ -Tubulin-Peptidbereiche, die dazwischen liegende Helix (rot) und partiell für die C-terminal folgende Faltblattstruktur. „ γ -AB⁺“ umfasst die flankierenden Faltblattstrukturen vollständig. „ γ -AB_{C-Term}“ codiert ausgehend von der Helix und der Faltblattstruktur vor dem N-terminal liegenden γ -Tubulin-A/B-Peptidbereich bis nahe dem C-Terminus. „ γ -Tub“ codiert für die Vollänge des γ -Tubulin-Peptids.

A



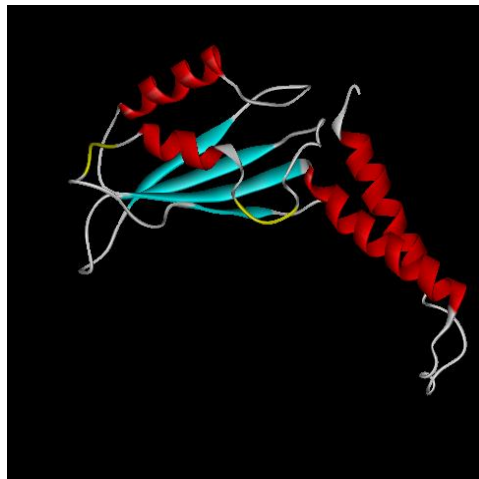
GAL4-BD/γ-AB *Nicotiana tabacum*
827-1040 (214bp) + pGBKT₇-GAL4
BD 1213-1299; 1316-1509

B



GAL4-BD/γAB+ *Nicotiana tabacum*
761-1096 (336bp) + pGBKT₇-GAL4
BD 1213-1299; 1316-1509

C



GAL4-BD/γAB_{C-Term.} *Nicotiana Tabacum*
761-1608 (848bp) pGBKT₇-GAL4
BD 1213-1299; 1316-1509

D



GAL4-BD/γTub *Nicotiana Tabacum*
15-1608 (1593bp) pGBKT₇-GAL4
BD 1213-1299; 1316-1509

Abb. 41 Tertiärstruktur der Köderkonstrukte unter Angabe der Sequenzen des γ -Tubulin-A/B-Peptidbereichs und der GAL4-Bindedomäne. **A:** GAL4-BD/ γ -AB, **B:** GAL4-BD/ γ AB+, **C:** GAL4-BD/ γ AB_{C-Term.}, **D:** GAL4-BD/ γ Tub. Die charakteristische Konformation des γ -Tubulin-A/B-Peptidbereichs in Form eines M-Loops ist deutlich erkennbar (gelb dargestellt).

4.5 Ergebnisse der Zweitstragsynthese

Zur Konstruktion mehrerer cDNA-Bibliotheken wurde die aus der BY2-Kultur isolierte gRNA im Rahmen der BD SMART™ Technologie (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) mit anschließender Zweitstrangsynthese unter Verwendung des Extensor Hi-Fidelity PCR Enzyme Mix (Abgene, Hamburg) eingesetzt. Eine Verwendung von gRNA ohne vorherige Aufreinigung der mRNA wird durch die spezifische Bindung der Primer an die poly(A)-Schwänze der eukaryotischen mRNA ermöglicht (MATCHMAKER™ Library Construction & Screening Kits User Manual 2006). Die erhaltene doppelsträngige cDNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf ein ausreichend breites Größenspektrum der Amplifikate untersucht. Die synthetisierten cDNA-Bibliotheken umfassten Amplifikate zwischen 150 bp und über 5000 bp. Sie genügten qualitativ den Ansprüchen.

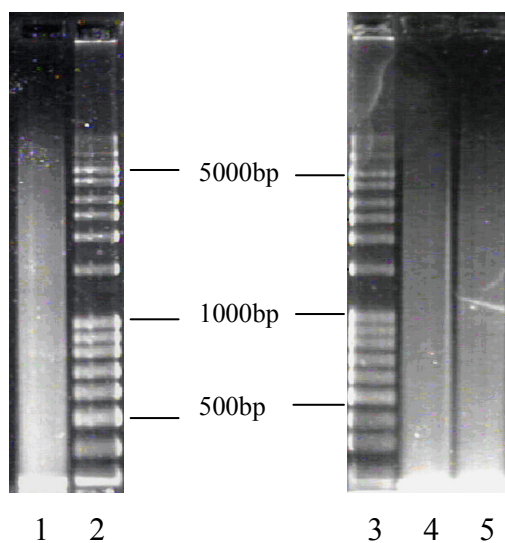


Abb.42: Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliothek. Für die Transformationen der Hefezellen mit dem Beutekonstrukt wurden mehrere cDNA-Bibliotheken hergestellt. Alle umfassten Amplifikate von 150 bp bis über 5000 bp (Spur 2,4,5). Sie genügten qualitativ den Ansprüchen für ein Screening. Marker GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Spur 1,3) SYBR® Gold-Färbung.

Bevor die cDNA-Bibliotheken im Rahmen der Transformation zum Einsatz kamen, wurde der niedermolekulare Bereich unter 300 bp aus einem Agarosegel präparativ entfernt. Die übrigen Bereiche mit dem NucleoSpin® Extract II-Kit von Macherey & Nagel (Düren) aufgereinigt. Die Qualität der Aufreinigung wurde gelelektrophoretisch kontrolliert und als zufriedenstellend beurteilt.

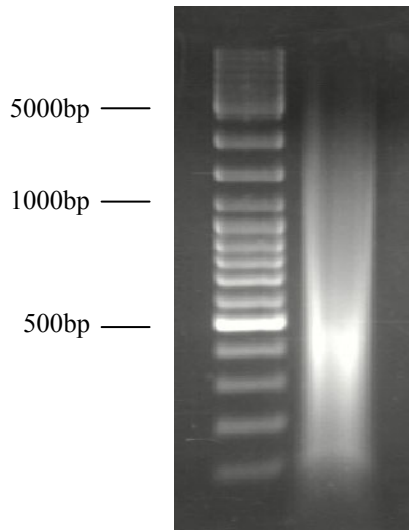


Abb.43: Kontrolle der aufgereinigten cDNA-Bibliotheken. Durch Aufreinigung aus einem präparativen Agarosegel wurde der Bereich unter 300 bp entfernt. Marker GeneRuler™ 1kb DNA Ladder SYBR® Gold-Färbung

4.6 Linearisierung des pGADT₇-Rec-Vektors

In Vorbereitung der simultanen Transformation des Stammes AH 109 bzw. AH109/pGBKT₇/AB, AB⁺, Ab_{c-Term} und γ -Tub mit der cDNA und dem Aktivierungsdomänenvektor pGADT₇-Rec für die anschließend *in vivo* erfolgenden Ligationen durch homologe Rekombination, wurde der pGADT₇-Rec-Vektor mit dem Restriktionsenzym *Sma*I linearisiert. Es entsteht damit flankierend an den Enden des linearisierten Vektors eine der CDS III- und SMART III-Sequenz komplementäre Nukleotidabfolge. Das Ergebnis des Restriktionsverdaus wurde gelelektrophoretisch überprüft. Das Fragment der linearisierten Plasmid-DNA von 8000bp wurde aus dem Agarosegel aufgereinigt und die Aufreinigung ebenfalls gelelektrophoretisch überprüft.

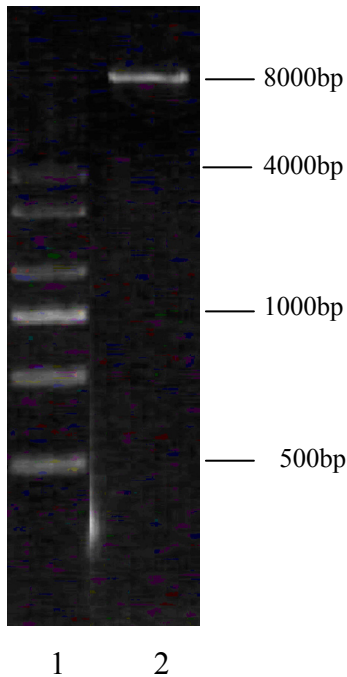


Abb.44: Gelelektrophorese der aufgereinigten Plasmid-DNA. Die deutliche Bande bei etwa 8000bp zeigt, dass der pGADT₇-Rec-Vektor linearisiert vorlag (Spur 2). Er konnte daher zur Transformation der Hefezellen eingesetzt werden. Marker Fast Ruler™ DNA Ladder High Range (Spur 1). 1 %iges Agarosegel. EtBr-Färbung.

Mittels Photometrie wurde die Konzentration des aufgereinigten pGADT₇-Rec-Vektors auf 0,02 µg/µl bestimmt. Zur Transformation kamen daher 5 µl zum Einsatz.

4.7 Transformation von AH109 mit dem pGADT₇-Rec-Vektor und einer aufgereinigten cDNA-Bibliothek

Für das Mating wurden die Hefezellen des Stammes AH109 zunächst mit dem linearisierten pGADT₇-Rec-Vektor und einer aufgereinigten cDNA-Bibliothek transformiert. Die Ligation der Beutesequenzen in den Vektor erfolgte über homologe Rekombination *in vivo*. Positive Transformanten wurden auf SD-Medium/-Leu selektiert. Nach 3 Tagen Inkubationszeit erreichten die Kolonien eine Größe von 0,5-2 mm (Abb.45). Die Transformationseffizienz lag bei $6,96 \times 10^4$ Kolonie bildenden Einheiten/ µg Plasmid-DNA.

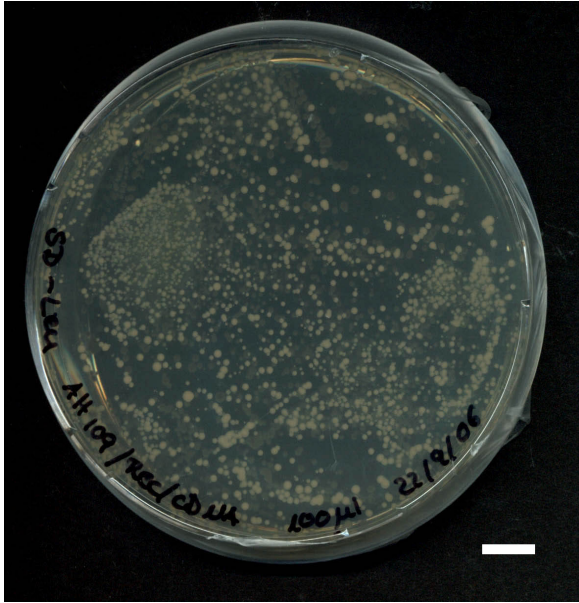


Abb.45: Transformierte Hefezellen des Stammes AH109 mit dem linearisierten pGADT₇-Rec-Vektor und einer aufgereinigten cDNA-Bibliothek. Hefezellen, die den Aktivierungsdomänenvektor pGADT₇-Rec aufgenommen haben, wachsen auf Selektivmedium SD-Leu. Ausplattierung von 100 µl des Transformationsansatzes. Inkubationszeit 3 Tage. Maßstab 1cm.

4.8 Verifizierung der cDNA-Sequenzen im pGADT₇-Rec-Vektor

Um eine Aufnahme der cDNA-Bibliotheken in die Hefezellen und die homologe Rekombination zu verifizieren, wurden die Plasmide aus einer Zellsuspension des transformierten Stammes AH109 extrahiert und mittels Gelelektrophorese nachgewiesen (Abb.46). Es sollte damit gezeigt werden, dass eine gewisse Größenverteilung vorlag. Das Größenspektrum der nachgewiesenen Plasmide im Bereich um 8000 bp lässt unter Berücksichtigung der höheren Laufgeschwindigkeiten von nicht linearisierten Plasmiden in supercoiled-Form auf eine erfolgreiche, durch homologe Rekombination vermittelte Ligation eines cDNA-Inserts in den ursprünglich 8 kbp umfassenden pGADT₇-Rec-Vektor schließen.

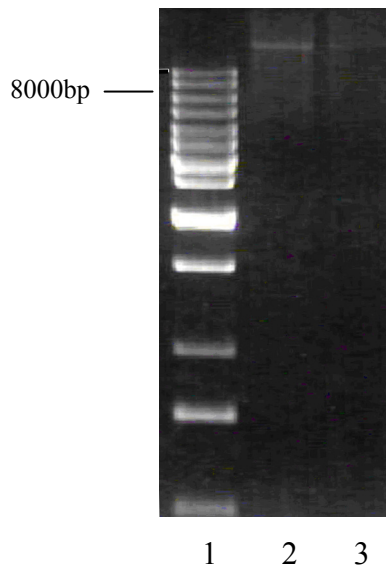


Abb.46: Gelelektrophoretischer Nachweis der extrahierten Plasmide. Die aus Hefezellen des mit dem pGADT₇-Rec-Vektor und der cDNA transformierten Stammes AH 109 extrahierten Plasmide wurden im Anschluss an die Extraktion gelelektrophoretisch nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der höheren Laufgeschwindigkeit von Plasmiden in supercoiled-Form konnte das Größenspektrum im Bereich um 8 kb als Indiz herangezogen werden, dass der ursprünglich 8 kb große pGADT₇-Rec-Vektor ein cDNA-Insert aufgenommen hatte. Aufgetragen wurden 4µl Plasmide (Spur 1), 8 µl Plasmide (Spur 2) und 5 µl DNA-Gößenmarker 100bp+ (Spur 3). 1%iges Agarosegel. Ethidiumbromidfärbung.

Um die Präsenz eines breiten Spektrums an cDNA-Sequenzen in den Zellen sicherzustellen, wurde eine PCR der extrahierten Plasmide mit den Vektorprimern AD-Sequencing und T7 durchgeführt und gelelektrophoretisch analysiert (Abb.47). Die PCR lieferte den Hinweis, dass cDNA-Sequenzen in der Größenordnung von 300 bp bis 1500 bp erfolgreich in die Hefezellen transformiert und durch homologe Rekombination in den Aktivierungsdomänenvektor pGADT₇-Rec ligiert werden konnten. Die transformierten Hefezellen des Stammes AH109 wurden für ein Mating mit Zellen des Stammes Y187 als qualitativ geeignet erachtet, welche mit den Bindedomänenvektoren der jeweiligen γ -Tubulin-Köderkonstrukte transformiert wurden.

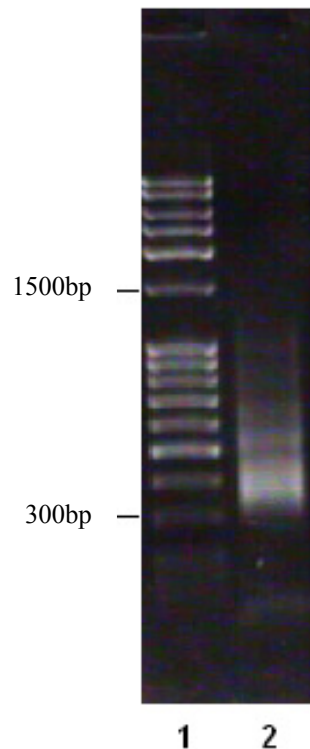


Abb.47: Nachweis eines relativ breiten cDNA-Spektrums in den transformierten Hefezellen. Die in die Plasmide ligierten cDNA-Sequenzen umfassen ein Größenspektrum von 300 bp bis etwa 1500 bp Marker GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Spur 1). 1,5%iges Agarosegel. Ethidiumbromidfärbung.

4.9 Kontrollvektoren-Test

4.9.1 Transformation der Hefestämme mit den Kontrollvektoren

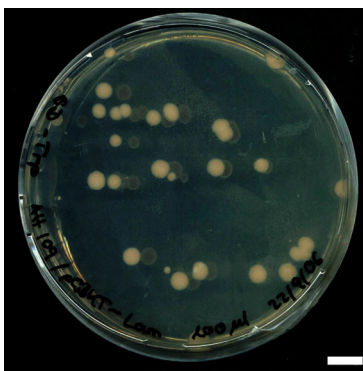
Das Prinzip des Yeast-Two-Hybrid Systems beruht darauf, dass die Hefestämme nur aufgrund einer Interaktion der beiden Hybridkonstrukte induzierten Transkription der Reportergene auf entsprechenden Mangelnährmedien wachsen können. Dafür wurden die Phänotypen der Stämme AH109 und Y187 verifiziert (4.1). Es wurde trotzdem in allen Versuchsreihen eine Positiv- und Negativkontrolle als Referenz hinzugezogen, um die Qualität der Transformation zu beurteilen und Mutationen der Hefezellen ausschließen zu können.

4.9.2 Transformation von AH109 und Y187 mit den BD-Kontrollvektoren pGBKT₇-53 und pGBKT₇-Lam

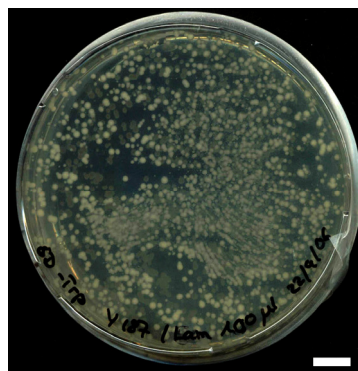
Für die sequentielle Co-Transformation wurden Zellen des Stammes AH109, und für das Mating Zellen der Hefekultur Y 187 mit dem Positiv-Kontrollvektor pGBKT₇-53 und dem Negativ-Kontrollvektor pGBKT₇-Lam transformiert. Die Inkubation der transformierten Hefezellen erfolgte auf SD-Trp-Medium. Nach 6 Tagen erreichten die Kolonien des Stammes AH 109 eine Größe von 6-7 mm Ø. Die Y 187-Kolonien waren mit 1-2 mm Durchmesser deutlich kleiner (Abb.48). Die Transformationseffizienzen lagen bei maximal $7,5 \times 10^4$ koloniebildenden Einheiten pro μg Plasmid-DNA (Tab.11).

Transformierter Stamm	Bezugsvektor	Transformationseffizienz Koloniebildende Einheiten/ μg Plasmid-DNA
AH109	pGBKT ₇ -Lam (0,1 μg)	$1,175 \times 10^3$
AH109	pGBKT ₇ -53 (0,1 μg)	$5,5 \times 10^2$
Y187	pGBKT ₇ -Lam (0,1 μg)	$7,5 \times 10^4$
Y187	pGBKT ₇ -53 (0,1 μg)	$3,96 \times 10^3$

Tab.11: Effizienzen der Transformation von AH 109 und Y 187 mit den Kontrollvektoren pGBKT₇-53 und pGBKT₇-Lam.



AH109/pGBKT₇-Lam



Y187/pGBKT₇-Lam

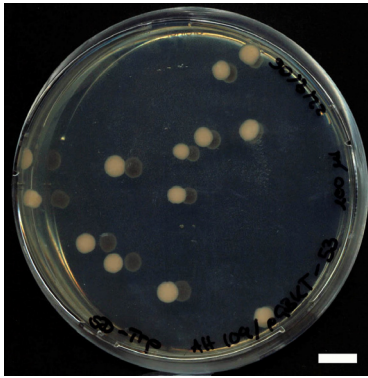
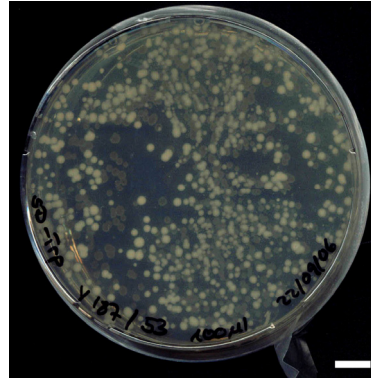
AH109/pGBKT₇₋₅₃Y187/pGBKT₇₋₅₃

Abb.48: Transformation der Hefestämme AH109 und Y187 mit den Bindedomäne-Kontrollvektoren für die Negativ- und Positivkontrolle mit den Vektoren pGBKT-Lam und pGBKT-53. Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen auf SD-Trp-Medium erreichten die transformierten AH 109-Kolonien eine Größe von 6-7 mm Durchmesser. Kolonien des Stammes Y 187 waren unter gleichen Bedingungen zahlreicher, aber mit maximal 2 mm Durchmesser deutlich kleiner. Ausplattiert wurden jeweils 100 μ l. Der Maßstab entspricht 1 cm.

4.9.3 Transformation von AH 109 mit dem AD-Kontrollvektor pGADT_{7-T}

Im Rahmen des Matings der transformierten Y187-Hefestämme mit BD-Kontrollvektoren, wurde der Stamm AH109 mit dem Aktivierungsdomäne-Kontrollvektor pGADT_{7-T} transformiert. Nach 6 Tagen Inkubation auf SD-Leu erreichten die Kolonien eine Größe von ca. 1-4 mm (Abb.49). Die Transformationseffizienz lag bei $8,69 \times 10^3$ koloniebildenden Einheiten pro μ g Plasmid-DNA.

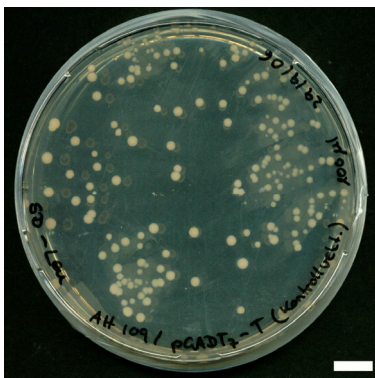
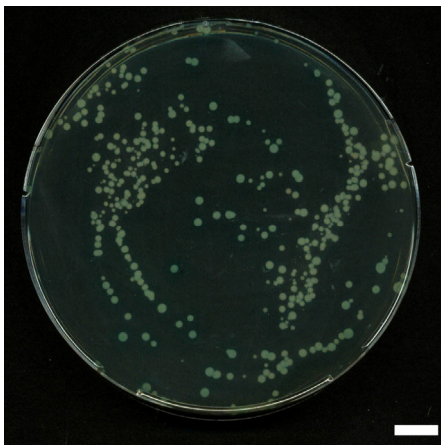


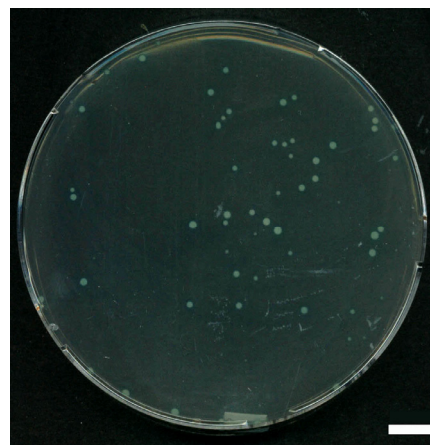
Abb.49: pGADT_{7-T} transformierte Kolonien des Stammes AH109. Nach 6-tägiger Inkubationszeit auf SD-Leu erlangten sie eine Größe von 1-4 mm. Ausstrich von 100 μ l Transformationsansatz. Der Maßstab entspricht 1 cm.

4.10 Transformation mit dem Referenzvektor pCL1

Neben den Kontrollen bezüglich der Nahrungsreportergene wurde zusätzlich eine Referenz der MEL1-Expression durchgeführt, um die Intensität der Blaufärbung beurteilen zu können. Sie wird durch die Spaltung von X- α -Gal hervorgerufen. Das Plasmid pCL1 kodiert für die Volllänge des wildtypischen GAL4-Proteins und aktiviert alle unter der Kontrolle der GAL4-UAS befindlichen Reportergene. Es wurde daher sowohl AH109 als auch Y187 mit diesem Plasmid transformiert. Die Ausplattierung erfolgte mit 150 μ l und 100 μ l der Transformationsansätze auf SD-Leu/X- α -GAL-Platten. Nach 5 Tagen Inkubationszeit waren 369 bzw. 201 Kolonien von AH109/pCL1 zu einer Größe von 0,5-2,5 mm herangewachsen. Die 109 bzw. 60 koloniebildenden Einheiten von Y187/pCL1 erreichten eine Größe von 0,5-2 mm. Alle Kolonien zeigten eine deutliche Blaufärbung. (Abb.50). Die Transformationseffizienz betrug bei AH 109/pCL1 $1,118 \times 10^4$ koloniebildende Einheiten/ μ g Plasmid-DNA, bei Y 187/pCL1 $3,316 \times 10^3$ koloniebildenden Einheiten/ μ g Plasmid-DNA und somit etwa eine Größenordnung niedriger. Die transformierten Stämme wurden für die durch Expression des MEL1 Reportergens verursachte Blaufärbung in Mating und sequentieller Transformation gescreenten Hefezellen als Referenz verwendet.



AH109/pCL1

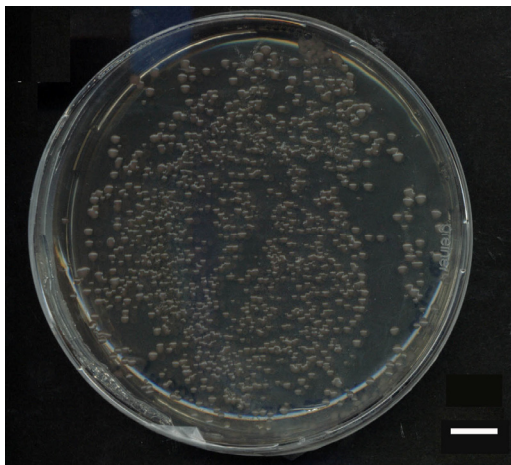
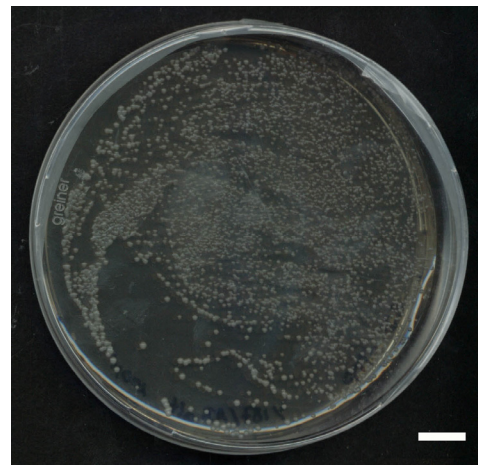
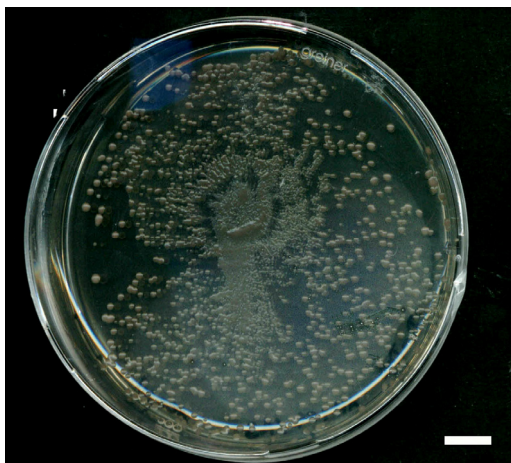
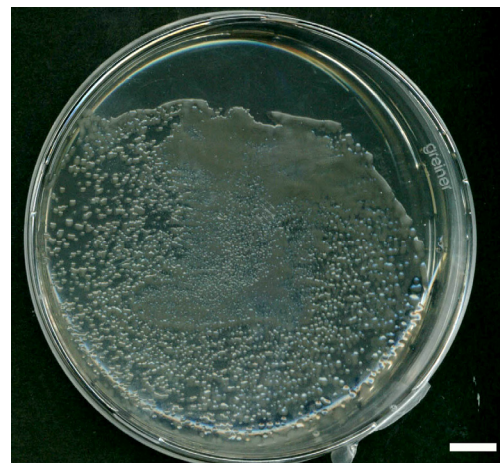


Y187/pCL1

Abb.50: pCL1-transformierte Hefekolonien der Stämme AH 109 und Y 187. Referenz zur Bewertung der Blaufärbung gescreenter Kolonien. Das Plasmid pCL1 codiert für die Volllänge des wildtypischen GAL4-Proteins und aktiviert alle unter der Kontrolle der GAL4-UAS befindlichen Reportergene. Die dadurch bedingte Spaltung von X- α -GAL führt zu einer Blaufärbung der Hefekolonien. Erreichter Durchmesser: max. 2,5 mm. Inkubationszeit 5 Tage auf SD-Leu/X- α -GAL. Ausstrich von 100 μ l. Der Maßstab entspricht 1 cm.

4.11 Transformation von AH109 und Y187 mit den Bindedomänen-Vektoren pGBKT₇/AB, pGBKT₇/AB+, pGBKT₇/γ-Tub und pGBKT₇/AB_{C-term}.

Im Vorfeld des Matings wurde der Hefestamm Y187, für die sequentielle Transformation der Hefestamm AH109 mit den Bindedomänenvektoren pGBKT₇ transformiert. Die Bindedomänenvektoren enthielten vier unterschiedlich lange γ-Tubulin-Teilsequenzen um den A/B-Peptidbereich: γ-Tub, γ-AB, γ-AB+ und γ-AB_{C-term}. Nach 6 Tagen Inkubationszeit auf SD-Trp-Medium waren zwischen 246 und 4800 koloniebildende Einheiten pro Platte mit einer durchschnittlichen Größe von 0,5-2,5 mm gewachsen. Generell waren Unterschiede im Wachstum der beiden Stämme zu beobachten. Zellen des Stammes AH109 erlangten in begrenzter Anzahl eine Größe von bis zu 2,5 mm. Das zahlreiche Wachstum von Y187-Kolonien erreichte maximal 1 mm Durchmesser.

AH109/pGBKT₇/ABY187/pGBKT₇/ABAH109/pGBKT₇/AB+Y187/pGBKT₇/AB+

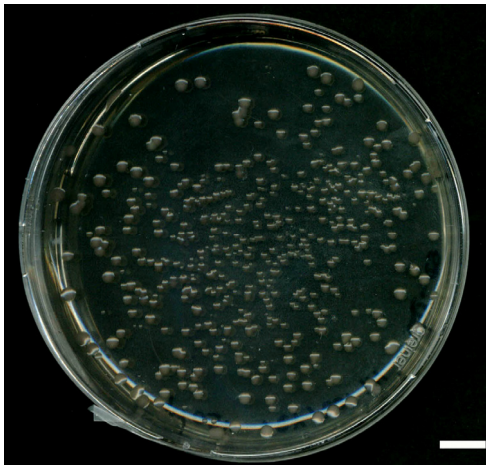
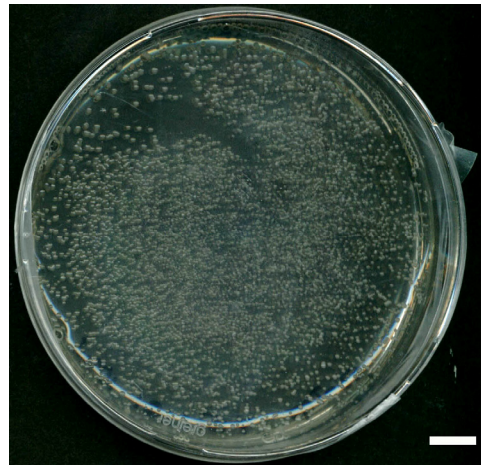
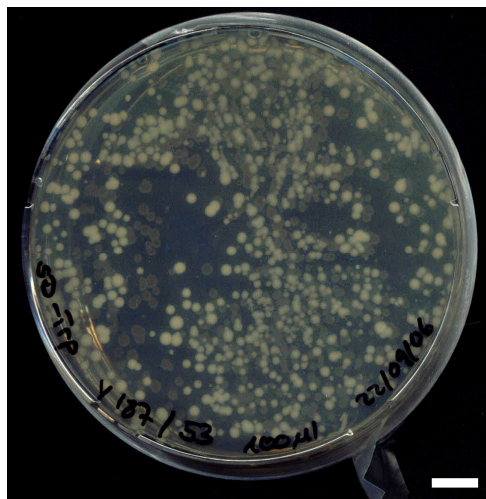
AH109/pGBKT₇/AB_{C-term.}Y187/pGBKT₇/AB_{C-term.}AH109/pGBKT₇/AB-γ-Tub

Abb.51: Transformierte Hefezellen der Stämme AH 109 und Y 187 mit den Bindedomänenvektoren pGBKT₇. Die Bindedomänenvektoren pGBKT₇ tragen unterschiedlich große Insertsequenzen des γ -Tubulin (γ -Tub, γ -AB, γ -AB⁺ und γ -AB_{C-term.}). Die Kolonien der transformierten Stämme erreichten eine Größe von 0,5-2,5 mm. Kolonien des Stammes AH 109 erreichten eine Größe von bis zu 2,5 mm, Y 187-Kolonien wurden maximal 1mm groß. Ausstrich von 100 μ l. Inkubationszeit 6 Tage auf SD-Trp-Medium. Der Maßstab entspricht 1 cm.

Die Transformationseffizienz lag zwischen $1,2 \times 10^4$ und $1,385 \times 10^5$ koloniebildenden Einheiten pro μ g Plasmid-DNA (Tab. 12). Im Allgemeinen waren sie beim Hefestamm Y 187 höher als beim Hefestamm AH 109.

Transformierter Stamm	Bezugsvektor	Transformationseffizienz
		Koloniebildende Einheiten/ μ g Plasmid-DNA
AH109	pGBKT ₇ /AB	$2,994 \times 10^4$
AH109	pGBKT ₇ /AB+	$4,243 \times 10^4$
AH109	pGBKT ₇ /AB _{C-Term.}	$1,2 \times 10^4$
AH109	pGBKT ₇ / γ -Tub	$3,44 \times 10^4$
Y187	pGBKT ₇ /AB	$9,46 \times 10^4$
Y 187	pGBKT ₇ /AB+	$1,311 \times 10^5$
Y187	pGBKT ₇ /AB _{C-Term.}	$1,385 \times 10^5$

Tab.12: Effizienzen der Transformation von AH109 und Y187 mit den Bindedomänenvektoren pGBKT₇/AB, pGBKT₇/AB+, pGBKT₇/ABC-term. und γ -Tub.

4.12 Nachweis der pGBKT₇-Plasmide und Verifizierung der γ -Tubulin-Peptidsequenzen

Die Transformation der pGBKT₇-Vektoren mit den Sequenzen der verschiedenen γ -Tubulin-Sequenzen in die Hefezellen wurden verifiziert. Dazu wurden Plasmidextraktionen durchgeführt und die extrahierten Plasmide in einer PCR mit den Vektorprimern BD-Sequencing und T7 eingesetzt. Die Fragmentgrößen der erhaltenen Amplifikate betragen unter Berücksichtigung der 280 zusätzlich amplifizierten Basenpaare bedingt durch den Vektor ca. 494bp (γ -AB), ca. 618bp (γ -AB+), ca. 1130bp (γ -AB_{C-Term.}) und ca.1904bp (γ -Tub). Sie suggerierten, dass es sich um die Sequenzen des γ -Tubulin- Peptidbereichs handelte.

4.13 Prüfung auf Eigenaktivierung der Reportergene durch die Köderkonstrukte

Der Hefestamm AH 109 besitzt vier verschiedene Reportersysteme, welche alle GAL4 induzierbar sind. Im Yeast Two-Hybrid System soll es nur dann zu einem Start der Transkription der Reportergene kommen, wenn ein Zusammenschluß der DNA-

Bindedomäne mit der DNA-Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors durch Interaktion der Hybridproteine stattfindet. Die Detektion von Interaktionspartnern der Köderproteine im Yeast-Two-Hybrid System beruhen also darauf, dass nur eine Interaktion der Hefestämme mit den Hybridkonstrukten und der dadurch induzierten Transkription der Reportergene auf einem entsprechenden Mangelnährmedien wachsen können. Daher musste in Vorversuchen nachgewiesen werden, dass durch die neu konstruierten Bindedomäne-Hybridproteine keine Eigenaktivierung und Transkription eines oder mehrerer der vier GAL4-induzierten Reportergene in AH109 erfolgt. Der Stamm Y187 trägt nur das lacZ-Reportergen unter Regulation der GAL1 UAS. Eine Transkription der für die Selektion relevanten Aminosäuren in diesem Stamm ist somit ausgeschlossen. Um Rückschlüsse auf die Wachstumsfähigkeit dieses Stammes in Abwesenheit der für ihn essentiellen Aminosäuren zu ziehen, wurde er wie der Stamm AH 109 behandelt.

Die Stämme wurden dazu im Rahmen eines „Small Scale“-Ansatzes mit den BD-Hybridproteinen (pGBKT₇/γ-Tub, pGBKT₇/AB, pGBKT₇/AB⁺ und pGBKT₇/AB_{C-Term.}) transformiert. Als Negativkontrolle erfolgte eine Transformation mit einem pGBKT₇-Vektor ohne Ködersequenz. 100 µl der Transformationsansätze wurden auf SD-Trp/ X-α-Gal, SD-His/-Trp/ X-α-Gal, SD-Ade/-Trp/ X-α-Gal ausplattiert. Das Wachstum auf SD-Trp/ X-α-Gal diente als positive Referenz. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Nach 7 Tagen hatten die auf SD/-Trp/X-aGal Platten gewachsenen Kolonien einen Durchmesser von bis zu 4mm. Die Transformationen mit den pGBKT7 Vektoren waren somit erfolgreich. Auf mittelstringenten Platten SD/-Trp/-Ade/X-aGal kam es auch nach sieben Tagen zu keinem Wachstum. Auf denSD/-Trp/-His/X-aGal Platten kam es bei den Transformationsansätzen zum Wachstum sehr kleiner Kolonien, deren Durchmesser jedoch 0,5mm nicht überstieg (Abb.52). Der konstruierte pGBKT₇/γ-Tubulin Bindedomänenvektor führte demnach nicht zu einer Eigenaktivierung der GAL4 induzierten Nahrungs- und Farbreportergene. Das cDNA-Bibliothek Screenings mit den Vektoren konnten nachfolgend durchgeführt werden.

Stamm AH109

Selektiv- medium	Größe und Blaufärbung nach 7 Tagen				
	pGBKT7	pGBKT7/ γ -AB	pGBKT7/ γ -AB+	pGBKT7/ γ -AB _{C-Term.}	pGBKT7/ γ -Tub
SD-Trp/ X- α -Gal	7 mm (+)	1-2 mm (-)	2 mm (-)	1 mm (-)	1 mm
SD-Trp/ -His/X- α -Gal	0,5-2 mm (-/1Kolonie schwach +)	Schwaches Hintergrundw. (-)	Schwaches Hintergrundw. (-)	1 Kolonie 1 mm (-)	Schwaches Hintergrundw. (-)
SD-Trp/ -Ade/X- α -Gal	0,5 mm (-)	-	-	-	-

Tab.13: Größe und Blaufärbung der mit den Konstrukten transformierten Hefekultur Ah109 im Eigenaktivierungstests. Angegeben sind die durchschnittlichen Durchmesser der Hefekolonien in mm und die Blaufärbung (-/+).

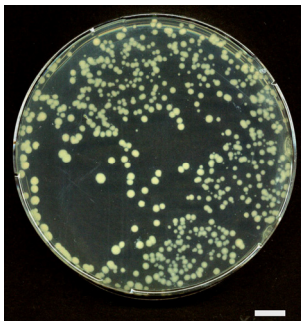
Stamm Y187

Selektiv- medium	Größe und Blaufärbung nach 7 Tagen			
	pGBKT7	pGBKT7/ γ -AB	pGBKT7/ γ -AB+	pGBKT7/ γ -AB _{C-Term.}
SD-Trp/ X- α -Gal	4 mm (-)	Einige Kolonien (-)	Viele Kolonien (-)	0,5 mm (-)
SD-Trp/-His/ X- α -Gal	0,5 mm	Schwaches Hintergrundwachstum (-)	-	Schwaches Hintergrundwachstum (-)
SD-Trp/-Ade/ X- α -Gal	0,1 mm	-	-	Schwaches Hintergrundwachstum (-)

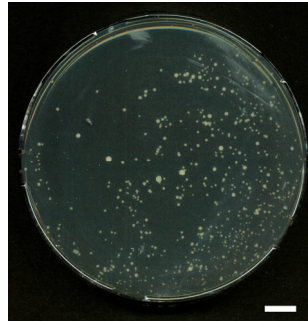
Tab.14: Größe und Blaufärbung der mit den Konstrukten transformierten Hefekultur Y187 im Eigenaktivierungstests. Angegeben sind die durchschnittlichen Durchmesser der Hefekolonien in mm und die Blaufärbung (-/+).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Hefekulturen wie erwartet auf SD-Trp/X- α -Gal wuchsen, jedoch teilweise in ihrer Größe begrenzt blieben. Die neu konstruierten Hybridproteine wirkten zwar nicht toxisch, aber sie beeinträchtigen wahrscheinlich den Stoffwechsel der Hefen. Insgesamt war eine deutliche Zunahme des Wachstums ab dem 3. bis zum 7. Tag zu beobachten, und es kam entgegen der Erwartungen nach 7 Tagen besonders auf den SD-Trp/-His/X- α -Gal-Platten, teilweise aber auch auf SD-Trp/-Ade/X- α -Gal zu einem schwachen Hintergrundwachstum mit einer Zellgröße von maximal 0,5 mm. Das Hintergrundwachstum wurde auch bei der Negativkontrolle des BD-Plasmids ohne Ködersequenz beobachtet. Der Grund könnten die Stoffwechsel-

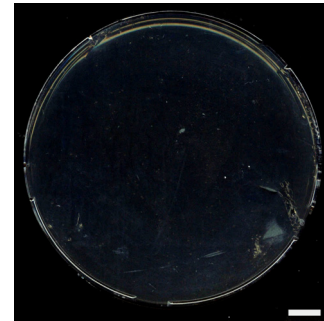
mechanismen des Stammes sein. Die Problematik einer schwachen HIS3-Expression bei AH109 ist hinreichend bekannt (MATCHMAKER™ Library Construction & Screening Kits User Manual). Da bei beiden Screening-Strategien aber über HIS3, ADE2 und MEL1 selektiert werden sollte und die Kolonien einen Durchmesser von 0,5 mm nicht überschritten, wurden die Köderkonstrukte zum Screening einer cDNA-Bibliothek eingesetzt. Trotzdem war bezüglich der Bewertung positiver Kolonien im Rahmen des Screenings Vorsicht geboten. Aufgrund der äußerst geringen Intensität der Blaufärbung auf SD-Trp/X- α -Gal bzw. einer AH109-Kolonie auf SD-Trp/-His/X- α -Gal-Platten, im Vergleich mit den pCL1 transformierten Kolonien, schienen diese vernachlässigt werden zu können. Das Hintergrundwachstum des Stammes Y187 bis zu einer Koloniegröße von zum Teil 0,5 mm veranlasste eine vorsichtigen Selektion scheinbar positiver Kolonien des Matings, besonders solcher, welche erst nach 5-7 Tagen wuchsen.



**AH109/pGBKT₇
auf SD-Trp/X- α -Gal**



**AH109/pGBKT₇
auf SD-Trp/-Ade/X- α -Gal**



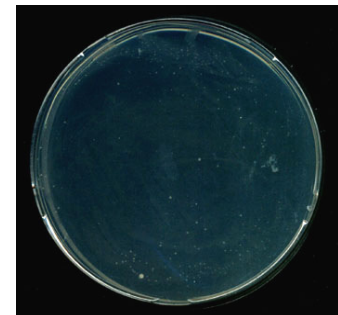
**AH109/pGBKT₇
auf SD-Trp/-His/X- α -Gal**



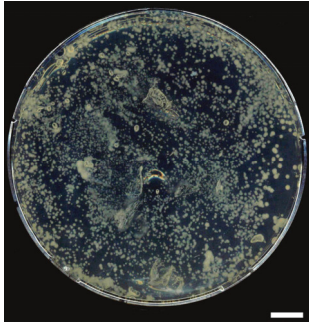
**AH109/pGBKT₇/ γ -Tub
auf SD-Trp/X- α -Gal**



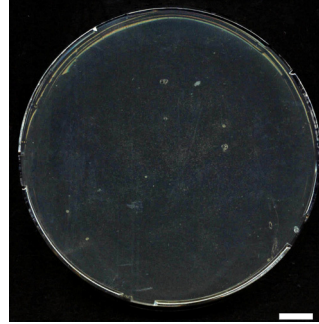
**AH109/pGBKT₇/ γ -Tub
auf SD-Trp/-His/X- α -Gal**



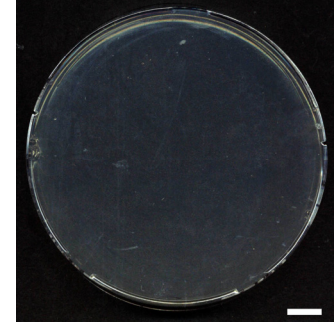
**AH109/pGBKT₇/ γ -Tub
auf SD-Trp/-Ade/X- α -Gal**



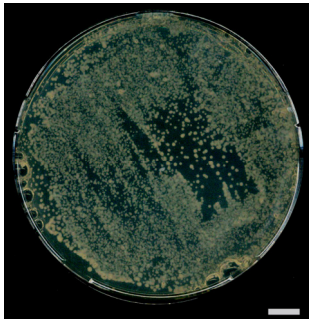
AH109/pGBKT₇/γ-AB+
auf SD-Trp/X-α-Gal



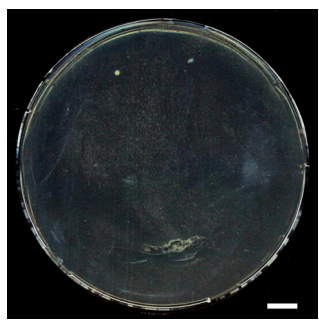
AH109/pGBKT₇/γ-AB+
auf SD-Trp/-His/X-α-Gal



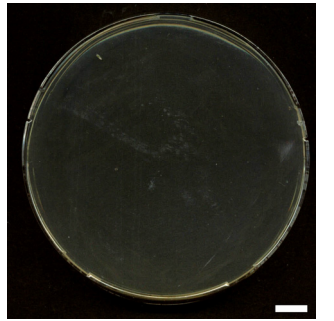
AH109/pGBKT₇/γ-AB+
auf SD-Trp/-Ade/X-α-Gal



AH109/pGBKT₇/γ-AB_{C-Term.}
auf SD-Trp/X-α-Gal



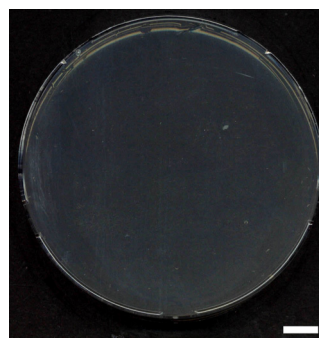
AH109/pGBKT₇/γ-AB_{C-Term.}
auf SD-Trp/-His/X-α-Gal



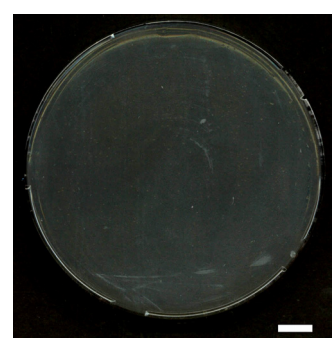
AH109/pGBKT₇/γ-AB_{C-Term.}
auf SD-Trp/-Ade/X-α-Gal



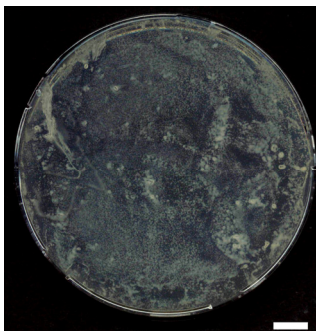
Y187/pGBKT₇
auf SD-Trp/X-α-Gal



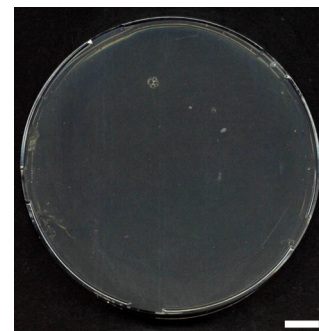
Y187/pGBKT₇
auf SD-Trp/-His/X-α-Gal



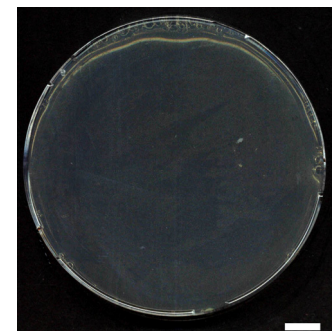
Y187/pGBKT₇
auf SD-Trp/-Ade/X-α-Gal



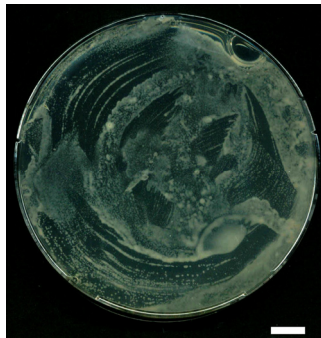
Y187/pGBKT₇/γ-AB+
auf SD-Trp/X-α-Gal



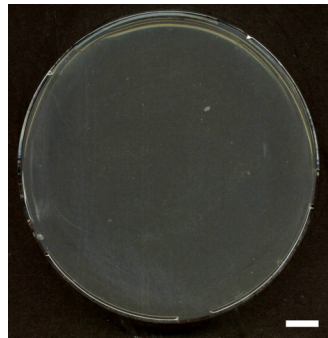
Y187/pGBKT₇/γ-AB+
auf SD-Trp/-His/X-α-Gal



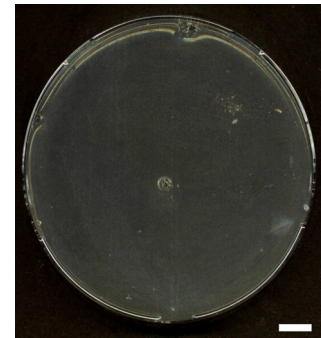
Y187/pGBKT₇/γ-AB+
auf SD-Trp/-Ade/X-α-Gal



**Y187/pGBKT₇/γ-AB_{C-Term}
auf SD-Trp/X-α-Gal**



**Y187/pGBKT₇/γ-AB_{C-Term}
auf SD-Trp/-His/X-α-Gal**



**Y187/pGBKT₇/γ-AB_{C-Term}
auf SD-Trp/-Ade/X-α-Gal**

Abb.52 Die auf SD-Trp/X-α-Gal-Medium ausplattierten Hefekulturen zur Positivkontrolle erreichten einen Durchmesser von 0,5-7 mm pro Kolonie. Generell war bei Zellen des Stammes AH109 eine relativ starke HIS3-Expression zu beobachten, die sich bei Y187 in schwachem Hintergrundwachstum niederschlug (Mitte). Auf SD-Trp/-Ade/X-α-Gal zeigten nur 109/pGBKT₇, 187/pGBKT₇ und Y 187/pGBKT₇/ AB_{C-Term} schwaches Hintergrundwachstum bis zu einer Kolonigröße von maximal 0,5 mm. Jeweils Verteilungsausstrich von 100 µl Zellsuspension. Der Maßstab entspricht 1 cm.

4.14 Screening einer cDNA-Bibliothek durch sequentielle Transformation

Die mit den unterschiedlichen Bindedomänenvektoren transformierten AH109-Kulturen, welche das Protein exprimierten, zeigten keinen Selektionsnachteil. Es wurde daher die sequentielle Transformation bevorzugt. Sie erfordert eine deutlich geringere Menge an Plasmid-DNA als eine simultane Transformation (YEAST PROTOCOLS HANDBOOK 2001, MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual). Des Weiterem ist bei einer simultanen Transformation die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme von zwei Plasmiden niedriger, was die Transformationseffizienz um eine gewisse Größenordnung verringert (VAN CRIEKINGE & BEYAERT 1999). Diese Problematik konnte durch eine sequentielle Transformation umgangen werden.

Die bereits mit den verschiedenen Bindedomänenvektoren transformierten Hefezellen wurden einer Transformation mit dem Aktivierungsdomänenvektor pGADT₇-Rec und der aufgereinigten cDNA-Bibliothek unterzogen. 100 µl eines Transformationsansatzes wurden jeweils zunächst auf SD-Trp/-Leu ausplattiert, um den Zellen die Expression der in den cDNA-Bibliotheken codierten Proteine zu ermöglichen. Nach 6 Tagen wurden sie mittels eines Replikationsstempels auf SD-Trp/-Leu/-His überimpft.

Aufgrund der Ergebnisse des Eigenaktivierungstests wurden nur Kolonien als positiv bewertet, welche nach 6 Tagen einen Durchmesser von mindestens 1 mm hatten. Die ca. 45 Kolonien pro Ansatz wurden in QDO-Flüssigmedium resuspendiert und in Verdünnungsausstrichen auf QDO-Medium überführt. Bei dem Versuchsansatz von AH109/pGBKT₇/γ-Tub/pGADT-Rec/cDNA konnten nach 6 Tagen 6 Kolonien deutlich, 5 als mittelmäßig und 3 als schwach positiv angesehen werden (Abb.53). Beim Ansatz AH 109/pGBKT₇/γ-AB/pGADT-Rec/cDNA wuchsen nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen 5 Kolonien, nach 6 Tagen weitere 6 (Abb.54). Vom Versuchsansatz AH 109/pGBKT₇/γ-AB+/pGADT-Rec/cDNA wurden insgesamt 6 Kolonien nach 6 Tagen als positiv beurteilt, von denen 4 bereits nach 3 Tagen einen Durchmesser von 1 mm erreicht hatten (Abb.55). Die 4 Kolonien des Stammes AH 109/pGBKT₇/γ-AB_{C-Term}/pGADT-Rec/cDNA konnten nach 6 Tagen Inkubationszeit als positiv erachtet werden (Abb.56). Sämtliche Kolonien der Positivkontrolle AH 109/pGBKT₇-53/pGADT₇-T wuchsen auf QDO-Medium. Bei der Negativkontrolle AH 109/pGBKT₇-Lam/pGADT₇-T (Abb.57) erfolgte kein Wachstum.

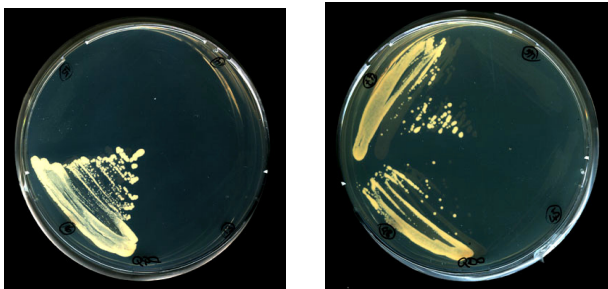


Abb.53: AH109/pGBKT₇/γ-Tub x pGADT-Rec/cDNA auf QDO-Medium. 14 der ca. 40 ausgestrichenen Kolonien wuchsen auf höchststringentem Medium. Exemplarisch sind 2 Platten abgebildet. Verdünnungsausstrich

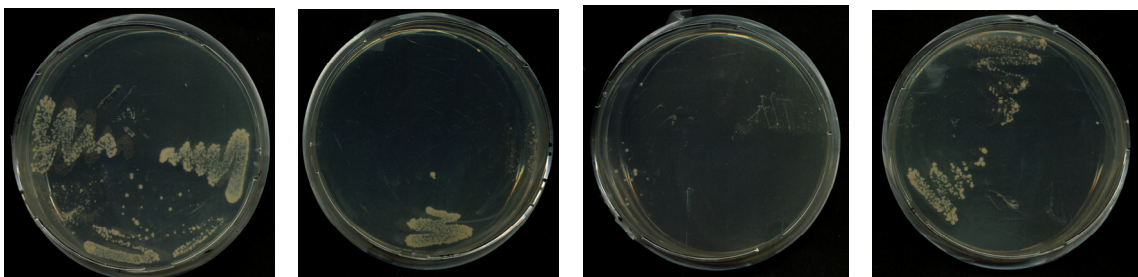


Abb.54: AH109/pGBKT₇/γ-AB x pGADT-Rec/cDNA auf QDO-Medium. 11 der ca. 40 ausgestrichenen Kolonien wuchsen auf höchststringentem Medium. Verdünnungsausstrich.



Abb.55: AH109/pGBKT₇/γ-AB+ x pGADT-Rec/cDNA auf QDO-Medium. Von den etwa vierzig ausgestrichenen Kolonien waren nach 6 Tagen Inkubationszeit 6 positiv. Verdünnungsausstrich.

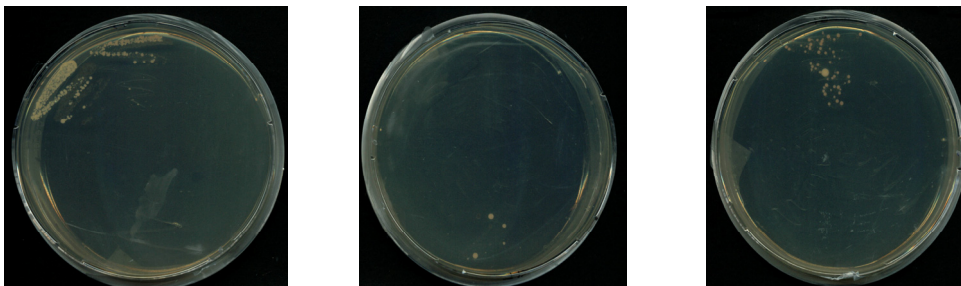


Abb.56: AH109/pGBKT₇/γ-AB_{C-Term} x pGADT-Rec/cDNA auf QDO-Medium. Nach 6 Tagen konnten 4 positive Kolonien dokumentiert werden. Verdünnungsausstrich. Von den etwa vierzig ausgestrichenen Kolonien waren nach 6 Tagen Inkubationszeit 6 positiv. Verdünnungsausstrich.

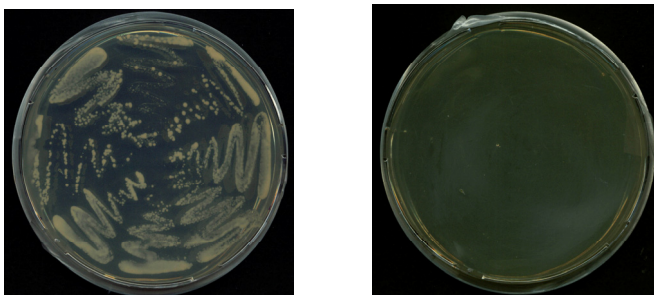


Abb.57: Sämtliche Kolonien der Positivkontrolle zeigten starkes Wachstum. Die Negativkontrolle zeigte kein Wachstum auf QDO Verdünnungsausstriche

Je eine koloniebildende Einheit der als positiv erachteten Hefekulturen wurde in QDO-Flüssigmedium resuspendiert und in einem Verdünnungsausstrich auf QDO+-Agarmedium (SD-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-Gal) ausgestrichen. Nach 5 Tagen wurden mittels Intensitätsvergleich der Blaufärbung mit den pCL1-transformierten AH 109-Zellen von den 14 AH109/pGBKT₇/γ-Tub/pGADT-Rec/cDNA 6 als stark, 5 als mittelmäßig und 3 als schwach beurteilt. Von den insgesamt 11 positiven AH109/pGBKT₇/γ-AB/pGADT-Rec/cDNA-Kolonien wurden 3 als stark, 4 als mittelmäßig und weitere 4 als schwach beurteilt. Von den 6 AH109/pGBKT₇/γ-

AB+/pGADT-Rec/cDNA-Kolonien waren 3 stark, 2 mittelmäßig und 1 schwach blaufärbt. Die Blaufärbung von 3 der 4 positiven AH 109/pGBKT₇/γ-AB_{C-Term₂}/pGADT-Rec/cDNA-Kolonien wurde als stark eingestuft. Die vierte war nur mittelmäßig gefärbt (Tab14).

	schwach	mittelmäßig	stark
AH109/pGBKT ₇ /γ-AB/Rec/cDNA	4	4	3
AH109/pGBKT ₇ /γ-AB+/Rec/cDNA	1	2	3
AH109/pGBKT ₇ /γ-AB _{C-Term₂} /Rec/cDNA	-	1	3
AH109/pGBKT ₇ /γ-AB _{γ-Tub₂} /Rec/cDNA	3	5	6

Tab.14: Unterschiedlich starke Blaufärbung bei der Kulturen der sequentiellen Transformation

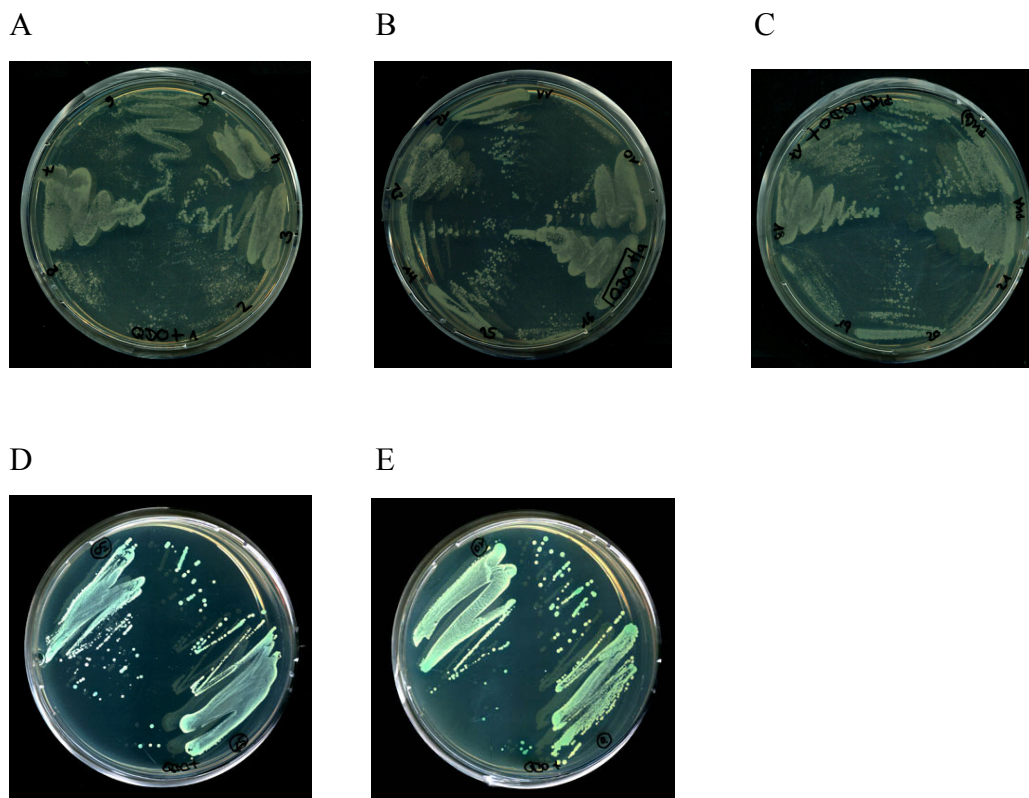


Abb.58: Doppelt transformierte AH109-Kulturen auf QDO+-Medium. Alle der 26 auf QDO-Medium gewachsenen Hefekulturen setzen nach 5 Tagen Inkubation auf QDO+-Medium enzymatisch X-α-Gal um. Sie zeigten durch das freigesetzte Spaltprodukt 5-Brom-4-chlor-3-indol eine Blaufärbung. Es konnten jedoch Unterschiede hinsichtlich der Intensität dieser Blaufärbung beobachtet werden. **A:** γ-AB; **B:** γ-AB+; **C:** γ-AB_{C-Term}; **D, E:** γ-Tub. Verdünnungsausstrich.

Die Bestimmung der Transformationseffizienz bezüglich des pGADT₇-Rec-Vektors erfolgte durch Ausplattierung von je 150 µl der um den Faktor 25 verdünnten Transformationsansätze auf SD-Leu- und SD-Trp/-Leu-Medium. Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Rohdaten sind tabellarisch im Anhang aufgeführt. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Transformationseffizienzen und die Anzahl gescreenter Klone, sowie den prozentualen Anteil der positiven Kolonien an.

Ansatz	Transformationseffizienz bzgl. pGADT ₇ -Rec [kbE/ µg Plasmid-DNA]	Anzahl gescreenter Klone	Anzahl und prozentualer Anteil positiver Klone
AH109/pGBKT ₇ /γ-AB x pGADT-Rec/cDNA	2,33 x 10 ⁵	1,38 x 10 ⁴	11 0,080%
AH109/pGBKT ₇ /γ-AB+ x pGADT-Rec/cDNA	1,41 x 10 ⁵	7,88 x 10 ³	6 0,076%
AH109/pGBKT ₇ /γ-AB _{C-Term.} x pGADT-Rec/cDNA	1,01 x 10 ⁵	6,17 x 10 ³	4 0,065%
AH109/pGBKT ₇ /γ-Tub x pGADT-Rec/cDNA	6,23 x 10 ⁴	1,8 x 10 ³	14 0,053%
AH109/pGBKT ₇ -53 x pGADT ₇ -T (PK)	3,83 x 10 ⁴	1 x 10 ³	-
AH109/pGBKT ₇ -Lam x pGADT ₇ -T (NK)	2,08 x 10 ⁴	1,67 x 10 ²	-

Tab.15: Überblick über die Transformationseffizienzen bezüglich des pGADT₇-Rec-Vektors, die Anzahl gescreenter Klone in Zuge der sequentiellen Transformation und über den prozentualen Anteil der positiven Klone.

4.15 Screening einer cDNA-Bibliothek mittels Mating

Neben der sequentiellen Transformation wurde alternativ ein Screening der cDNA-Bibliothek mittels Mating zweier *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme unterschiedlichen Geschlechtstyps durchgeführt. Dazu wurden im Vorfeld Zellen des Stammes AH109

mit dem pGADT₇-Rec-Vektor und aufgereinigter cDNA, Zellen des Stammes Y187 mit den verschiedenen Bindedomänenvektoren pGBKT₇/γ-AB, pGBKT₇/γ-AB⁺ und pGBKT₇/γ-AB_{C-Term}. transformiert. Für die Kontrolle kamen mit pGADT₇-T transformierte AH109-Kolonien in Kombination mit Y187/pGBKT₇-53-Kolonien als Positivkontrolle sowie Y187/pGBKT₇-Lam als Negativkontrolle zum Einsatz. Nach einer 20stündigen Inkubationszeit wurden 100 µl der drei Versuchsansätze unter dem Mikroskop (Axioplan, Carl Zeiss, Jena) mit differentiellem Interferenz-Kontrast betrachtet. Zu diesem Zeitpunkt waren noch Zygoten sichtbar, daher erfolgte eine weitere Inkubation von 4 Stunden.

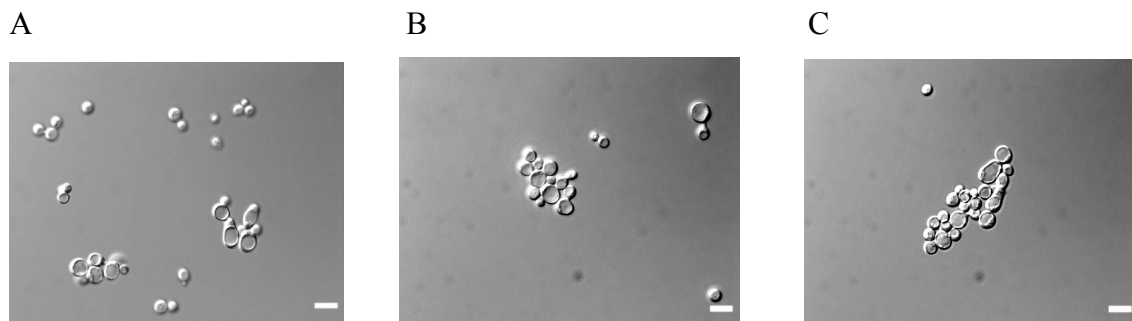


Abb.59: Mikroskopische Aufnahmen der Matingansätze nach 20 Stunden Inkubationszeit. Bei allen Ansätzen γ-AB (A), γ-AB⁺ (B) und γ-AB_{C-Term} (C) sind noch Zygoten und die für den Vorgang des Matings typische Akkumulation der Zellen erkennbar. Es erfolgte daher eine weitere 4stündige Inkubation der Ansätze. Der Maßstab entspricht 1 µm.

Anschließend erfolgte ein Verteilungsausstrich von 100 µl der Versuchs- und Kontrollansätze auf SD-Trp/-Leu/-His-Medium. Die Hefestämme waren bereits zwei Wochen zuvor mit den Hybridplasmiden transformiert worden, um eine Expression der darin codierten Proteine in den Hefezellen zu gewährleisten. Es wurde dadurch eine unmittelbare Ausplattierung auf Triple Dropout Medium ermöglicht.

Nach 6tägiger Inkubationszeit erreichte die Größe der Kollonien im allgemeinen 1-4 mm. Generell wurde ein relativ starkes Hintergrundwachstum auf allen Platten beobachtet. Beim Matingansatz AH109/pGADT-Rec/cDNA x Y187/pGBKT₇/γ-AB waren insgesamt 6 Kolonien gewachsen (Abb.60). Beim Versuchsansatz AH109/Rec/cDNA Y187/pGBKT₇/γ-AB⁺ wuchsen ebenfalls 6 Kolonien (Abb.61). Hinsichtlich des AH109/Rec/cDNA Y187/pGBKT₇/γ-AB_{C-Term}-Ansatzes wurden insgesamt 52 Kolonien als positiv beurteilt. 26 Kolonien hatten jedoch nur einen

Durchmesser von 0,5-1 mm (Abb.62). Da die Kolonien von $< 1\text{ mm } \varnothing$ deutlich vor dem Hintergrund hervortraten, wurden sie dennoch als positiv beurteilt. Die Positivkontrolle zeigte ein starkes Wachstum der Hefekulturen. Die Kolonien erreichten jedoch bei der beachtlich hohen Zellzahl pro Platte nur eine begrenzte Größe von ca. 0,8 mm \varnothing (Abb.63). Bei der Negativkontrolle war ein schwaches Hintergrundwachstum zu erkennen (Abb.64).

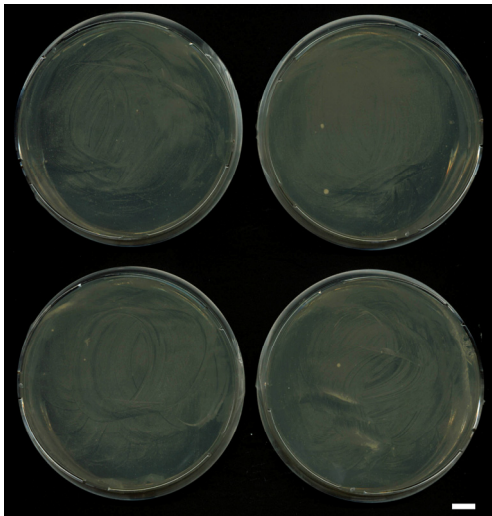


Abb.60: Matingansatz AH109/pGADT-Rec/cDNA x Y187/pGBKT7/ γ -AB auf TDO-Medium. Insgesamt waren 6 Kolonien mit einem Durchmesser von 1-2 mm gewachsen. Verteilungsausstrich. Ausplattiert wurden 100 μl des Matingansatzes. Der Maßstab entspricht 1 cm.

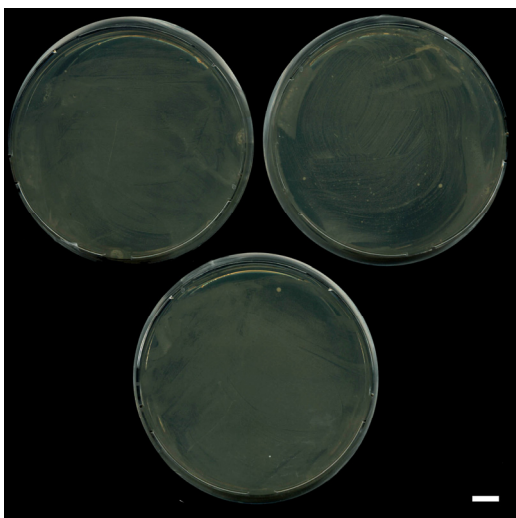


Abb.61: Matingansatz AH109/pGADT-Rec/cDNA x Y187/pGBKT7/ γ -AB+ auf TDO-Medium. 6 Kolonien mit einem Durchmesser von 1-2 mm waren positiv. Ausplattiert wurden 100 μl des Matingansatzes. Der Maßstab entspricht 1 cm.

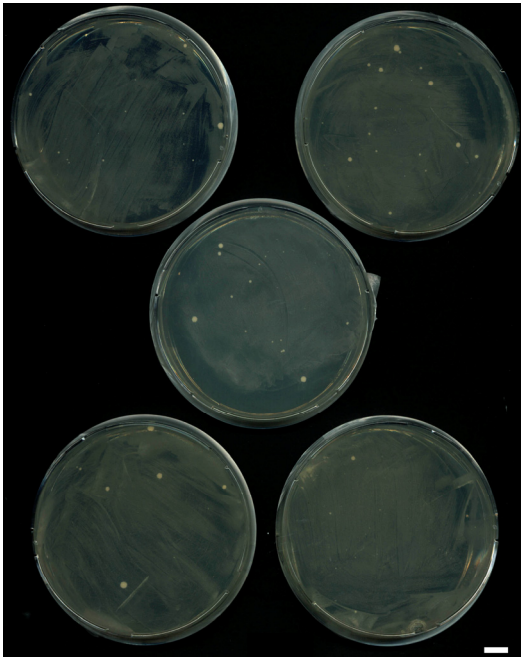


Abb.62: Matingansatz AH109/pGADT-Rec/cDNA x Y187/pGBKT7/ γ -AB_{C-Term} auf TDO-Medium. 52 Kolonien waren positiv zu beurteilt. 26 Kolonien wurden trotz eines Durchmessers von nur 0,5-1 mm als positiv erachtet. Verteilungsausstrich. Ausplattiert wurden 100 μ l des Matingansatzes. Der Maßstab entspricht 1 cm.

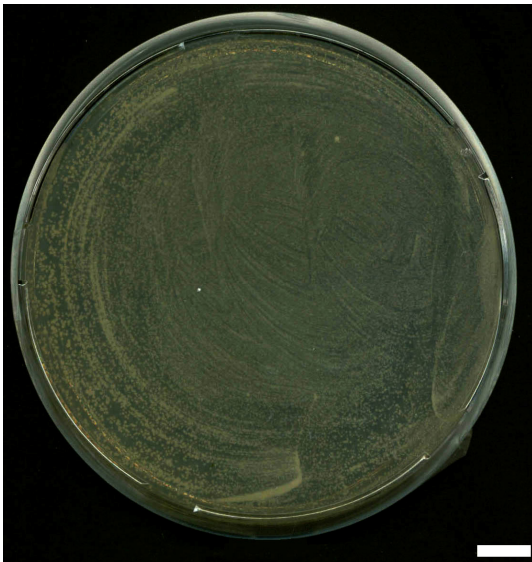


Abb.63: Positivkontrolle AH109/pGADT-Rec/cDNA x Y187/pGBKT₇₋₅₃ auf TDO-Medium. Es war ein starkes Wachstum der Hefekulturen zu erkennen. Verteilungsausstrich. Ausplattiert wurden 100 μ l des Matingansatzes. Der Maßstab entspricht 1 cm.

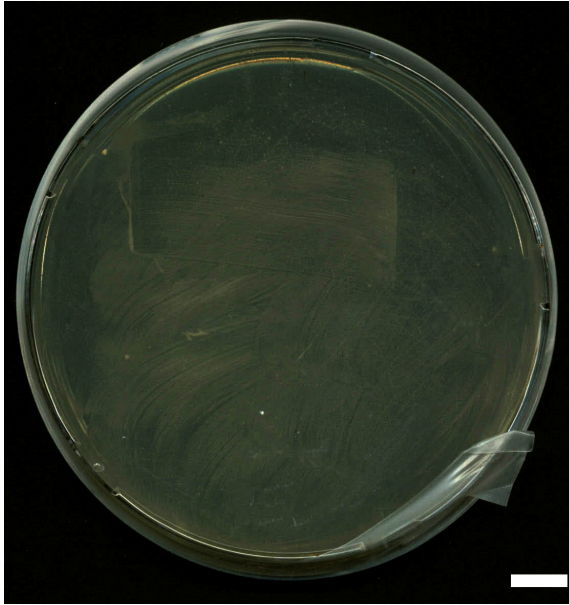


Abb. 64: Negativkontrolle AH109/pGADT-Rec/cDNA x Y187/pGBKT₇-Lam auf TDO-Medium.
Es wurde nur Negativ ein schwaches Hintergrundwachstum beobachtet. Verteilungsausstrich.
Ausplattiert wurden 100 µl des Matingansatzes. Der Maßstab entspricht 1 cm.

Die als positiv bewerteten koloniebildenden Einheiten wurden in QDO-Medium resuspendiert und die Isolate in Verdünnungsausstrichen auf QDO-Platten überimpft. Die Positivkontrolle zeigte bereits nach 2 Tagen ein deutliches Wachstum aller Kolonien. Bei der Negativkontrolle auf höchststringentem Medium wurde nach 6 Tagen nur ein schwaches Hintergrundwachstum beobachtet. Nach dreitägiger Inkubation waren 2 der 6 AH109/Rec/cDNA x Y187/pGBKT₇/γ-AB-Kulturen gewachsen. Die übrigen vier waren auch nach 6 Tagen negativ. Von den 6 positiven AH109/Rec/cDNA x Y187/pGBKT₇/γ-AB⁺-Kulturen wuchs nach 3 Tagen auf höchststringentem Medium 1 Kolonie, nach 6 Tagen Inkubation 2 weitere (Abb.65). 47 der 52 auf SD-Trp/-Leu/-His gewachsenen Kolonien des Ansatzes AH109/Rec/cDNA x Y187/pGBKT₇/γ-AB_{C-Term} waren auch auf SD-Trp/-Leu/-His/-Ade positiv, 41 bereits nach 3 Tagen (Abb.66).

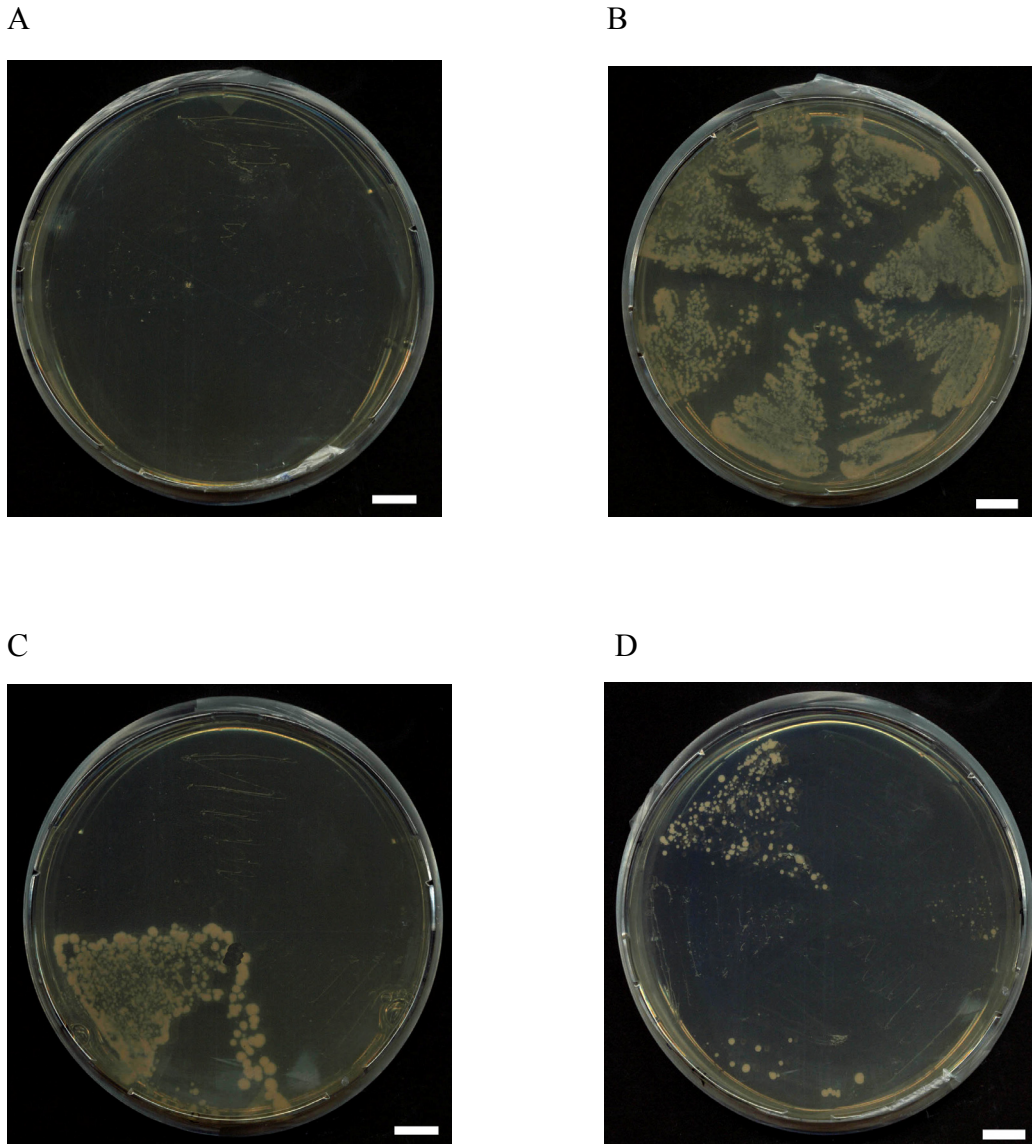


Abb.65: Matingkulturen auf höchstringentem Medium QDO. **A:** Kein Wachstum auf der Negativkontrolle; **B:** Bei der Positivkontrolle zeigten 8 Kolonien ausgeprägtes Wachstum; **C:** 2 positive Kulturen des Versuchsansatzes AH 109/pGADT-Rec/cDNA x Y 187/pGBKT7/ γ -AB; **D:** 3 positive Kulturen AH 109/Rec/cDNA x Y 187/pGBKT7/ γ -AB+-Kulturen wuchsen auf QDO-Medium. Verdünnungsausstrich. Die Inkubationszeit betrug 6 Tage. Der Maßstab entspricht 1 cm.

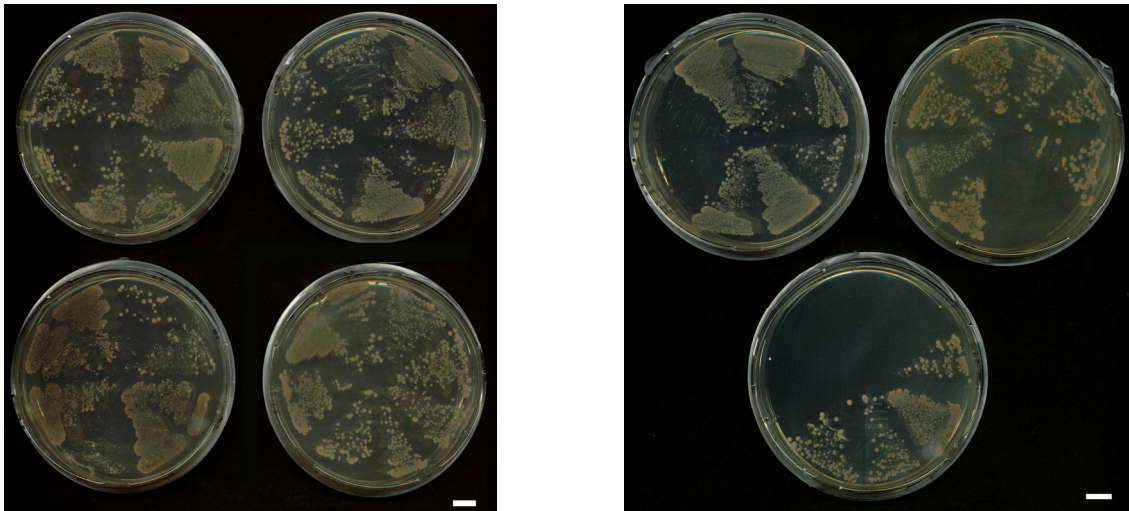


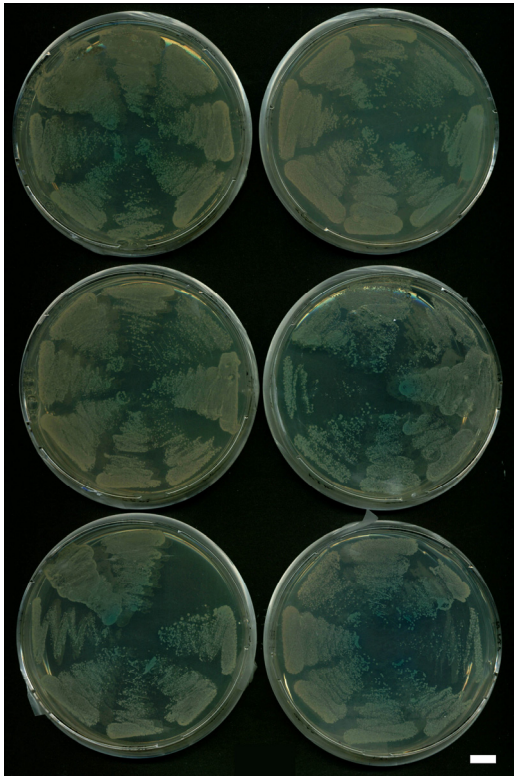
Abb.66: Matingkulturen des Ansatzes auf AH109/Rec/cDNA x Y187/pGBKT7/ γ -AB_{C-Term} QDO-Medium. 47 der 52 auf mittelstringentem Medium gewachsenen Kolonien waren auch auf SD-Trp/-Leu/-His/-Ade positiv. 6tägige Inkubation. Verdünnungsausstrich. Der Maßstab entspricht 1 cm.

Ansatz	Anzahl der auf TDO gewachsenen Kulturen	Anzahl der auf QDO gewachsenen Kulturen nach 6 Tagen	Gesamtzahl der auf QDO gewachsenen Kulturen
AH109/Rec/cDNA x Y187/pGBKT7/ γ -AB	6	2	2
AH109/Rec/cDNA x Y187/pGBKT7/ γ -AB+	6	3	3
AH109/Rec/cDNA x Y187/pGBKT7/ γ -AB _{C-Term}	52	47	47

Tab.16: Wachstumsverhalten der Matingansätze auf TDO- und QDO-Medium

Je eine koloniebildende Einheit positiver Hefekulturen wurde in QDO-Medium resuspendiert und in einem Verdünnungsausstrich auf QDO+-Medium (SD-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal) überführt. 41 der insgesamt 52 Kulturen zeigten aufgrund des enzymatischen Abbaus des Indikators X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- α -d-g Actopyranosid) nach 7tägiger Inkubation eine starke blaue Färbung. Die übrigen 11 waren schwach bis mäßig blau gefärbt. Die Kolonien starker Farbintensität entstammten alle dem Ansatz AH109/Rec/cDNA x Y187/pGBKT7/ γ -AB_{C-Term} (Abb.67). Sämtliche 5 Kolonien der Positivkontrolle wurden blau (Abb.68).

A



B

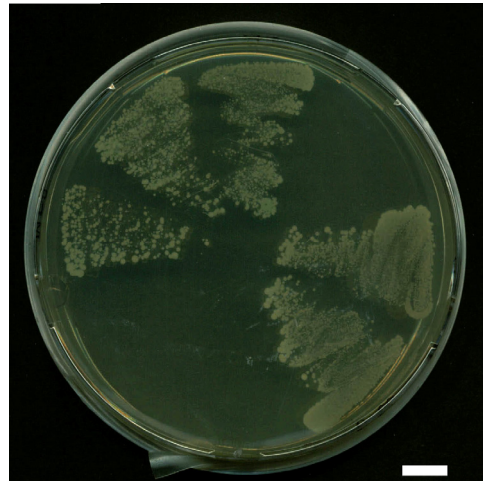


Abb.67: Matingkulturen auf SD-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal. 41 der insgesamt 52 Kulturen zeigten nach 7tägiger Inkubationszeit eine Blaufärbung welche durch Freisetzung des Spaltprodukts 5-Brom-4-chlor-3-indol hervorgerufen wird. **A:** Kolonien des Ansatzes AH109/pGADT-Rec/cDNA x Y187/pGBKT7/ γ -AB_{C-Term}; **B:** Kolonien der Ansätze AH109/pGADT-Rec/cDNA x Y187/pGBKT7/ γ -AB und AH109/pGADT-Rec/cDNA x Y187/pGBKT7/ γ -AB+.

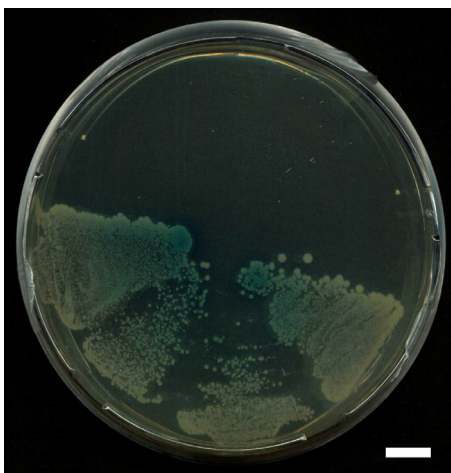


Abb.68: 4 auf QDO+-Medium überimpfte Kolonien der Positivkontrolle. Alle zeigten nach Umsetzen von X-Gal um eine deutliche Blaufärbung. Verdünnungsausstrich. Der Maßstab entspricht 1 cm.

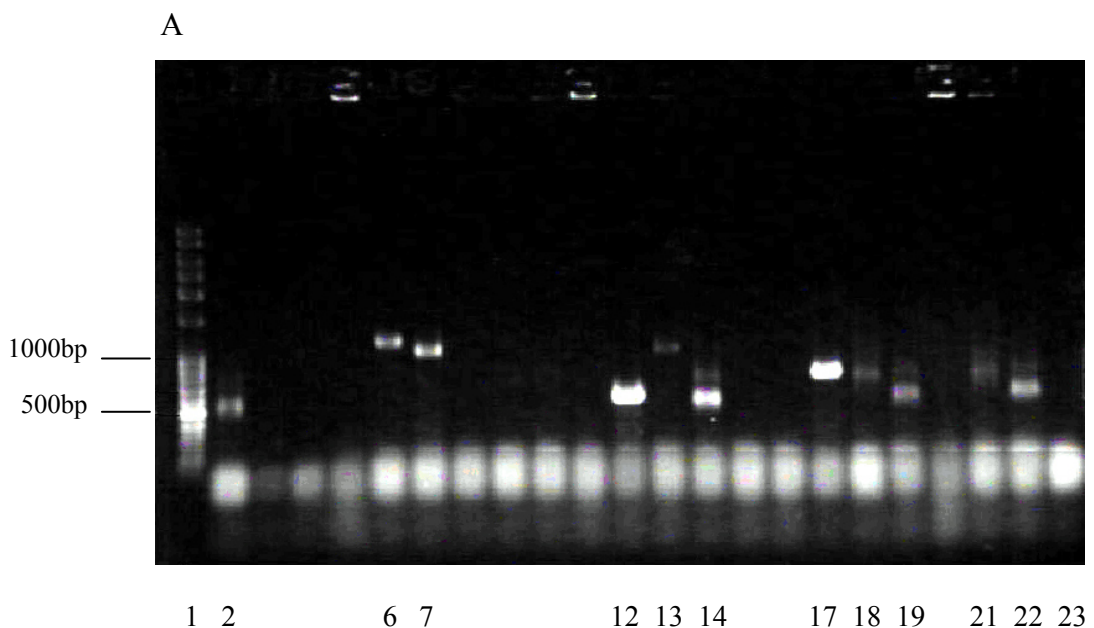
Matingansatz	Mating-effizienz	Anzahl gescreenter Klone	Anzahl und prozentualer Anteil positiver Klone
AH109/Rec/cDNA x Y187/pGBKT ₇ /AB	94,08 %	284 008,75	2; 0,7 x 10 ⁻³ %
AH109/Rec/cDNA x Y187/pGBKT ₇ /AB+	70,58 %	356 913,25	3; 0,85 x 10 ⁻³ %
AH109/Rec/cDNA x Y187/pGBKT ₇ /AB _{C-Term.}	33,33 %	189 951,25	47; 0,2 x 10 ⁻¹ %
AH109/pGADT ₇ -T x Y187/pGBKT ₇ -53	18,90%	68 346,25	-
AH109/pGADT ₇ -T x Y187/pGBKT ₇ -Lam	56,04 %	226 265	-

Tab.17: Matingeffizienzen und Anzahl gescreenter Klone.

4.16 Identifikation der Beutesequenzen

Zur Identifikation der Beutesequenzen wurden die positiven Hefekolonien einer Kombination aus alkalischer und thermaler Lyse unterzogen und konnten im Folgenden als Template in einer Hefekolonie-PCR eingesetzt werden. Die Amplifizierung der cDNA-Abschnitte aus dem pGADT₇-Rec-Vektor erfolgte mit den Vektorprimern AD-Sequencing und T7, welche die MCS flankieren. Die produzierten Amplifikate konnten gelelektrophoretisch nachgewiesen werden.

Bei den Hefekulturen, welche zum Screening einer cDNA-Bibliothek nach Interaktionspartnern pflanzlichen γ -Tubulins einer sequentiellen Transformation unterzogen wurden, zeigten 25 der 35 auf SD-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal als positiv erachteten Kolonien ein Amplifikat des Aktivierungsdomäneninserts (Abb.69 A-C).



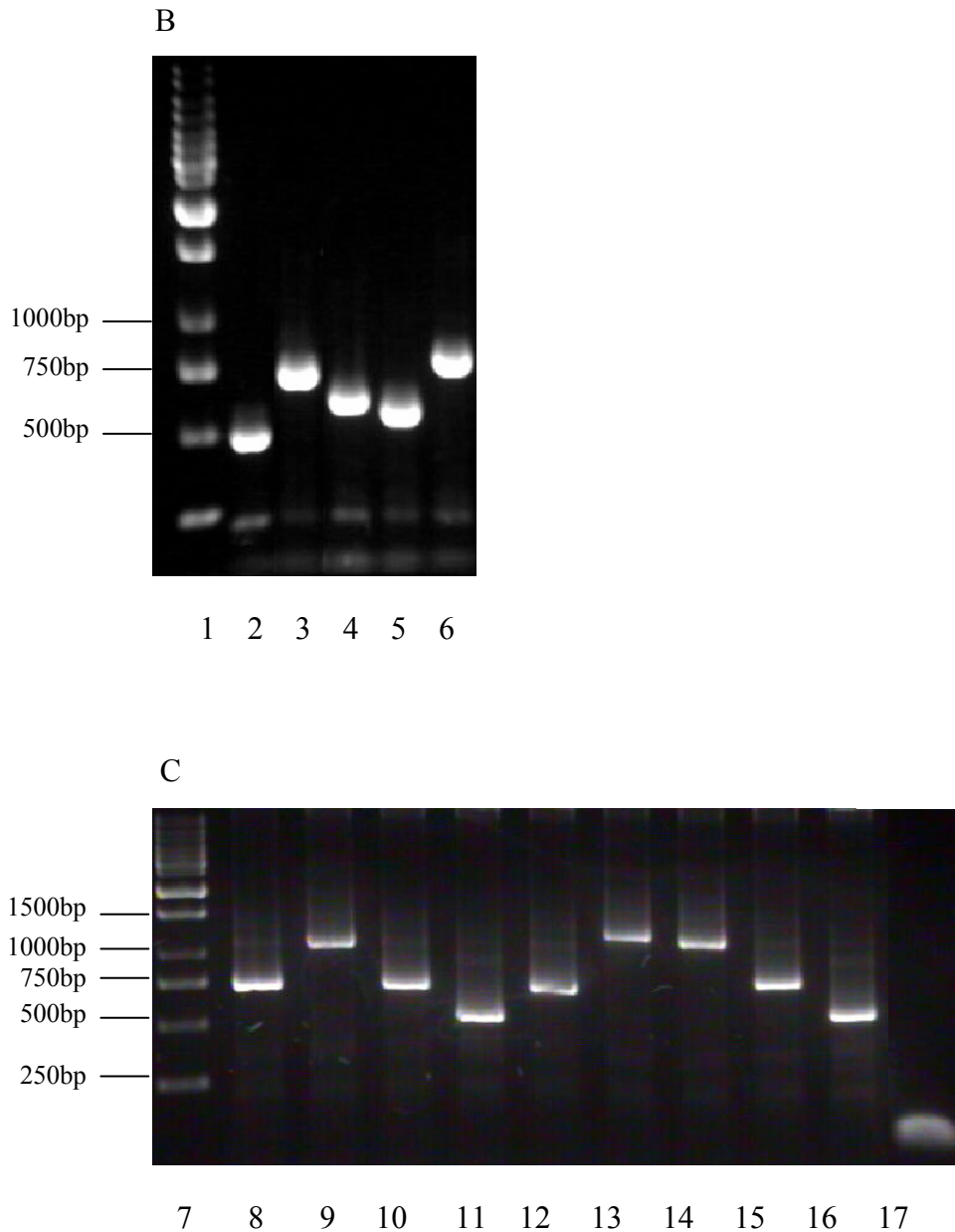


Abb.69: Hefekolonie-PCR der Aktivierungsdomäneninserts aus Hefekulturen der sequentiellen Transformation mit den Bindedomänenkonstrukten γ -AB, γ -AB⁺, γ -AB_{C-Term} und γ -Tub. 25 der 35 Kolonien zeigten mit den Primern AD-Sequencing und T7 ein Amplifikate. Die Fragmentgröße variierte zwischen ca. 500 und ca. 1300 bp. **A:** In den Versuchen mit γ -AB (Spur 2,6,7), γ -AB⁺ (Spur 12,13,14), sowie 5 bei γ -AB_{C-Term} (Spur 17,18,19,21,22) wurden insgesamt 11 Amplifikate erhalten. Negativkontrolle (Spur 23). **B,C:** In Versuchen mit γ -Tub wurden 14 Amplifikate erhalten. Marker GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. 1 %iges Agarosegel. Ethidiumbromidfärbung.

Bei den detektierten Hefekolonien des Matings war nach der Hefekolonie-PCR zunächst nur bei einer der insgesamt 52 Kolonien ein Amplifikat nachweisbar. Das Amplifikat aus Kolonie 4 zeigte eine Größe von etwa 900 bp (Abb 71).

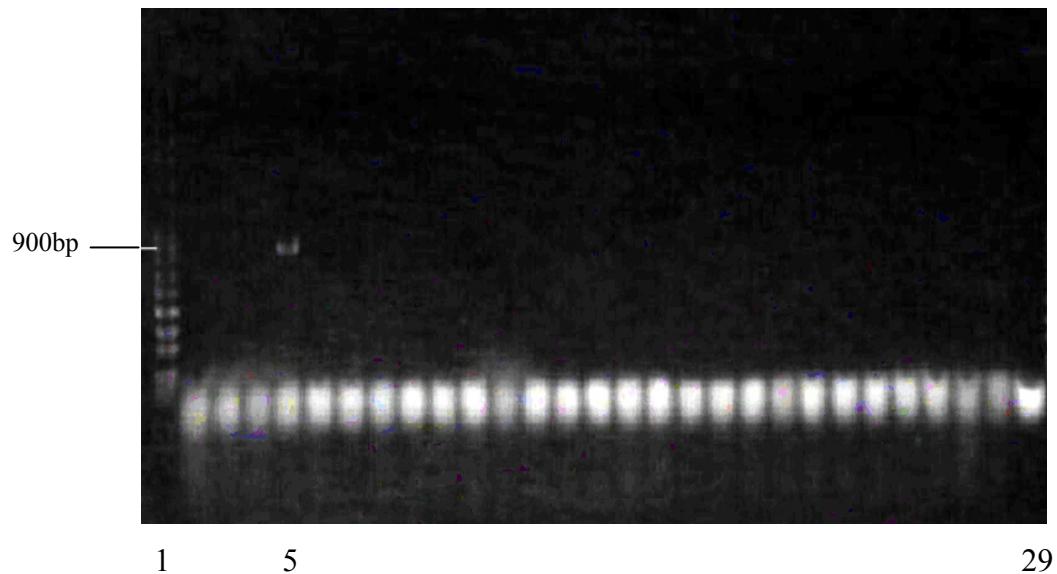


Abb.71: Hefekolonie-PCR der Aktivierungsdomäneninserts aus den Hefekulturen des Matings.

Nur 1 der 52 Kolonien konnte mit den Primern *AD-Sequencing* und *T7* die MCS des pGADT₇-Rec-Vektors mit einer Größe von c. 900bp amplifiziert werden (Spur 5). Die Kontrolle war negativ (Spur 29). Marker GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Spur 1). 1,5 %iges Agarosegel. Ethidiumbromidfärbung.

Die Amplifikation der Beutesequenzen war nicht bei allen Kolonien erfolgreich. Auf den Agarosegelen waren Zelldebris und Primerdimere deutlich erkennbar. Es wurde angenommen, dass der Aufschluss der Hefezellen nur begrenzt funktioniert hat. Daher wurde bei den Kolonien, bei denen mittels Kolonie-PCR kein Amplifikat erzielt werden konnte, eine Plasmidextraktion mit vorausgehendem enzymatischen Aufschluss durchgeführt. Im Anschluss konnten die extrahierten Plasmide gelelektrophoretisch nachgewiesen (Daten nicht präsentiert) und in einer PCR mit den Primern *AD-Sequencing* und *T7* untersucht werden. Dabei konnten bei der sequentiellen Transformaion 6 weitere Amplifikate der pGADT₇-Rec-Inserts nachgewiesen werden (Abb.72).

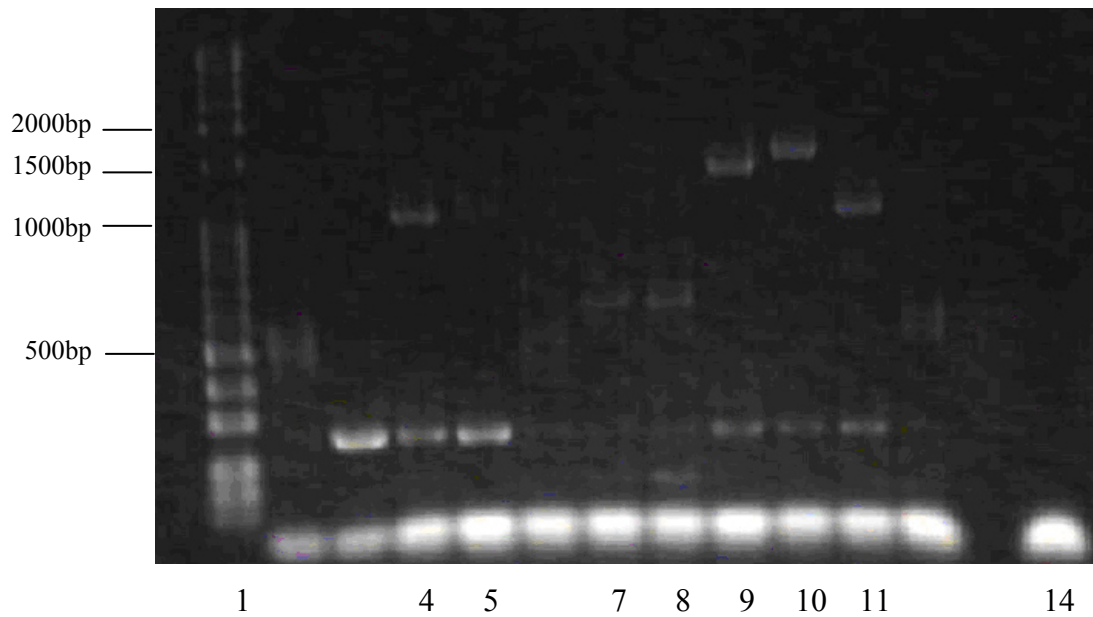
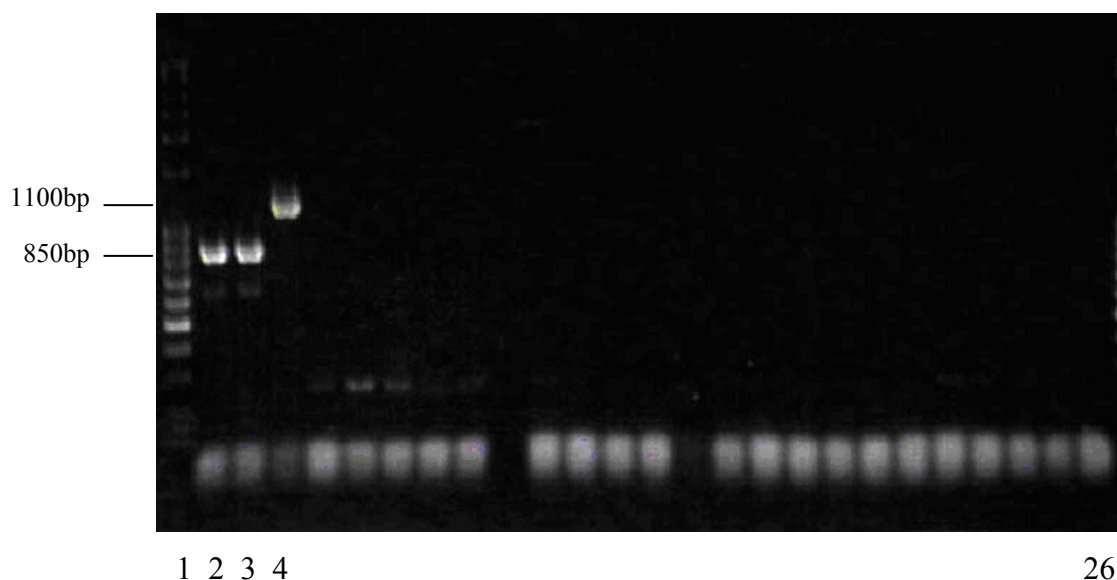


Abb.72: Plasmid-PCR der extrahierten Aktivierungsdomänenvektoren aus sequentiell transformierten Hefekulturen. Mittels der AD-Sequencing- und T7-Primer wurden 6 zusätzliche Sequenzen amplifiziert. Die Amplifikate umfassten ca. 1000bp (Spur4 und 11), ca. 650bp (Spur 7 und 8) und ca. 1500 bzw. 1600bp (Spur 9 und 10). Kontrolle: negativ (Spur14). In nahezu allen Ansätzen sind Fragmente von ca. 250 bp zu beobachten. Es handelt sich wahrscheinlich um Amplifikate selbstligierter BD-Vektoren. Marker GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Spur 1) 1,5 %iges Agarosegel. Ethidiumbromidfärbung.

Bezüglich der Kolonien des Matings wurden 4 zusätzliche Sequenzen nachgewiesen (Abb.73).



1 2 3 4

26

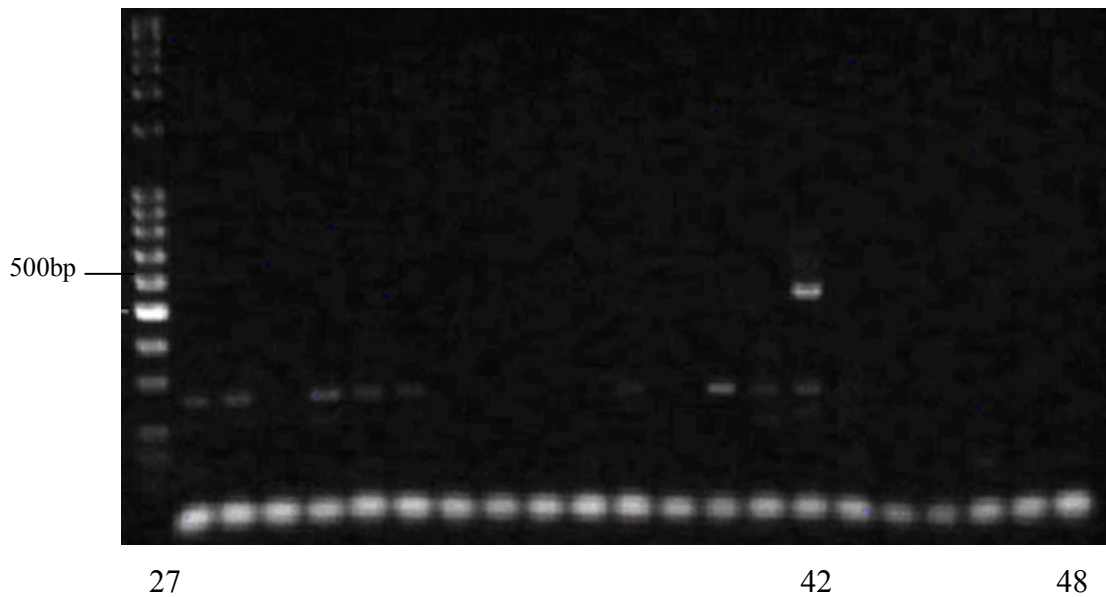


Abb.73: Plasmid-PCR der extrahierten Aktivierungsdomänenvektoren aus den Matingkulturen

Es konnte mit den Primern AD-Sequencing und T7 bei 4 Kolonien Amplifikate nachgewiesen werden. Die Größenordnungen lagen bei ca. 850bp (Spur 2 und 3), bei ca. 1000bp (Spur 4) und ca. 1100bp (Spur 42). Die Kontrollen waren negativ (Spur 26 und 48). Marker GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Spur 1 und 27). 1,5 %iges Agarosegel. Ethidiumbromidfärbung.

Die DNA-Fragmente wurden aus den Agarosegelen aufgereinigt und nach vorausgehender Mengenabschätzung dem Cycle Sequencing unterzogen. Diese Proben wurden zur Sequenzierung bei der Firma GENterprise (Universität Mainz) eingereicht. Die Ergebnisse konnten mit dem Programm ChromasLITE Version 2.01 bearbeitet und über die NCBI Blast Datenbank mit bereits bekannten Sequenzen verglichen werden. Die bei diesem Vergleich ermittelten Homologen Sequenzen werden neben der Bezeichnung der Herkunftskolonie und den Fragmentgrößen der Amplifikate in nachstehender Tabelle aufgeführt. Die Alignments der Beutesequenzen und ihrer Homologe sind im Anhang aufgelistet. Die Rohdaten der einzelnen ermittelten Sequenzen sind auf der beiliegenden CD-Rom einzusehen.

Die übrigen insgesamt 49 Hefekulturen beider Versuchsreihen mussten trotz des Wachstums auf QDO und des Umsatzes von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-Glucopyranosid als falsch positiv bewertet werden.

Sequenz	Konstrukt	Fragmentgröße des PCR-Amplifikats	Homologe Sequenz	Sequenzlänge	Identitäten Lücken
Wer 61	S γ -Tub	750bp	unbekannte mRNA Sequenzen von: <i>Nicotiana benthamiana</i> <i>Lycopersicon esculentum</i>	392bp 474bp	312/357 (88%) 24/357 (6%) 268/308 (87%) 17/308 (5%)
Wer 62	S γ -Tub	650bp	diverse mRNA Sequenzen	Auf Grund einer generell kurzen Übereinstimmung (ca.40 -100bp) nicht auswertbar	
Wer 63	S γ -Tub	600bp	Auxin induzierte mRNA von <i>Nicotiana tabacum</i>	874bp	273/322 (84%) 9/322 (2%)
Wer 64	S γ -Tub	800bp	unbekannte mRNA Sequenzen von: <i>Nicotiana benthamiana</i> <i>Solanum lycopersicum</i>	392bp 443bp	157/174 (90%) 0/174 (0%) 305/376 (81%) 25/376 (6%)
Wer 67	S γ -Tub	500bp	mRNAs tierischer Herkunft	Auf Grund einer generell kurzen Übereinstimmung (ca.40bp) nicht auswertbar	
Wer 68	S γ -Tub	750bp	mRNAs tierischer Herkunft	Auf Grund einer generell kurzen Übereinstimmung (ca.40bp) nicht auswertbar	
Wer 69	S γ -Tub	1050bp	mRNAs tierischer Herkunft	Auf Grund einer generell kurzen Übereinstimmung (ca.40bp) nicht auswertbar	
Wer 70	S γ -Tub	750bp	unbekannte mRNA Sequenzen von: <i>Nicotiana benthamiana</i>	392bp	132/142 (89%) 1/142 (0%)
Wer 71	S γ -Tub	550bp	Mitochondriale ribosomale RNA von <i>Cinnamomum camphora</i>	3629bp	140/142 (98%) 1/142 (0%)
Wer 72	S γ -Tub	750bp	mRNAs tierischer Herkunft	Auf Grund einer generell kurzen Übereinstimmung (ca.40bp) nicht auswertbar	
Wer 73	S γ -Tub	1050bp	Keine Sequenzierungsergebnisse		
Wer 74	S γ -Tub	1050bp	Keine Sequenzierungsergebnisse		
Wer 76	S γ -Tub	550bp	Ribosomale RNA von <i>Nicotiana tabacum</i>	3339bp	113/116 (97%) 0/116 (0%)
Wer 88	S AB	550bp	<i>Patinopecten yessoensis</i> ScmMyosin-ähnliches Protein	1371	31/31 (100%) 0/31 (0%)

Wer 89	S AB	1300bp	<i>Nicotiana tabacum</i> Sekretorische Peroxidase (PER)	1290	148/167 (88%) 3/167 (1%)
Wer 90	S AB	1100bp	<i>Homo sapiens</i> DKFZp686H1748	5457	40/40 (100%) 0/40 (0%)
Wer 91	S AB	600bp	<i>Nicotiana tabacum</i> Chloroplasten Genom DNA	155943	265/267 (99%) 0/267 (0%)
Wer 92	S AB+	900bp	<i>Nicotiana tabacum</i> Klon 7 Poly(A)-Bindeprotein (PABP)	1651	76/88 (86%) 2/88(2%)
Wer 93	S AB+	700bp	<i>Patinopecten yessoensis</i> Scmlp Myosinähnliches Protein	1371	40/40 (100%) 0/40 (0%)
Wer 94	S AB+	900bp	<i>Homo sapiens</i> DKFZp686D18109	7644	30/31 (96%) 0/31 (0%)
Wer 95	S AB _{C-Term.}	550bp	<i>Nicotiana tabacum</i> GapC Cytosolische G cerinaldehyd-3- Phosphophat- Dehydrogenase	1174	128/128(100%) 0/128 (0%)
Wer 96	S AB	600bp	<i>Patinopecten yessoensis</i> Scmlp Myosin-ähnliches Protein	1371	37/37 (100%) 0/37 (0%)
Wer 97	S AB _{C-Term.}	700bp	<i>Nicotiana tabacum</i> GapC Cytosolische G cerinal- dehyd-3-Phosphophat- Dehydrogenase	1174	128/128(100%) 0/128 (0%)
Wer 98	S AB	800bp	<i>Patinopecten yessoensis</i> Scmlp Myosin-ähnliches Protein	1371	40/40 (100%) 0/40 (0%)
Wer 99	S AB	900bp	<i>Medicago truncatula</i> Chromosom 5, Klon mth2- 16f8, komplette Sequenz	142977	79/89 (88%) 0/89 (0%)
Wer 100	S AB _{C-Term.}	900bp	<i>Homo sapiens</i> DKFZp779I1240 (from clone DKFZp779I1240)	3664	37/38 (97%) 0/38 (0%)
Wer 101	S AB	1000bp	(Vektoramplifikat)	-	-
Wer 102	S AB	650bp	<i>Medicago truncatula</i> Chromosom 5, Klon mth2- 16f8, komplette Sequenz	142977	79/89 (88%) 0/89 (0%)
Wer 103	S AB	650bp	<i>Medicago truncatula</i> Chromosom 5, Klon mth2- 16f8, komplette Sequenz	142977	79/89 (88%) 0/89 (0%)
Wer 104	S AB _{C-Term.}	1100bp	(Kein Sequenzierergebnis)	-	-
Wer 106	S AB+	1500bp	<i>Nicotiana tabacum</i> S-adenosyl-L-Mhionin- Synthetase (SAMS) complete cds	1636	46/46 (100%) 0/46 (0%)

Wer 107	S AB+	1600bp	<i>Solanum tuberosum</i> 26S proteasome AAA- ATPase Untereinheit RPT4a-like protein, complete cds	1567	749/803 (93%) 4/803 (0%)
Wer 108	M AB	850bp	<i>Nicotiana tabacum</i> Vermutliche alpha4 proteasome Untereinheit (a4 gene)	843	309/352 (87%) 0/352 (0%)
Wer 109	M AB	850bp	<i>Nicotiana benthamiana</i> 26S proteasome Untereinheit alpha 4, partial cds	464	332/343 (96%) 0/343 (0%)
Wer 110	M AB+	1200bp	<i>Nicotiana tabacum</i> Ascorbat-Peroxidase (APX), complete cds	1040	364/366 (99%) 0/366 (0%)
Wer 111	M AB+	900bp	<i>Nicotiana tabacum</i> Peroxidase NtPOX1, complete cds	1339	510/526 (96%) 2/526 (0%)
Wer 112	M AB _{C-Term.}	600bp	<i>Nicotiana tabacum</i> mitochondriale DNA, complete genome	430597	245/246 (99%) 0/246 (0%)

Tab.18: Zusammenfassender Überblick über die Sequenzen, Herkunftskolonien, Ködersequenzen und Fragmentgrößen der Amplifikate, sowie Bezeichnungen der Homologe und Angaben über Identitäten und Lücken. Die Herkunft der Kolonien sind mit ‚S‘ (sequentielle Transformation und ‚M‘ (Mating) gekennzeichnet. Unter ‚Homologe Sequenz‘ sind die Suchergebnisse in der NCBI Blast Datenbank aufgelistet. Zusätzlich sind Angaben der Identitäten und Lücken zwischen den ermittelten Sequenzen und ihren Homologen dargestellt.

5. Diskussion

5.1 Sequenzuntersuchungen des γ -A- und γ -B-Peptidmotivs

γ -Tubulin spielt bei der Nukleation der Mikrotubuli bei sämtlichen Eukaryoten eine wichtige Rolle. Immunofluoreszenzstudien konnten bestätigen, dass γ -Tubulin innerhalb verschiedener Eukaryoten vorkommt. Als Nukleationsstellen der Mikrotubuli dienen die MTOCs, mit denen die Mikrotubuli mit ihren Minus-Enden assoziiert sind. Das γ -Tubulin ist als wichtiger spezifischer Bestandteil der MTOCs identifiziert worden, z.B. in den Spindelpolkörpern der Pilze (OAKLEY und OAKLEY 1989), in den Basalkörpern der Cilien und Flagellen und in den Centrosomen tierischer Zellen und niederer pflanzlicher Organismen (STEARNS et al. 1991; ZHENG et al. 1991). In Zellen höherer Pflanzen, vor allem aber in den Angiospermen, sind MTOCs in Form solcher Organellen nicht vorhanden (VAUGHN und HARPER 1998). Die Nukleationsstellen für Mikrotubuli scheinen hier diffus in den kortikalen Bereichen des Cytoplasmas oder in den an die Kernhülle grenzenden Cytoplasma in mehr oder weniger punktierter Form vorzuliegen. In der Literatur wird dies zurzeit kontrovers diskutiert (z.B. CANADAY et al. 2000, PANTERIS et al. 2000). Über die genauen Mechanismen, Funktionsweisen und Faktoren der Nukleationsstellen ist noch nicht viel bekannt. Die Ursache liegt an den den noch recht wenigen bekannten γ -Tubulinsequenzen. Vor allem im Bereich der pflanzlichen Organismen, in dem der evolutive Übergang vom Wasser- zum Landleben vollzogen wird, ist in diesem Zusammenhang völlig unerforscht. Genau in diesen Bereich fällt auch der Verlust der morphologisch definierten MTOCs mit ihren Centriolen und der Verlust begeißelter Stadien während der vegetativen Entwicklungszyklen. Zudem wird in diesem Bereich der Übergang zur Mehrzelligkeit vollzogen. Die einzellige Alge *Chlorella spec.*, eine nahe Verwandte zu *Chlamidomonas reinhardtii*, welche ebenfalls einzellig ist und in allen Stadien des Zellzyklus Centriolen als MTOCs besitzt, jedoch keine Begeißelung aufweist, wurde bereits in der eigenen Diplomarbeit untersucht. Ebenso das Lebermoos *Marchantia polymorpha*, welche phylogenetisch unter den Laubmoosen anzusiedeln ist. Sie besitzen im vegetativen Stadium keine Centriolen, bilden diese jedoch bei der Fortpflanzung während der Spermatogenese *de novo* aus (VAUGHN und HARPER 1998).

Für die vorliegende Arbeit wurden die bereits bekannten γ -Tubulin-Sequenzen um 15 weitere aus dem Bereich der Chlorophyta (Grünalgen) ergänzt. Für die Auswahl der Organismen kamen verschiedene Aspekte in Betracht.

Zum einen wurden Vertreter der Volvocales untersucht. Die Komplexität der Morphologie innerhalb der Volvocales nimmt vom Einzeller *Chlamydomonas* über die Mehrzeller *Gonium*, *Pandorina*, *Eudorina*, *Pleodorina* bis hin zum echten Vielzeller *Volvox* (mit Trennung in somatische und reproduktive Zellen) ständig zu. Innerhalb der *Volvox*-Arten kommt es zusätzlich zur Entwicklung cytoplasmatischer Verbindungen zwischen den einzelnen Zellen. In der Ordnung der Volvocales konnte somit der Übergang vom Einzeller zum Vielzeller innerhalb einer eng verwandten Gruppe rezenter Arten untersucht werden. Der Übergang von der Einzelligkeit zur Vielzelligkeit fand hier vor 50-75 Millionen Jahre statt und stellt damit ein recht junges Ereignis in der Evolution dar. Es wurden daher die Volvocales *Gonium pectorale*, *Pleodorina illinoisiensis*, *Volvox tertius*, *Volvox carteri*, *Volvox gigas* und *Volvox globator* auserwählt. Die Volvocales sind im Besitz von Centriolen als MTOCs und sind begeißelt.

Des Weiterem wurden innerhalb der Chlorophyta zwei weitere Algen der Klasse Ulvophyceae untersucht. Die der Ordnung Ulotrichales zugehörigen, wasserlebenden, einzelligen und filamentös wachsenden Alge *Ulothrix zonata*, sowie die der Ordnung Trentepohliales zugehörigen, mehrzelligen Alge *Cephaleuros spec.* welche terrestrisch als Parasiten auf Landpflanzen lebt. Auch diese beiden Organismen besitzen begeißelte Stadien und Centriolen als MTOCs.

Weitere Untersuchungen wurden innerhalb der Streptophytenlinie geführt. Zu den Streptophyten gehören die höheren Landpflanzen und einige Süßwasseralgen. Aufgrund morphologischer, ultrastruktureller, biochemischer und molekularer Daten ist bekannt, dass sich Landpflanzen aus den zu den Grünalgen gehörenden Charophyceae entwickelt haben. Sie werden als nächstverwandte Schwestergruppe zu den Embryophyta, den Landpflanzen, die gleichfalls zu den Streptophyten gehören angesehen (KAROL et al. 2001, RENZAGLIA et al. 2000). Zu den Streptophyta gehören neben den höheren Landpflanzen die Zygnematophyceae (Bsp. *Closterium ehrenbergii* und *Spirogyra spec.*), die Charophyceae (Bps. *Chara spec.*), Coleochaetales (Bsp. *Coleochaete scutata*), und isolierte Taxa, die zum Teil keiner größeren Klasse richtig eingegliedert werden können wie z.B. *Klebsormidium spec.*, *Chlorokybus atmophyticus*. Außerdem gehört aufgrund veröffentlichter Untersuchungen diverser Proteine vermutlich der einzellige

Flagellat *Mesostigma viride* zu den Streptophyten (BHATTACHARY, D.; WEBER, K.; AN, S.S.; BERNING-KOCH, W. 1998; GRAHAM, L. E., COOK; MARTHA. E; BUSSE , JAMES. S. 2000; KAROL, KENNETH, G, McCOURT; RICHARD, M.; DELWICHE, CHARLES, F. 2001)

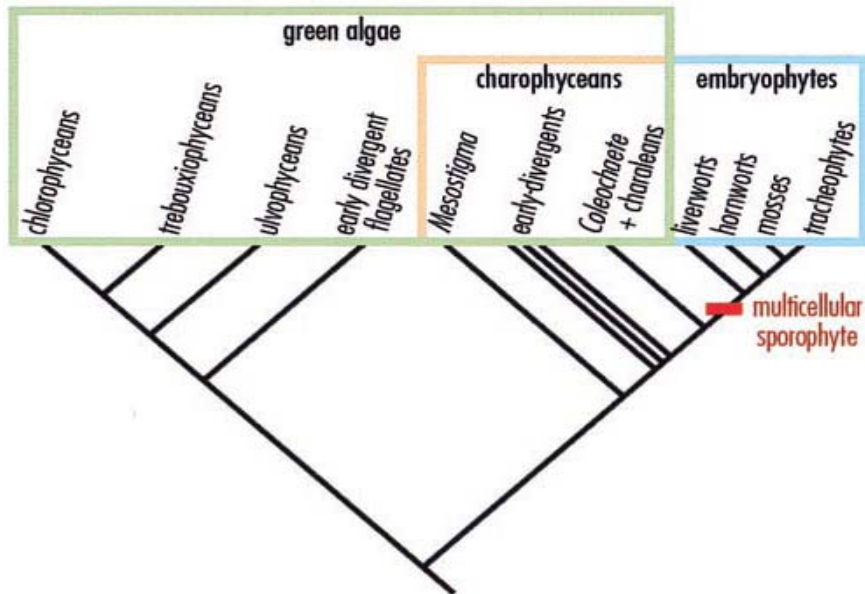


Abb.74: Ein Modell phylogenetischer Verwandtschaften innerhalb der Grünalgen (Chlorophyta). Sie Beruht auf Untersuchungen der Charophyceae und den höheren als Embryophyten bezeichneten Landpflanzen hinsichtlich Sequenzuntersuchungen von ribosomalen Genen, der Rubisco, und weiteren Genen. Diese Gruppe werden zu den Streptophyten gezählt. Die Zugehörigkeit der Alge *Mesostigma* war bis dato noch als unsicher zu du sehen und unklar, obwohl Indiezien darauf hinweisen (Quelle: GRAHAM, L. E., COOK; MARTHA. E; BUSSE, JAMES. S. 2000)

Untersucht wurden daher die Algen *Coleochaete scutata*, *Klebsormidium spec.*, *Closterium ehrenbergii*, *Spirogyra spec.*, *Chlorokybus atmophyticus*, *Mesostigma viride* und *Chara spec.*. Diese Algen besitzen alle noch Centriolen als MTOCs. *Closterium ehrenbergii*, *Spirogyra spec.*, *Klebsormidium spec.* und *Chlorokybus atmophyticus* besitzen in keinem Entwicklungsstadium Geißeln, während *Mesostigma viride* dauerhaft begeißelt ist. Die übrigen Algen bilden während der Spermatogenese *de novo* Geißeln aus. Ein weiterer Aspekt zur Auswahl der Streptopytenlinie war die Tatsache, dass sie während der Zellteilung, in welcher die Mikrotubuli eine maßgebende Rolle spielen, bereits einen Phragmoplast zur Festlegung der Zellteilungsebene ausbilden, während die übrigen untersuchten, nicht der Streptophytenline zugeordneten Algen, einen Phycoplasten verwenden. Beim Phycoplasten sind die Mikrotubuli parallel, beim

Phragmoplasten senkrecht zur Teilungsebene angeordnet (Nach P. H. RAVEN, R. F. EVERT, H. CURTIS, 1981; und G. L. FLOYD).

5.2 Die ermittelten γ -Tubulin-Sequenzen

Durch Sequenzierung der isolierten und als positiv erachteten cDNA-Klone sind nun auch Teilsequenzen um das γ -A- und γ -B-Peptidmotiv aus den im vorigen Kapitel besprochenen Grünalgen bekannt. Die Sequenzen wurden anhand eines Gendatenvergleichs als γ -Tubulin bestätigt. Um einen Vergleich auf Aminosäure-Ebene mit anderen bekannten pflanzlichen γ -Tubulin-AS-Sequenzen durchzuführen, ließen sich die vorliegenden Nukleotidsequenzen mit Hilfe des Computerprogrammes „Clone“ translatieren. Mit dem Computerprogramm „ClustalX“ war es möglich, ein Alignment mit den zurzeit zur Verfügung stehenden pflanzlichen γ -Tubulin-AS-Sequenzen durchzuführen. Zusätzlich wurden zum Vergleich die AS-Sequenz vom Einzeller *Euglena gracilis*, in das Alignment aufgenommen (Abb.33, Kap.3.9) und als Outgroup-Organismus bei der Erstellung des Stammbaums verwendet (Abb.34, Kap.3.10). *Euglena gracilis* besitzt eine begeißelte Organisationsform und gehört wie auch *Chlorella spec.* und *Chlamydomonas reinhardtii* dem Großreich der Protisten an.

Beim Vergleich der bis dato bekannten pflanzlichen AS-Sequenzen erkennt man eine große Homologie im Bereich des γ -A- und γ -B-Peptidmotivs untereinander. Die neu hinzugewonnenen Sequenzen von *Coleochaete scutata*, *Klebsormidium spec.*, *Chlorokybus atmophyticus*, *Mesostigma viride* und *Chara spec.* decken sich bis auf wenige konservative AS-Austausche mit denen aller höheren Landpflanzen. Die AS-Sequenzen von *Gonium pectorale*, *Pleodorina illinoisiensis*, *Volvox tertius*, *Volvox carteri*, *Volvox gigas*, *Volvox globator*, sowie *Ulothrix zonata* und *Cephaleuros spec.* zeigen die Konservierung im γ -A- und γ -B-Peptidmotiv nicht. Es sind im Vergleich kaum Homologien zu erkennen. Sie besitzen eher eine größere Homologie zur den γ -Tubulinsequenzen der Einzeller *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella spec.*. Besonders in beiden Bereichen welche als γ -A- und γ -B-Peptidbereich bezeichnet werden, weichen diese Grünalgen erheblich von denen der höheren Landpflanzen ab. Die beiden Peptidbereiche liegen im gefalteten Protein zwischen zwei α -Helices als Schlaufe an der Außenseite exponiert (INCLAN und NOGALES 2000) und zeichnen sich durch jeweils sehr konservierte Sequenzmotive bei den höheren Landpflanzen sowie bei den Vertebraten aus (BURNS 1995). Während bei den Streptophyten

im γ -A-Peptid das aus zehn Aminosäuren bestehende Sequenzmotiv V(A/S)ERQ(A/V//G/Q)N(V/A/T)I(R/Q) vorliegt, sind bei den nicht der Streptophyten zugehörigen Algen neben erheblichen Sequenzunterschieden fünf weitere Aminosäuren eingefügt. Auch im γ -Peptid B-Bereich liegt bei diesen Algen bis auf fünf konservative Aminosäureaustausche ein homologes Sequenzmotiv vor: SY(A/G)R(N/T/A)K(E/D)(AIV)S(QA)AK. Die Schlussfolgerung, dass diese γ -Tubulin-Bereiche aufgrund ihrer großen Homologie innerhalb der Streptophytenlinie spezifische Aufgaben übernehmen, liegt nahe. Interessant ist das Ergebnis der Jochalgen *Closterium ehrenbergii* und *Spirogyra spec.*. Hier ist nur im γ -A-Peptidbereich eine Konservierung zu sehen, wie sie bei den übrigen Streptophyten vorzufinden ist.

Die Untersuchungen lassen generell den Schluß zu, dass sich die Konservierung des γ -A- und γ -B-Peptidmotivs innerhalb der Streptophytenlinie manifestiert hat. Ein Bezug auf Verlust von Centriolen bzw. Begeißelung ist nicht festzustellen. Auch der Übergang zur Mehrzelligkeit konnte nicht als Begründung der Konservierung festgestellt werden (Tab.10, Kap.3.11).

Bei den Jochalgen *Closterium ehrenbergii* und *Spirogyra spec.*, angehörige der Streptophyten, konnte eine Konservierung nur im γ -Peptid A-Bereich nachgewiesen werden. Es wäre möglich, dass die beiden potentiellen Interaktionspartner (γ -A- und γ -B-Peptidmotiv) verschiedene Proteine als Interaktionspartner besitzen.

5.3 Detektion von Interaktionspartnern mittels Y2H-System

Mikrotubuli erfüllen im Laufe des Zellzyklus zahlreiche essentielle Funktionen, speziell bei pflanzlichen Zellen auch im Rahmen der Differenzierung und Formgebung nach der mitotischen Teilung. Zur Multifunktionsweise der Organisation dieser Multifunktionalität sind zurzeit wenige gesicherte Erkenntnisse bekannt. Die Manifestierung einer zentralen Rolle von γ -Tubulin bei der Nukleation von Mikrotubuli erfolgte bisher vor allem anhand von Forschungsergebnissen bezüglich der Pilze und der Vertebraten. Es konnte bereits pflanzliches γ -Tubulin aus *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* und *Vicia faba* in Proteinkomplexen nachgewiesen werden (STOPPIN-MELLET *et al.* 2000, DRYKOVÁ *et al.* 2003), welche Fähigkeit zur Verankerung von Mikrotubuli in *Arabidopsis* zeigten (DRYKOVÁ *et al.* 2003). Der Ablauf der Zusammenlagerung an die MTOCs ist jedoch bisher nicht richtig geklärt. Eine wichtige

Rolle könnten Homologe der in *Saccharomyces cerevisiae* mit γ -Tubulin interagierenden Proteine Spc97p und Spc98p übernehmen. Sie konnten bereits in pflanzlichen Zellen nachgewiesen werden (EHRHARDT *et al.* 2002). In diesem Zusammenhang wäre es notwendig die komplexen Vorgänge, die Identifikation und Charakterisierung der Bestandteile des wahrscheinlichen γ -Tubulin-Ringkomplexes (γ -TuRC) bzw. genereller Interaktionspartner von γ -Tubulin und des Interaktionsmechanismus aufzuklären. Als mögliche Interaktionsdomänen werden die C-terminalen Bereiche γ -Tubulins diskutiert, im Besonderen der γ -A und γ -B-Tubulin-Peptidbereiche. Sie sind an der Oberfläche des Proteins exponiert. Aufgrund von letztjährigen Ergebnissen ist es möglich, dass verschiedene Proteine in entscheidende Funktionen der Vernetzung spezifischer Mikrotubuli-Untereinheiten involviert sein könnten. Interessant ist in dieser Hinsicht ihre Interaktion mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs).

Mit der Y2H-Methode besteht die Möglichkeit Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu detektieren, welche Aufschluss über die differenzierten Funktionen des mit der GAL4-Bindedomäne fusionierten Köderproteins geben könnten. Interaktionen der GAL4-Bindedomäne mit einem anderen Protein, welches als Hybrid mit der GAL4-Aktivierungsdomäne exprimiert wird, führt zur Wiederherstellung des Transkriptionsfaktors, welche durch eine nicht kovalente Bindung zustande kommt (FIELDS 1993). Es folgt eine Transkription der nach geschalteten Reportergene, die das Wachstum der Hefekulturen auf Selektionsmedien unterschiedlicher Stringenz ermöglichen. In diesem Zusammenhang wurde auf das auf dem GAL4-Protein basierende Y2H-System zurückgegriffen. In der vorliegenden Arbeit wurden vier unterschiedliche Konstrukte verwendet (γ -AB, γ -AB⁺, γ -Ab_{c-Term} und γ -Tub), welche für die Subdomäne des γ -A und γ -B-Tubulin-Peptidbereichs mit unterschiedlichen flankierenden Bereichen codieren. Neben einer sequentiellen Co-Transformation erfolgte die Strategie des Matings zweier haploider Hefestämme mit unterschiedlichen Mating-Typen. Als Beutesequenz wurde eine cDNA-Bibliothek konstruiert. Sie sollte eine hohe Repräsentanz aller in diesem Zellteilungsstadium vorkommenden Sequenzen potentieller Interaktionspartner gewährleisten. Es konnten verschiedene Sequenzen im Rahmen dieser Studie identifiziert werden. Zumindest im Rahmen des Y2H-Systems scheinen deren Protein-produkte mit dem γ -Tubulin-A/B-Peptidbereich im Rahmen des Y2H-Systems zu interagieren. Detektiert wurden ein Poly(A)-Bindeprotein (PABP), die Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, sowie eine S-adenosyl-L-methionine-Synthetase (SAMS) aus *Nicotiana tabacum*. Ausserdem wurden diverse Proteasom-

Untereinheiten, wie eine der RPT4a-Untereinheit der 26S Proteasom-AAA-ATPase ähnliche Sequenz aus *Solanum tuberosum*, die 26S Proteasom-Untereinheit alpha 4 aus *Nicotiana benthamiana* und eine mutmaßliche 26S Proteasom-Untereinheit alpha 4 aus *Nicotiana tabacum*. Ausserdem konnten mit der sekretorischen Peroxidase, einer Ascorbat-Peroxidase (APX) und der NtPOX1-Peroxidase verschiedene Peroxidasen aus *Nicotiana tabacum* identifiziert werden. Des weitem konnten Sequenzen des Chloroplasten-genoms, welche für die Untereinheit 9 des PSI codieren und eine mitochondriale DNA aus *Nicotiana tabacum* als mutmaßliche Interaktionspartner ermittelt werden. Weitere Amplifikate der MCS des pGADT₇-Rec-Vektors waren ein Myosin-ähnliches Protein aus *Patinopecten yessoensis* (Scmlp), eine Sequenz auf dem 5. Chromosom des *Medicago truncatula*-Klons mth2-16f8 und diverse humane Sequenzen der Proteine DKFZp68 und DKFZp77.

Nachfolgend werden mögliche Interaktionsfunktionen der identifizierten Proteine mit γ -Tubulin und die generellen, bedeutenden Aspekte des Y2H-Systems diskutiert.

5.3.1 Problematik der Entstehung falsch positiver und falsch negativer Interaktionspartnern

Falsch Positive und falsch Negative Klone stellen den limitierenden Faktor des Y2H-Systems dar. Die falsch Negativen können aufgrund der Komplexität der Aktivierung *de novo*, durch strukturelle Defizite oder aufgrund von Instabilitäten der Hybridproteine hervorgerufen werden. Auch eine Eliminierung von falsch Positiven, cDNA-Bibliothek tragender Plasmiden, welche die Reportergene zwar aktivieren, aber nicht für interagierende Proteine codieren, ist im Y2H-System als kritisch anzusehen. Falsch Positive können ebenfalls aus Mutationen der Aktivierungsdomäne resultieren, oder durch Beuteproteine hervorgerufen werden, die mit einer Vielzahl von Köderproteinen interagieren. Außerdem ist denkbar, dass eine Interaktion zweier Proteine zustande kommt, die *in vivo* nicht im selben Gewebe oder Zellkompartiment, oder nicht zur gleichen Zeit exprimiert werden, und somit keine natürlichen Interaktionspartner repräsentieren (FIELDS 1993, VAN CRIEKINGE & BEYAERT 1999). Alle Konstrukte der in der cDNA codierten Proteine sollten zeitgleich auch *in vivo* zu γ -Tubulin exprimiert werden, da als Ausgangsmaterial jeweils 3 Tage alte BY2-Zellsuspensionen verwendet wurden.

Falsch Positive könnten generell durch einen Austausch von Köder- und Beutekonstrukt in den jeweils anderen Vektor eliminiert werden. Bei der Verwendung einer cDNA-Bibliothek als Beutekonstrukt, ist deren Fusion mit der GAL4-Bindedomäne jedoch nicht sinnvoll. Es würde zu einer großen Anzahl falsch Positiver führen, welche auf Eigenaktivierung der Reportergene zurückzuführen ist.

Aus mehrfachen Erfahrungen wird bestätigt, dass Resultate eines Y2H-Screens auch von der Art des Ködergens abhängt (FANG *et al.* 2002). Des weitern konnten einige Proteinklassen generell als nichtspezifische Interaktionspartner charakterisiert werden. Neben ribosomalen Proteinen und der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase zählen dazu auch die Proteasen und die Komponenten des Photosyntheseapparates (FANG *et al.* 2002). Die in dieser Arbeit identifizierte, für die Untereinheit 9 des Photosystem I codierende Sequenz der Chloroplasten-DNA wurde als falsch positiv eingestuft. Für niedere Landpflanzen wie Bryophyten und Pteridophyten ist die Organisation der Spindel-Mikrotubuli ausgehend von Plastiden zwar belegt (MARC 1997, VAUGHN & HARPER 1998), jedoch gilt eine zentrale Rolle von Untereinheiten des PS I als äußerst unwahrscheinlich. Außerdem dürften infolge der auf poly-A-Sequenzen basierenden Methode zur Herstellung der cDNA-Bibliothek, keine plastidären oder mitochondrialen Sequenzen auftreten. Sie scheinen allerdings im Rahmen der Organellenbewegung für Chloroplasten und Mikrotubuli relevant zu sein (SATO *et al.* 2000). Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass zahlreiche in Chloroplasten und Mikrotubuli aktive Proteine kerncodiert sind. Eine Modifikation auf dem Weg in die Organellen, die vor dem Eintritt in die Organellen beendet ist, wäre denkbar, sodass sie hier detektiert werden konnten (CHUONG 2002). Das würde allerdings einen γ -Tubulin-vermittelten Transport von Proteinen entlang der Mikrotubuli voraussetzen. Dieser ist bisher experimentell nicht bewiesen.

5.3.2 Sequentielle Co-Transformation und Mating im Vergleich

Die beiden Versuchsstrategien (Sequentielle Transformation und Mating) zeigten hinsichtlich der stringenzgekoppelten Eliminierung möglicher falsch Positiver verschiedene Charakteristika. Außerdem konnten beim Mating Unterschiede in Abhängigkeit der Köderkonstrukte festgestellt werden.

Bei der sequentiellen Co-Transformation konnten durch die Stringenzerhöhung auf SD-Trp/-Leu/-His/-Ade viele vermeintlich positive Kulturen eliminiert werden. Es kam zu einer Abnahme der Positiven Kolonien von jeweils ca. 40 auf 4, 6, 11 bzw. 14 Kolonien. Alle 35 Positiven Kolonien zeigten auf X- α -Gal-haltigem Medium eine Blaufärbung mit leichten Unterschieden in ihrer Intensität. Aus diesen Kulturen konnten durch Hefekolonie-PCR bzw. Plasmidextraktion mit folgender PCR insgesamt 30 Amplifikate unterschiedlicher Kolonien erzielt werden, welche sequenziert wurden. Manche Kolonien wiesen unterschiedliche Fragmentgrößen auf. Die Amplifikate unterschiedlicher Fragmentgröße aus derselben Kolonie lieferten dabei teilweise merkwürdigerweise identische Sequenzen. Die Ursachen für das Auftreten mehrerer Amplifikate sind unbekannt. Es ist unwahrscheinlich, dass zwei Inserts gleicher Art in zwei Plasmiden innerhalb einer Hefezelle vorliegen können. Es ist denkbar, dass die verwendeten Primer zusätzlich an weitere Sequenzen im Plasmid binden konnten. Denkbar wäre auch eine Verkürzung durch Rekombination.

Im Versuchsansatz des Matings konnten beim Köderkonstrukt pGBKT₇/ γ -AB zwei Drittel der auf TDO-Medium gewachsenen Kolonien durch eine Erhöhung der Stringenz auf SD-Trp/-Leu/-His/-Ade (QDO) ausgeschlossen werden. Bei pGBKT₇/ γ -AB⁺ waren es die Hälfte. In Bezug auf das Köderkonstrukt pGBKT₇/ γ -AB_{C-Term} kam es nur zum Wegfall von 5 der 52 Kolonien. Die 47 Kolonien erwiesen sich außerdem auch auf QDO⁺-Medium als positiv. Trotzdem konnte das Insert des pGADT₇-Rec-Vektors nur aus einer einzigen Kolonie mittels Plasmidextraktion und anschließender PCR amplifiziert werden. Es bleibt offen, ob die übrigen 46 als falsch Positive zu charakterisieren sind. Es könnte sich auch um ein Problem bei der Plasmidextraktion handeln.

Die sehr hohe Anzahl falsch positiver Kolonien in Abhängigkeit des Köderkonstruktes begründet sich wahrscheinlich nicht allein auf eine Beuteproteine bedingte Aktivierung der zu transkribierenden Reportergene. Eine wache Bindung der Aktivierungsdomäne an Promotorsequenzen in Abwesenheit der GAL4-Bindedomäne der falsch Positiven, erzeugen wahrscheinlich nicht mehr als eine unspezifische Aktivierung der Reportergene. Das gleiche kann auch für Mutationen angenommen werden (BENDIXEN *et al.* 1994).

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen ist nicht unproblematisch. Wegen der stabilen Zellwand, aber auch wegen der zum Teil enormen Größe und der geringen Kopienzahl der Plasmide. Schwierigkeiten bezüglich der Plasmidextraktion traten

verstärkt bei den Matingansätzen auf, weniger bei denen der sequentiellen Co-Transformation. Dies kann jedoch stochastisch nicht gerechtfertigt werden. Es wäre möglich, dass dies in der außerordentlich hohen Anzahl scheinbar falsch positiver Kolonien über alle Stringenzen in der Konstruktion des Köderhybridproteins begründet liegt. Zudem trat das Phänomen nur im Mating der Stämme AH109 und Y187, jedoch nicht bei der Co-Transformation von AH109 auf. Ausschlaggebend ist daher wahrscheinlich die Kombination der beiden Stämme mit dem Köderhybridprotein pGBKT₇/AB_{C-Term.}. Schon beim Eigenaktivierungstest war das Hintergrundwachstum der mit diesem Konstrukt transformierten Y187-Kulturen auf SD-Trp/-His und SD-Trp/-Ade aufgefallen. Hier konnte allerdings nur das Wachstumsverhalten der einzelnen mit pGBKT₇/AB_{C-Term.} transformierten Stämme kontrolliert werden. Es liegen also keine Erkenntnisse über das Wachstumsverhalten des diploiden Stammes auf diesen Medien vor. Zur Kontrolle wäre in Zukunft eine Durchführung eines Eigenaktivierungstests mit dem diploiden Stamm AH109 x Y187/pGBKT₇/AB_{C-Term.} überlegenswert. Dieser sollte aufgrund des Nahrungsreportergens TRP1 auf SD-Trp, jedoch nicht auf den übrigen Selektivmedien wachsen.

Anhand der Eigenaktivierungstests konnte die Toxizität der für das Mating sequentiellen Co-Transformation bestimmten und neu konstruierten Hybridproteine im Vorfeld ausgeschlossen werden. Es gab jedoch auch Indizien, dass sie die Hefezellen in ihrem Stoffwechsel beeinträchtigen könnten. Zudem bestand bei beiden Methoden die Gefahr, dass einige Klone eine spontane Deletionen besaßen und dadurch eventuell einen Wachstumsvorteil hatten, wenn das exprimierte Protein des ersten Plasmids mit dem Hefemetabolismus interferiert hat. Daraus könnten einige falsch positive Kolonien resultiert haben.

Ein möglicher Nachteil des Matings, der zur Bildung falsch Negativer Klone führen kann, ist die Gefahr, dass die transformierten Hefezellen während des Wachstums und dem eigentlichen Matingvorgang bestimmte cDNA-Plasmide bevorzugen (BENDIXEN *et al.* 1994). Damit würde die genetische Information der anderen eliminiert werden. Während der Mitose kann es zudem zum Verlust der Plasmide und unter selektiven Bedingungen zu Fehlverteilungen führen (PETRACEK & LONGTINE 2002). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass bestimmte BD-Hybridkonstrukte die Matingeffizienzen dezimieren können (GERA *et al.* 2002). Aufgrund der sehr hohen Matingeffizienzen von 18-94% bei einem von der Firma Clontech angegebenen Minimalwert von 5 % (MATCHMAKER™ Library Construction & Screening Kits

User Manual 2006) sollte dies für die vorliegende Studie jedoch ausgeschlossen werden können. Der potentielle Wechsel des Mating-Typs kann bei derart hohen Matingeffizienzen ebenfalls als ergebnisbeeinträchtigender Grund vernachlässigt werden (HABER 2002).

Ein entscheidender Vorteil des Matings ist, dass die Transformation mit der cDNA-Bibliothek nur einmal vollzogen werden muss. Die direkte Selektion auf middlestringenten Medien bewirkt zudem Materialersparnisse hinsichtlich der Agarplatten. Zusätzlich ist die Anzahl an Kolonien pro Platte unkritischer für die Selektion, als beim Screening durch Co-Transformation (BENDIXEN *et al.* 1994). Es wird postuliert, dass das Mating eine höhere Effizienz bezüglich der Identifikation seltener oder schwacher Interaktionen verspricht (FANG *et al.* 2002).

Auf einige kritische Faktoren, die im Rahmen beider Strategien zu falsch Positiven bzw. falsch Negativen geführt haben könnten, wird im Folgenden detaillierter eingegangen. Zusätzlich folgt eine Diskussion der einzelnen Isolate in Bezug auf mögliche funktionelle Korrelationen, auch unter Berücksichtigung hefespezifischer Faktoren.

5.3.3 Eigenaktivierungstests

Die Transkription der GAL4-induzierten Reportergene soll nur durch eine Wechselwirkung zwischen γ -Tubulin und dessen Interaktionspartnern erfolgen, und nicht durch die neu konstruierten BD-Köderkonstrukte selbstaktiviert werden. Die Eigenaktivierung musste daher durch Vorversuche ausgeschlossen werden. Durch die Ergebnisse der Vorversuche konnte davon ausgegangen werden, dass dies der Fall war. Es zeigte sich dennoch ein schwaches Hintergrundwachstum bei beiden *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen. Zwar sollte ein guter Y2H-Hefestamm eine hohe Sensibilität hinsichtlich geringer Veränderungen der Reportergenaktivität aufweisen (JAMES *et al.* 1996), ein Hintergrundwachstum erschwert jedoch die Bewertung positiver Kolonien. Es wird postuliert, dass eine Beschränkung auf die zuerst gewachsenen und größten Kolonien, zahlreiche wahrhaft Positive eliminieren könnten (JAMES *et al.* 1996, VAN CRIEKINGE & BEYAERT 1999). Die in der Größe der Zellen repräsentierte Intensität der Interaktion macht keine Aussage über ihre biologische Bedeutung (VAN CRIEKINGE & BEYAERT 1999). Es wurde daher auch Kolonien als Positiv bewertet, die erst nach einigen Tagen gewachsen waren, und über das Hintergrundwachstum

hinaus wuchsen (GERA *et al.* 2002). Je nach Intensität des Hintergrundwachstums erwies sich die Identifikation dieser Kolonien jedoch als schwierig. Es konnten daraus sowohl falsch positive als auch falsch negative Klone resultieren.

Das allgemein auftretende Hintergrundwachstum des Stammes Y187 lässt Rückschlüsse zu, dass er begrenzt auch ohne Histidin wachsen kann. Beim Stamm AH109 ist die Problematik einer leicht erhöhten HIS3-Expression allgemein bekannt. Das Zustandekommen könnte durch intrinsische DNA-bindende Eigenschaften oder durch die starke GAL4-Aktivierungsdomäne bewirkt werden, welche zwar die Detektion schwacher Interaktion ermöglicht, zusätzlich aber dadurch auch unvermeidlich zum Hintergrundwachstum führt (MATCHMAKER™ Library Construction & Screening Kits User Manual, VAN CRIEKINGE & BEYAERT 1999). Der konkurrierende HIS3-Inhibitor 3-Aminotriazol reduziert das Hintergrundwachstum, welches auf Aktivitäten des HIS3-Reportergens in Abwesenheit interagierender Proteine beruht (GERA *et al.* 2002). 3-Aminotriazol kann jedoch in den für die meisten Hefestämme nötigen Konzentrationen auch das Wachstum echt positiver Kolonien hemmen. Dies führt zu falsch negativen Klonen, da die Sensitivität des Histidin-Reportergens stark verringert wird (JAMES *et al.* 1996). Es wurde daher im Versuchsrahmen der vorliegenden Arbeit auf dessen Anwendung verzichtet. Es sollte eher die Problematik der HIS3-Expression durch zusätzliche Selektion über das stringenteres ADE2-Reportergen umgangen werden (GERA *et al.* 2002, JAMES *et al.* 1996, MATCHMAKER™ Library Construction & Screening Kits User Manual 2006). Bei der höchsten Stringenz auf SD-Trp/-Leu/-His/-Ade-Medium besteht das Risiko, nur sehr schwache Interaktionen nicht zu detektieren zu können, da die betreffenden Kolonien auf diesem Medium nicht mehr wachsen. Es ist daher fraglich, ob eine ausschließlich auf Histidin basierende Selektion, welche den Kreis potentieller Interaktionspartner γ -Tubulins erweitern könnte, sinnvoll erscheint (GERA *et al.* 2002). Es wäre dann notwendig die Interaktionen durch zusätzliche Versuche zu verifizieren, da das Problem der HIS3-Expression in AH 109 weiterhin bestehen würde. Durch Einsetzung des Stammes CG1945 könnte diese Problematik umgangen werden, da er kein „durchlässiges“ HIS3-Reportergen hat und die Selektion positiver Klone auf Medien ohne 3-AT erlaubt (FROMONT-RACINE *et al.* 2002). Er kann ebenso wie AH109 in Kombination mit Y 187 im Mating eingesetzt werden.

Denkenswert wäre auch eine andere Wahl der Plasmide. Von einigen Arbeitsgruppen wird das Plasmid pRS-ASK favorisiert, welches auch zur Counter-Selektion mit 5'-Fluorouracil-Säure eingesetzt werden kann. Es ist dadurch effizienter bei der

Reduzierung der Anzahl falsch Positiver, die auf Autoaktivierung der Reportergene durch Beuteproteine basieren. Zusätzlich ist es kompatibel mit den von Clontech kommerziell erhältlichen Bindedomänenvektoren (FANG *et al.* 2002).

Bei der Auswertung positiver Kolonien auf x-Gal-haltigem Medium ist zu beachten, dass positiv zu bewertende Kolonien von Screening zu Screening variieren können (FROMONT-RACINE *et al.* 2002). Dies kann durch die Eigenschaften des BD-Hybridkonstruktes, aber auch durch sein Expressionslevel bedingt sein. Die Sensitivität hinsichtlich X-Gal ist ein weiterer entscheidender Faktor. Die Kolonien der sequentiellen Transformation scheinen eine Korrelation zwischen der Intensität der Blaufärbung und einer eventuellen funktionellen Bedeutung der cDNA-codierten Proteine zu besitzen. Die Kolonien, deren cDNA-Inserts für das Poly-A-Bindeprotein, die GAPDH, die S-Adenosylsynthetase und die Proteasom-Untereinheit codieren, weisen eine starke Färbung auf. Bei den Mating-Kolonien konnte hinsichtlich der Intensität der Blaufärbung nichts festgestellt werden.

5.3.4 Transformation der Hefezellen

Bei der Transformation von Hefezellen ist im Vergleich zu Bakterien eine um etwa vier Größenordnungen niedrigere Effizienz festzustellen. Die Transformation der Hefen kann daher ein limitierender Schritt hinsichtlich eines umfassenden Screenings einer cDNA-Bibliothek sein (BENDIXEN *et al.* 1994, FANG *et al.* 2002). Um möglichst hohe Transformationseffizienzen zu erzielen, wurden die Co-Transformationen nicht simultan, sondern sequentiell durchgeführt. Die Transformationseffizienzen können dadurch etwa eine Größenordnung höher liegen, da die begrenzte Wahrscheinlichkeit der simultanen Aufnahme zweier Plasmide einer Co-Transformation umgangen wird. Die Transformationseffizienzen lagen dennoch etwa eine Größenordnung unterhalb des von Clontech angegebenen Optimums von 5×10^5 kbE/ μ g Plasmid-DNA. Ausnahmen waren die Transformationen mit den pGBKT₇-Kontrollvektoren, bei denen eine geringere Effizienz jedoch vernachlässigt werden konnte. Bei der zweiten Transformationen mit dem pGADT₇-Rec-Vektor und der cDNA-Bibliothek waren die Effizienzen mit Werten zwischen $6,17 \times 10^3$ und $1,38 \times 10^4$ kbE/ μ g Plasmid-DNA ebenfalls nicht optimal. Trotzdem wurden sie als ausreichend erachtet. Denn auch durch das von Clontech empfohlene YPD-PlusLiquid-Medium konnten keine effizientere

Transformation aufgrund materieller Defizite erzielt werden. Eine Diversität der identifizierten Sequenzen weist außerdem darauf hin, dass eine höhere Transformationseffizienz die Breite dieses Spektrums erweitern könnte. Man müsste sie dazu hinsichtlich der relevanten Fragestellung nicht optimieren. Zur Erzielung höherer Transformationseffizienzen wäre die Verwendung anderer Hefestämme mit zusätzlichen Möglichkeiten der Stringenz erhöhungen sinnvoll.

5.3.5 Homologe Transformation

Homologe Rekombinationen in *Saccharomyces cerevisiae* erlauben hohe Raten zielgerichteter Modifikationen des Hefegenoms (PETRACEK & LONGTINE 2002). Im Rahmen der homologen Rekombination der SMART III und CDS III-Sequenzen bilden die hefespezifischen Enzyme eine zirkuläre Form des pGADT₇-Rec-Vektors mit inserierter cDNA. Dies bewirkt die Funktionsfähigkeit des GAL4-AD/cDNA-Expressionsvektor. Es erübrigt sich somit eine vorausgehende Ligation. Bei der homologen Rekombination waren jedoch auch gewisse Problematiken zu beobachten. Die Rekombinationsrate konnte hier nicht ermittelt werden. Die Transformations-effizienz mit dem pGADT₇-Rec-Vektor lag in einer akzeptablen Größenordnung vor. Aber diese Tatsache kann keine erfolgreiche Rekombination mit einer cDNA-Sequenz garantieren. Zu diesem Zweck erscheint es sinnvoll eine Kontrolltransformation mit dem pGADT₇-Rec-Vektor und einem Fragment des T-Antigens des Simian Virus 40 (SV40) durchzuführen (LI & FIELDS 1993). Eine Selektion wäre aufgrund dessen Interaktion mit dem Proteinprodukt des ebenfalls in die Hefezellen transformierten pGBKT₇-53-Vektors möglich, in denen das T-Antigen das Simian Virus 40 durch homologe Rekombination mit der Aktivierungsdomäne des Rec-Vektors fusioniert wurde. Man könnte damit die Rekombinationseffizienz in den Hefezellen zumindest annäherungsweise quantifizieren (MATCHMAKER™ Library Construction & Screening Kits User Manual 2006). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass eine von Hefezellen aufgenommene DNA mit einer fehlenden ‚Origin of Replication‘ und die Homologie zum Hefegenom zeigt, darin integriert werden kann. Hierfür ist eine Länge der homologen Sequenzen von nur 30-50 bp ausreichend (OLDENBURG *et al.* 1997, PETRACEK & LONGTINE 2002). Außerdem müssen auf Rekombination basierende homologe Sequenzen nicht am Ende der Sequenzen liegen (MA *et al.* 1987). Es wurde

gezeigt, dass lineare DNA-Fragmente die Rekombination in *Saccharomyces cerevisiae* effizient stimulieren können, und dass auch zirkuläre Hybridplasmide durch reziprokes Crossing-over integriert werden können ORR-WEAVER *et al.* (1981). Deshalb sollte man anstelle des pGADT₇-Rec-Vektors eine homologe Rekombination bestimmter cDNA-Sequenzen mit hefeeigenen Genomabschnitten als systembedingte Barriere ansehen, durch die eine Detektion als Interaktionspartner im Yeast-Two-Hybrid-System unterbunden wird.

5.3.6 Qualität der RNA und der c-DNA-Bibliothek

Der Erfolg eines Y2H-Screenings ist von der Qualität der cDNA abhängig (LIU 1998, VAN CRIEKINGE & BEYAERT 1999). Für eine cDNA von hoher Qualität und Repräsentativität gibt es eine Reihe von Merkmale. Hinsichtlich einer umfassenden cDNA-Bibliothek ist nicht nur durch die Repräsentation möglichst vieler unterschiedlicher Gene wichtig, sondern auch eine Vielzahl verschiedener fusionierter Sequenzen eines Gens, welche eine ausreichende Komplexität garantieren (JAMES *et al.* 1996). Diese muss vor allem Sequenzen beinhalten, welche für den Amino-Terminus eines Proteins codieren. Einem Bereich der meist nicht adäquat repräsentiert wird (JAMES *et al.* 1996). Er kann jedoch Signalsequenzen bezüglich posttranslationaler Modifikationen tragen (RICHTER 1998). Die vorliegenden Ergebnisse und ihre Relevanz werden später diskutiert.

Ein kritischer Faktor ist die optimale Fragmentgröße der cDNA-Inserts. Es ist möglich, dass cDNA-Inserts im pGADT₇-Rec-Vektor für nur ein Fragment eines möglichen Interaktionspartners codieren. Es könnte dadurch eine Interaktion mit dem Köderprotein nur aufgrund der exponierten Stellung bestimmter Domänen in solchen partiellen Proteinen hervorgerufen werden. Auch wenn eine Interaktion zwischen der Volllänge dieses Proteins und dem Köderprotein *in vivo* nicht auftritt (FIELDS 1993). Daher ist eine Mindestgröße der Inserts zur Expression ausreichend großer Protein-Fragmente entscheidend (JAMES *et al.* 1996). Dass größere cDNA-Inserts in einer erheblich höheren Anzahl falsch positiver Klone resultiert ist jedoch belegt (BARTEL *et al.* 1993). Daher ist es eher je nach Art der Interaktion sinnvoller, ein Screening mit Untereinheiten durchzuführen (GRÜNENFELDER & WINZELER 2002). Es konnte auf keine experimentell belegte Erkenntnisse bezüglich der potentiellen, mit

pflanzlichem γ -Tubulin interagierenden Domänen zurückgegriffen werden. Da die Studie nur auf Hypothesen beruhte, dass Homologe zu Spc98p oder Spc97p mit diesem interagieren könnten, lagen keine Daten über die optimale Größe der cDNA-Inserts vor. Aufgrund dieser Informationen wäre eine Fragmentierung der cDNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym möglich (JAMES *et al.* 1996).

γ -Tubulin ist in allen Eukaryoten hoch konserviert, bei Pflanzen liegen die Identitäten auf Aminosäurebasis bei 90-95 % (MARC 1997, OVECHKINA & OAKLEY 2001, SCHMIT 2002). Auch eine funktionelle Konservierung gilt als sicher (OAKLEY 2000). Man kann daher auch eine Konservierung der Interaktionspartner in Betracht ziehen, vor allem nachdem Homologe von Spc98p in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen wurden (ERHARDT *et al.* (2002). Das in dieser Untersuchung produzierte Amplifikat, der zu Spc98 homologen Sequenz, umfasste 2600bp. Potentielle Interaktionspartner könnten durch ähnlich große Sequenzen codiert werden. Der Umfang der durch cDNA-Synthese erzielten Fragmentgrößen sollte daher hinsichtlich des Projektes qualitativ Ausreichend gewesen sein. Ebenso sollte die richtige Integration der cDNA in den Vektor im korrekten „Open Reading Frame“ der unterschiedlichen Sequenzen von SMART III und CDS II gewährleistet sein.

Ein Problem hinsichtlich der Qualität der cDNA-Bibliothek ist generell eine mangelhafte oder fehlende Repräsentation selten exprimierter Proteine (JAMES *et al.* 1996). Sowohl die Köderkonstrukte als auch die cDNA-Bibliothek wurden aus einer 3 Tage alten BY2-Zellkultur synthetisiert. Zu diesem Zeitpunkt der Zellteilung konnte die Expression von γ -Tubulin garantiert werden (SCHLAG 2002). Auch eine hohe Repräsentanz der Sequenzen, welche für die mit γ -Tubulin interagierenden Proteine codieren, sollten in diesem Stadium vorliegen. Die Kultur enthält neben mitotischen auch postmitotische Stadien, in denen γ -Tubulin eine Rolle spielen könnte.

Bei der Extraktion von gRNA erhält man neben messenger-RNA auch ribosomale RNA und Transfer-RNA. Zur Erstellung von cDNA-Bibliotheken wird generell zu einer Selektion der Poly-(A)-RNA aus der isolierten gRNA unter Anwendung von Oligo-dT-Nukleotiden geraten (MÜLHARDT 2003). Dadurch kann der Anteil an mRNA von 2% auf etwa 50% ansteigen. Man muss aber beachten, dass adeninreiche Sequenzen anderer RNA-Klassen existieren, welche dadurch nicht eliminiert werden können, wie z.B. die der identifizierten plastidären Photosystem-Untereinheit.

Eine Möglichkeit zur Optimierung, und Umgehung dieser Problematik, liegt in der Verwendung von Random-Hexamer-Primern bei der Erstellung der cDNA. Die

Oligo(dT)-Primer bieten den Vorteil, dass die cDNA ausgehend vom Poly-A-Schwanz am 3'-Ende synthetisiert werden kann. Der Nachteil besteht aber jedoch darin, dass die in der Regel verwendeten reversen Transkriptasen nur cDNA einer durchschnittlichen Länge von 1-2kb Länge synthetisieren können. mRNAs können jedoch bis zu 10kb lang sein und die experimentell relevanten Sequenzen in der Nähe des 5'-Endes tragen (MÜLHARDT 2003). Random-Hexamer-Primer bestehen aus einer Mischung von Hexanukleotiden mit einer zufälligen Abfolge von 6 Basen. Sie hybridisieren daher unspezifisch an die mRNA. Da somit auch Sequenzen näher des 5'-Endes hybridisiert werden können, kommt es zu einer höheren Wahrscheinlichkeit, dass möglichst viele mRNA-Bereiche in der cDNA vertreten sind. Auch die Prozessivität der Reversen Transkriptase kann ein limitierender Faktor für die Qualität der cDNA sein, da selbst unter optimalen Bedingungen nur etwa 10-30 % der mRNA in cDNA umgeschrieben werden können (LOTTSPEICH & ENGELS 2006). Es ist daher anzunehmen, dass Sequenzen einiger Interaktionspartner γ -Tubulins nicht in der cDNA-Bibliothek repräsentiert waren.

In Eukaryoten wird die mRNA noch im Kern verschiedenen Modifikationen unterzogen, die man als Prozessierung bezeichnet. Die Prozessierung betrifft vor allem die 5'- und 3'-Enden. Sie ist für eine effiziente Transkription und zur Stabilität der mRNA notwendig (SEYFFERT 2003). Es wäre Möglich, dass in der zur Erststrangsynthese verwendeten gRNA prä-mRNA oder nicht ausreichend prozessierte mRNA enthalten war. Eine Umschrift solcher Sequenzen und deren Ligation in den pGADT-Rec-Vektor, könnten sowohl funktionelle Defizite der tatsächlich interagierenden Proteine, als auch falsch positive Interaktionen zustande kommen.

5.3.7 *Saccharomyces cerevisiae* als Expressionsvektor

Bei der Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen als Expressionsorganismus ist auch eine Interaktion der Bindedomänen- bzw. der Aktivierungsdomänenhybridproteine mit den Hefeeigenen Protein als Möglichkeit nicht auszuschließen. Vor allem die Tatsache zahlreicher hefeeigener MAPs, welche starke Homologien zu Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* aufweisen, und die hohe Konservierung γ -Tubulins in allen Eukaryoten (einschließlich der Hefe), die vermutlich auch für dessen Interaktionspartner postuliert werden kann, macht dies wahrscheinlich

(GARDINER & MARC 2003). Es könnten daher eventuell sowohl die mit der Bindedomäne fusionierten Köderproteine sowie die Aktivierungsdomänenhybride für eine Interaktion nicht zugänglich gewesen sein, was das Ausbleiben einer Transkription bewirkte. Darüber hinaus wäre es möglich, dass die Expression einiger Hybridproteine innerhalb der Hefezelle instabil ist. Gerade bei Protein-Wechselwirkungen, welche normalerweise an der Zelloberfläche stattfinden, wäre daher ein Phagen-expressionssystem eventuell besser geeignet (Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual 1999).

5.3.8 Amplifikation und Sequenzierungsqualität der MCS des pGADT₇-Rec-Vektors

Die zur Amplifikation der MCS des pGADT₇-Rec-Vektors verwendete *Taq*-Polymerase sowie im Cycle-Sequencing weist Vor- und Nachteile auf. Man erhält zwar bei ihrer Verwendung die besseren Sequenzierergebnisse, da GC-reiche Strukturen besser aufgelöst werden können. Aber eine generelle Fehlerrate ist nicht zu vernachlässigen (MÜLHARDT 2003). Nach ca. 30 Zyklen muss man damit rechnen, dass etwa 25 % der amplifizierten Fragmente mehrere Mutationen enthalten. Eine Verwendung von Polymerasen mit Korrekturaktivität führt nur zu ca. 3% mutierten Fragmenten (MÜLHARDT 2003). Die Fehlerrate steigt bei zunehmender Zyklenzahl und längeren Templates bei der *Taq*-Polymerase stärker an als bei Proofreading-Polymerasen. Eine Anwendung einer Proofreading-Polymerase ist also eventuell sinnvoll bei den hier relevanten Fragmentengrößen von 550-1600bp zur Spezifizierung und Identifizierung in Betracht zu ziehen.

Die Sequenzierungen lieferten zudem teilweise qualitativ schwache Ergebnisse. Manche Amplifikate konnten nur partiell sequenziert werden. Sie erschwerten teilweise Vergleiche mit Homologen und könnten zu falschen Ergebnissen geführt haben. Ausschlaggebend ist hier wahrscheinlich eine zu geringe Template-Menge im Cycle-Sequencing oder ethanolische Reste des bei der Aufreinigung verwendeten Puffers.

5.3.9 Mögliche funktionelle Defizite infolge inkorrektter Struktur und veränderter Oberflächeneigenschaft der Proteine

Die Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* bietet den Vorteil Interaktionen in einem eukaryotischen Organismus *in vivo* nachweisen zu können. Unterschiede im Zellmilieu könnten aber zwischen pflanzlichen Zellen und den Hefezellen Konformationsänderungen der Proteine verursachen. Auch die Modifikationen der Hefe sind zum Teil im Vergleich zu den anderen eukaryotischen Organismen verschieden. Eine solche veränderte Faltung beeinflusst Struktur und Oberflächeneigenschaften der Proteine. Es kann dadurch zu fehlerhaften Versuchsergebnissen kommen. Eine zusätzliche Einschränkung besteht in der Untransportierbarkeit bestimmter Proteine in den Zellkern.

Ein Indiz hinsichtlich dieser Problematik strukturell und funktionell defizitärer Köderproteine kann die Identifikation diverser Proteasomuntereinheiten als interagierende Proteine des γ -Tubulin-A/B-Peptidbereichs sein. Im Rahmen des Matings und der Co-Transformation konnten unabhängig voneinander Proteasom-Untereinheiten wie die RPT4a-Untereinheit der 26S Proteasom-AAA-ATPase ähnliche Sequenz aus *Solanum tuberosum*, die 26S Proteasom-Untereinheit alpha 4 aus *Nicotiana benthamiana* und die vermutliche 26S Proteasom-Untereinheit alpha 4 aus *Nicotiana tabacum* identifiziert werden.

ATP-abhängige Proteasen stellen eine Möglichkeit des Proteinabbaus dar, wenn die dreidimensionale Konformation, Voraussetzung für die Funktion aller Proteine, nicht erzielt werden konnte (FRÖHLICH 2005). Sie besitzen chaperonähnliche Eigenschaften und sind neben ihrer Funktion bei der Qualitätskontrolle von Proteinen auch am kontrollierten Abbau kurzlebiger Proteine, und somit maßgeblich an der Regulation von verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt (KLANNER 2001).

Das im Zytoplasma und Zellkern von Eukaryonten und Archaeobakterien lokalisierte ca.700bp große 26S-Proteasom stellt einen Proteinasekomplex dar, dass hochselektiv ist (KLANNER 2001, Internetquelle: http://www.uni-stuttgart.de/ibc/wolf/proteasome_deutsch.html). Er ist in allen Eukaryoten, also auch in der Hefe, hoch konserviert (TAKEUCHI 2004). Das eukaryotische Proteasom besteht aus zwei komplexen Teilkomponenten. Einem zylindrischen 20S Kernpartikel, sowie

einem 19S Cap-Partikel. Die biologisch aktive Einheit innerhalb der Zelle ist der Gesamtkomplex, das sogenannte 26S Proteasom.

Das 26S Proteasom ist essentiell für das Leben der Zelle und hat die Aufgabe, eine Vielzahl von Proteinen wie metabolische Enzyme, Transkriptionsfaktoren oder auch den Zellzyklus regulierende Proteine wie Zykline, CDK-Inhibitoren oder Zellzyklusregulatoren auf bestimmte Signale hin abzubauen. (Internetquelle: http://www.uni-stuttgart.de/ibc/wolf/proteasome_deutsch.html).

Die Identifikation der drei Proteasom-Untereinheiten könnte auf der funktionell inkorrekten Struktur der Köderkonstrukte des γ -Tubulin-A/B-Peptidbereichs beruhen. Allerdings wurde die Tertiärstruktur der Köderkonstrukte durch die Sequenzdatenbank SwissProt (<http://www.expasy.org/spdbv>) überprüft. Durch eine Überlagerung der Proteinstrukturen wurden die Köderkonstrukte mit aktiven Zentren und relevanten Domänen homologer Proteine verglichen. Das Ergebnis wies eine Übereinstimmung der Tertiärstruktur im Vergleich zum menschlichem γ -Tubulin von über 90% auf. Die vorliegenden Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass die Fusion mit der GAL4-Bindedomäne eventuell doch zu strukturellen Änderungen führen, welche sich nachfolgend als Konsequenz in der Funktionalität und einer limitierten Aktivität bzw. Inkompatibilität auswirken. Es wäre möglich, dass das γ -Tubulin in den vorliegenden Fällen regulatorischen Abbauprozessen innerhalb der Hefezelle unterliegt, für die cDNA- codierte Proteine rekrutiert werden. Interessant ist, dass es sich im Falle des 26S-Proteasoms um einen Vertreter der Ntn-Hydrolasen handelt (*N-terminal nucleophile-Hydrolasen*, KLANNER 2001). Sie wurden mit den Konstrukten AB bzw. AB⁺, jedoch nicht beim für den C-Terminus codierenden Sequenz AB_{C-Term.} und der Volllänge γ -Tub detektiert. Diese Ergebnisse müssen bei der Auswertung der übrigen mit diesen beiden Köderkonstrukten ermittelten potentiellen Interaktionspartner berücksichtigt werden. Eine Initialisierung der Proteinfaltung kann *in vivo* entweder kotranslational (vor dem Abschluss der Proteinsynthese) erfolgen oder posttranslational nach dem Verlassen der Polypeptidkette aus den Ribosomen (FRÖHLICH 2005).

Defizite in der Funktion könnten auch durch das Unterbleiben posttranslationaler Modifikationen in Abwesenheit der dazu erforderlicher Enzyme hervorgerufen werden. Eine auffällige und vielleicht entscheidende posttranslationale Modifikation scheint in der Phosphorylierung von Tyrosin zu bestehen. Es konnte gezeigt werden, dass hefeeigenes γ -Tubulin ein Phosphoprotein ist, und dass für die Phosphorylierung ein konserviertes Tyrosin im C-terminalen Bereich essentiell ist (VOGEL *et al.* 2000 und

2001). Eine Phosphorylierung dieses Restes führt zu einer Zunahme neu entstehender Mikrotubuli in der Nähe der Spindelpolkörper. Eine Mutation dieses Restes bewirkt einen Stillstand zu Beginn der Anaphase und verändert außerdem die Dynamik der Mikrotubuli-Plus-Enden. Es ist anzunehmen, dass die Phosphorylierung von γ -Tubulin für die Regulation der Mikrotubulinukleation in *Saccharomyces cerevisiae* entscheidend ist. Es zeigt außerdem, dass nur eine einzige Aminosäure für die Funktionalität relevant sein kann. Ähnliche Rückschlüsse in Hinblick auf pflanzliches γ -Tubulin könnte eventuell gerechtfertigt sein. Wenn posttranslationale Modifikationen C-terminaler Peptidbereiche essentiell für die Funktionalität des γ -Tubulins sein sollten, wäre es durch eine Proteasombedingte Hydrolyse der C-Terminus-freien Köderkonstrukte erklärbar. Der von VOGEL et al. (2000 und 2001) beschriebene Peptidbereich in *Nicotiana tabacum* ist zwar nicht konserviert, allerdings liegen hinsichtlich analoger Aminosäuresequenzen pflanzlichen γ -Tubulins bislang keine Studien vor. Ein möglicher Lösungsansatz dazu könnte in der Co-Expression entsprechender Enzyme bestehen (VAN CRIEKINGE & BEYAERT 1999). Dazu müssten die γ -Tubulin-Ködersequenzen neben der GAL4-Bindedomäne auch mit der Sequenz, welche für das entsprechende Enzym codiert, fusioniert werden (GUO et al. 2004). Eine Funktionen der detektierten Proteinen S-adenosyl-L-methionine-Synthetase und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase mit dem Köderkonstrukt AB_{C-Term.} sind nach jetzigem Wissensstand noch sehr wage. Sie werden in den folgenden Kapiteln näher diskutiert. Auch die unterschiedliche Funktion aktiver und inaktiver γ -Tubulin-Moleküle könnte im Zusammenhang mit posttranslationalen Modifikationen stehen. Die γ -Tubulin-Ring-Komplexe kommen zu 80% im Cytosol wahrscheinlich in inaktiver Form vor. Es wird daher eine Aktivierung am Centrosom diskutiert.

5.3.10 Identifizierte Proteine

Die Verwendung der *Taq*-Polymerase zur Amplifikation der MCS des pGADT₇-Rek-Vektors und im Cycle Sequencing birgt Vor- und Nachteile. Ihre Verwendung resultiert in besseren Sequenzierergebnissen, da GC-reiche Strukturen besser aufgelöst werden können (MÜLHARDT 2003). Jedoch ist ihre generelle Fehlerrate nicht zu vernachlässigen. Nach etwa 30 Zyklen muss einkalkuliert werden, dass ca. 25 % der amplifizierten Fragmente einige Mutationen enthalten können. Die Verwendung von

Polymerasen mit Korrekturaktivität würde nur 3% mutierte Fragmente liefern (MÜLHARDT 2003). Die Fehlerrate steigt bei höherer Zyklenzahl und längeren Templates unter Verwendung *Taq*-Polymerase stärker an als bei Proofreading-Polymerasen. Die Anwendung von Proofreading-Polymerasen wäre demnach bei hier relevanten Fragmentengrößen von 550-1600 bp in Erwägung zu ziehen, um die Identifizierung homologer Sequenzen spezifizieren zu können.

Außerdem waren die Ergebnisse zum Teil qualitativ sehr begrenzt. Manche Amplifikate konnten nur partiell sequenziert werden. Es wurde daher teilweise der Vergleich mit Homologen im BLAST erschwert und könnte zu falschen Ergebnissen geführt haben. Ausschlaggebend könnten eine zu geringe Template-Menge im Cycle Sequencing oder ethanolische Reste des bei der Aufreinigung verwendeten Puffers sein.

5.3.10.1 Identifikation der S-Adenosyl-L-Methionin-Synthetase

Die S-Adenosyl-L-Methionin-Synthetase, welche auch Methionin-Adenosyltransferase oder kurz SAM-S genannt wird, vermittelt durch den Transfer einer Adenosylgruppe von ATP auf das Schwefelatom des Methionins unter Freisetzung von Phosphat und Pyrophosphat die Synthese von S-Adosylmethionin. Durch die positive Ladung des Schwefelatoms wird die Methylgruppe des Methionins aktiviert (HELDT 2003). Bei S-Adosylmethionin handelt es sich um den wichtigsten Methylgruppendonator, der an der Methylierung von Nukleinsäuren, Proteinen, Kohlenhydraten, Membranlipiden und vielen anderen Substanzen in der Zelle beteiligt ist. Sie kann auch Ausgangsstoff für diverse Stoffwechselverbindungen sein (HELDT 2003). So wird z.B. die Ethylensynthese von höheren Pflanzen mit der Umwandlung von Methionin zu S-Adosylmethionin eingeleitet (RICHTER 1998). Es wird die Möglichkeit diskutiert, dass Assoziationen der S-Adosyl-L-Methionin-Synthetase mit anderen Proteinen ihre Spezialisierungen bedingen (SCHRÖDER *et al.* 1997). Die S-Adosyl-L-Methionin-Synthetase wurde unter Verwendung des Köderkonstruktes pGBKT₇/AB+ identifiziert. Dieses codiert nicht für den im Hinblick auf Modifikationen wahrscheinlich bedeutungsvollen C-Terminus. In dem durch dieses Köderkonstrukt codierten Peptidbereich liegen vier Methionine (AS 261, 282, 306 und 316) die als Substrate relevant sein könnten. Es wäre auch denkbar, dass dieser Peptidbereich nur für die Bindestelle der S-Adosyl-L-Methionin-Synthetase codiert, die Modifikationen aber trotzdem im C-terminalen Bereich erfolgen, der drei weitere Methionine enthält (AS

391, 461 und 520). Die Bedeutung der S-Adenosyl-L-Methionin-Synthetase ist jedoch aber auf der Basis möglicher funktioneller Defizite des Hybridproteins GAL4-BD/ γ -AB+ und einer äußerst kurzen auswertbaren Sequenz recht hypothetisch. Sie müsste durch weitere Forschung verifiziert werden.

5.3.10.2 Identifikation der Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase (GAPDH)

Des Weiterem wurde die Untereinheit GapC der GAPDH identifiziert. GAPDH ist das Schlüsselenzym der Glykolyse und das erste glycolytische Enzym, bei dem die Assoziation mit Tubulin postuliert wurde (HUITOREL & PANTALONI 1985, DURRIEU *et al.* 1987). Es konnte gezeigt werden, dass GAPDH an polymersierte Mikrotubuli bindet und deren Nukleation bewirkt (HUITOREL und PANTALONI 1985). Durch eine Zugabe von ATP kommt es jedoch zur Dissoziation der Mikrotubuli-Bündel in einzelne Mikrotubuli. Die durch Co-Sedimentation erzielten Ergebnisse bestätigen ebenfalls, dass Proteine des Cytosols wie GAPDH *in vivo* an Komponenten des Cytoskeletts binden (WALSH 1989). Hier wurde eine strukturelle Rolle dieser Proteine bei der Formation des mikrotubulären Netzwerkes postuliert. Es liegen Studien zur konzentrationsbedingten Bindung von GAPDH an Mikrotubuli vor (SOMERS *et al.* 1990). Bindung von tierischen GAPDH an Tubulinpolymere unabhängig von MAPs, ist durch Studien an Ratten bewiesen (DURRIEU *et al.* 1987). Durch eine Co-Sedimentation konnte eine Assoziation, den intrazellulär entsprechenden Konzentrationen, nachgewiesen werden. Zudem bestätigen ihre Ergebnisse die Abhängigkeit der Mikrotubuli-Polymerisation von der Enzymkonzentration, und weisen eine GAPDH-abhängige Veränderungen bezüglich der Mikrotubuli-Depolymerisation nach. Die Mikrotubuli scheinen eine begrenzte Anzahl an Bindestellen für GAPDH zu haben. Die Bindung ist jedoch spezifisch und hängt von Veränderungen der Nukleationscharakteristika ab (DURRIEU *et al.* 1987). Durch sie kommt es zur Veränderung der räumlichen Mikrotubuli-Organisation und könnte mit ihrer Stabilität und Vernetzung in Zusammenhang stehen. Versuche bei Säugern, wie z.B. an Kaninchen weisen darauf hin, dass die durch Proteinkinasen phosphorylierte GAPDH, nicht nur für die Mikrotubuli-Dynamik, sondern auch für die Bindung von β -Tubulin an Membranen wichtig ist (TISDALE 2002). Eine Dephosphorylierung von GAPDH führt zu einer erheblichen Abnahme membrangebundenen β -Tubulins. Es wurde außerdem

gezeigt, dass GAPDH in Säugern die Interaktion des Proteins p22 mit Mikrotubuli vermittelt (ANDRADE *et al.* 2004). Unter p22 werden die Säugerhomologe von Drip71 zusammengefasst, welches in *Drosophila melanogaster* mit den Komponenten des γ -TuSC interagiert. Es wird vermutet, dass durch GAPDH die p22-abhängige Interaktion zwischen Mikrotubuli und Membranen stimuliert oder erleichtert wird. Eine GAPDH-spezifische Bindedomäne wurde z.B. im C-Terminus von α -Tubulin (AS 409-451) nachgewiesen (TISDALE 2002 und ANDRADE *et al.* 2004). Neben der Rolle von GAPDH hinsichtlich des tierischen Cytoskeletts liegen auch analoge Studien bei Pflanzen vor. Im Rahmen eines Y2H-Screenings wurde nach Interaktionspartnern von Actin aus *Zea mays* gesucht und dabei GAPDH identifiziert (HOLTGRÄWE *et al.* 2005). Durch Proteinaufreinigung aus den Hefen mit anschließender Antikörper-Detektion und durch Co-Sedimentation wurde eine Interaktion von GAPDH und F-Actin detektiert. Die dokumentierte Inaktivierung von GAPDH nach Bindung an Mikrotubuli bei Säugern (DURRIEU *et al.* 1987) wurde von auch für Pflanzen bestätigt (HOLTGRÄWE *et al.* 2005). Die Ergebnisse lassen außerdem auch einen Mikrotubuli-stabilisierenden Effekt der GAPDH in Pflanzen als möglich erscheinen.

Es lagen zuvor bereits Indizien vor, dass GAPDH das Cytoskelett nicht nur durch Mikrotubuli-Nukleation modifiziert, sondern auch die Förderung der Actin-Polymerisation bewerkstelligt (TISDALE 2002). Die Interaktion von GAPDH mit F-Actin neben ihrer Funktion in der Mikrotubuli-Nukleation wurde bereits 1990 von BALABAN & GOLDMAN erwähnt. Die Detektion von GAPDH mittels Y2H-System unter Verwendung unterschiedlicher Köderkonstrukte des pflanzlichen Cytoskeletts könnte auf systembezogene Probleme hinweisen (HOLTGRÄWE *et al.* 2005, vorliegende Arbeit). Durch weitere Versuche wäre zu verifizieren, ob die GAPDH nicht auch die intracytoskellatale Interaktion zwischen Actinfilamenten und Mikrotubuli vermittelt. Die beiden Komponenten des Cytoskeletts könnten auch analoge Funktionen ausführen, in welche die GAPDH involviert ist, z.B. intrazelluläre Transportfunktionen. Hinsichtlich der Interaktion pflanzlichen Actins mit Mikrotubuli sind die Studien noch in den Anfängen. Aber Beobachtungen einer abweichenden Aggregation und Stabilisierung von Mikrotubuli in Actin-enthaltenden Zellen deuten auf eine Kontrollfunktion des Actins über Mikrotubuli hin, und scheinen deren Interaktion mit den Plus-Enden zu bestätigen (MATHUR 2005).

In diesem Zusammenhang ist auch die Identifikation eines Proteins interessant, welches dreimal unabhängig voneinander mit 100 %iger Identität der 31-40bp umfassenden

Sequenzen, identifiziert wurde. Dabei handelt es sich um das Myosin-ähnliche Protein Scmlp aus der Muschel *Patinopecten yessoensis*.

Denkbar wäre auch eine Rolle des Cytoskeletts bei der Kompartimentierung solcher Enzyme wie GAPDH (HOLTGRÄWE 2005). Die Untereinheiten GapA und GapB der plastidären Isoenzyme der GAPDH aller Angiospermen sind kerncodiert und werden vor ihrem Eintritt in den Chloroplasten auf dem Weg durch die Zelle modifiziert (RICHTER 1998).

Die Untereinheit B der GAPDH aus Chloroplasten zeigt interessanterweise auch 92 % Homologie zu den AS 125-288 von β -Tubulin aus *Chlamydomonas* (CERFF *et al.* 1986). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieses dem β -Tubulin-ähnliche Polypeptid als Untereinheit des Photosyntheseenzym wirken könnte, indem die Untereinheit B durch posttranslationale Modifikationen von β -Tubulin während des Transportes in den Chloroplasten entsteht (CERFF *et al.* 1986). Die zweite Domäne von GAPDH besitzt außerdem große Sequenzähnlichkeiten zu der 26 AS umfassenden Insertion in der H6-H7-Schleife von ϵ -Tubulin (INCLÁN & NOGALES 2001). In diesem Zusammenhang der Suche nach funktionell analogen Komplexen zu Spindelpolkkörpern und Centrosomen ist die Funktion von δ - und ϵ -Tubulin eher hypothetisch. δ -Tubulin wurde als Bestandteil der Triplett-Mikrotubuli in Basalkörpern, ϵ -Tubulin in Abhängigkeit vom Zellzyklusstadium am Centrosom nachgewiesen. Letzteres bindet aber auch an den Plus-Enden der Mikrotubuli an β -Tubulin (INCLÁN & NOGALES 2001). Die Sensitivität des Y2H-Systems kann auch schwache Interaktionen zwischen Proteinen einer Familie detektieren, welche *in vivo* nicht interagieren (FIELDS 1993). Aufgrund der hohen Homologien besteht die Möglichkeit, dass dieser Fall zwischen GAPDH und β -Tubulin aus *Chlamydomonas*-Chloroplasten bzw. ϵ -Tubulin eingetreten ist. Es konnte jedoch dennoch GAPDH unabhängig von der Versuchsmethode in Verbindung mit Tubulin nachgewiesen werden (CHUONG 2004). Die vorliegenden Ergebnisse scheinen daher nicht vollkommen irrelevant zu sein. Sie müssten durch weitere Versuchsreihen verifiziert werden.

5.3.10.3 Identifikation diverser Peroxydasen

In vitro konnte ein Protein aus Reissamen nachgewiesen werden, welches RNA- und Mikrotubuli-Bindeaktivität besitzt (CHUONG *et al.* 2002). Es handelt sich dabei um ein multifunktionelles Protein (MFP), dessen verschiedenen enzymatischen Funktionen im Rahmen der β -Oxidation bekannt sind. Bei einer umfassenden Identifikation Tubulinbindender Proteine in *Arabidopsis* konnten ebenfalls multifunktionelle Proteine aus Peroxisomen identifiziert werden (CHUONG *et al.* 2004). Die in diesem Zusammenhang identifizierten, verschiedenen Peroxidasen könnten eine hohe Relevanz im Rahmen dieser Arbeit besitzen. Im Mating und im Rahmen der sequentiellen Co-Transformation konnten jeweils Peroxidasen aus *Nicotiana tabacum* mit Identitäten von 88-99% bei 167-526 auswertbaren Basenpaaren identifiziert werden. Eine sekretorische Peroxidase (PER), die Peroxidase NtPOX1 und die Ascorbat-Peroxidase. Sie könnten ebenso wie das MFP aus *Oryza sativa* neben ihrer glycosomalen Funktion in Verbindung zum Cytoskelett diverse weitere Funktionen ausüben. Außerdem ist bekannt, dass H_2O_2 Effekte auf die Funktionalität pflanzlicher Proteine hat (HANCOCK 2005). Die Struktur von Proteinen und somit deren Funktion und das Potential, mit anderen Proteinen zu interagieren, scheint die Modifikation der Thiolgruppe an Cystein zu beeinflussen (HANCOCK 2005). Peroxidasen dienen der Regulation dieser H_2O_2 -Funktionen. Die Ascorbat-Oxidase eliminiert in der Thylakoidmembran entstandenes H_2O_2 , kommt aber auch als Membranprotein in den Peroxisomen vor. Zum Zweck der Modifikation könnten sie also auch an γ -Tubulin binden.

Andererseits könnten Mikrotubuli zum Transport dieser Enzyme innerhalb der Zelle dienen. Studien liegen bezüglich der intrazellulären Organellenbewegung, welche Actinfilamente an Stelle von Mikrotubuli als entscheidende Infrastruktur ausweisen, vor. (HAWES & SATIAT-JEUNEMAITRE 2001). Auch ein Wechsel zwischen Actinfilamenten und Mikrotubuli werden belegt (SATO *et al.* 2000). Dieser deutet auf eine Kooperativität der beiden Cytoskelettkomponenten hin. Peroxisomen und peroxisomale Proteine (z.B. Peroxidasen) scheinen in Pflanzenzellen mit Actinfilamenten, nicht wie in tierischen Zellen mit Mikrotubuli assoziiert zu sein (JEDD & CHUA 2002, MATHUR *et al.* 2002), was eine Detektion entsprechender Sequenzen im Zusammenhang mit γ -Tubulin fragwürdig erscheinen lässt. Einen Lösungsansatz könnte ein entwickeltes Modell bieten, welches im folgenden Kapitel vorgestellt wird (MUENCH & PARK 2006).

5.3.10.4 Identifikation des Poly-(A)-Bindeproteins

Die in der Arbeit ermittelten Ergebnisse könnten auch eine Funktion von γ -Tubulin in der Lokalisation von mRNA darstellen. mRNA besitzt innerhalb der Zelle mehrere Funktionen. Zu ihnen gehört der Aufbau von Proteingradienten, der zielgerichtete Transport von Proteinen in Organellen und zur extrazellulären Matrix aber auch die Kontrolle von Genexpression und Translation (OKITA & CHOI 2002, MUENCH & PARK 2006). Die meisten dieser Mechanismen beruhen auf dem aktiven Transport über das Cytoskelett (MUENCH & PARK 2006). Die Identifikation eines Poly-(A)-Bindeproteins konnte als Indiz herangezogen werden. Poly-(A)-Bindeproteine binden an die Poly-(A)-Region der mRNA und stabilisieren diese. Eine Besonderheit der pflanzlichen Proteinbiosynthese besteht in ihrer Lokalisation in den kortikalen Zellregionen (OKITA & CHOI 2002). Hiefür müssen die mRNAs in diese Zellregionen transportiert werden. Mikrotubuli und Actinfilamente haben eine zentrale Rolle hinsichtlich der mRNA-Lokalisation innerhalb der Zelle (LOPEZ de HEREDIA & JANSEN 2003, MUENCH & PARK 2006). Allerdings scheint die aktive Bewegung von mRNA über kurze Strecken entlang des Cytoskelett über Actinfilamente zu erfolgen. Der Transport von Transkripten über längere Distanzen hingegen über Mikrotubuli (MUENCH & PARK 2006).

Die Bedeutung der Actinfilamente in Pflanzen bezieht sich auf die Embryogenese der Braunalge *Fucus*, die Etablierung eines mRNA-Gradienten in *Acetabularia acetabulum* und die Entwicklung von Wurzelhaaren sowie den interzellulären Transport von mRNA (MUENCH & PARK 2006, OKITA & CHOI 2002).

Als Infrastruktur für den Transport von mRNA konnten im Rahmen der Untersuchungen zu Mikrotubuli diverse vermittelnde Enzyme identifiziert werden. Mikrotubuli dienen der Lokalisation von *ash1* mRNA in Tochterzellen von Hefe. Diese beruht auf Myosin-vermittelter Bewegung. Zudem gibt es Indizien für einen Transport von mRNA in Oligodendrocytes und Oocyten über Kinesin und Dynein entlang der Mikrotubuli. Das Staufen-Protein reguliert den mRNA-Transport über Mikrotubuli in *Drosophila*-Oocyten und neuronalen Zellen und das Homolog in Säugetieren hat eine Tubulinbindeaktivität, die eine direkte Verbindung von mRNA und Mikrotubuli nahe legt (MUENCH & PARK 2006). Es bindet an Tubulin über eine Domäne, welche der Mikrotubuli-Bindedomäne des MAP1-Proteins sehr ähnlich ist (TRETAKOVA *et al.* 2005). Zusätzlich konnte in neuronalen Säugetierzellen nachgewiesen werden, dass sogenannte nuklear exportierende Faktoren (nuclear export factors) für mRNA an

MAPs binden (TRETYAKOVA *et al.* 2005). Es konnten auch RNA-bindende Multiproteinkomplexe nachgewiesen werden, welche Mikrotubuli-assoziierte Proteine der Klasse MAP1a enthalten (DEF FRANCO *et al.* 1998). In der botanischen Forschung ist in dieser Richtung recht wenig bekannt. Bei pflanzlichen Homologen dieser wahrscheinlich Cytoskelett-assoziierten und mRNA-bindenden Proteine wurden im Vergleich zu zoologischen Untersuchungsergebnissen bisher wenige identifiziert. Die zuerst in *Drosophila* identifizierten RNA-Bindeproteine *Mago nashi* und *Y14* sind in die Lokalisation von mRNA involviert. Neuere Studien unterstützen eine analoge Funktion ihrer Homologen in *Arabidopsis* (MUENCH & PARK 2006). Ferner bindet das SNC/Tudor-Protein an Mikrotubuli (CHUONG *et al.* 2004). Es konnte gezeigt werden, dass RNA-transportierende Proteine des Tabakmosaikvirus Sequenzähnlichkeiten zu Tubulin zeigen und in Folge dessen mit Mikrotubuli interagieren und RNA entlang dieser transportieren können (BOYKO *et al.* 2000). Es wird diskutiert, dass analoge Mechanismen in den Pflanzen konserviert sind. Allerdings stehen Experimentelle Beweise noch aus.

Inwiefern γ -Tubulin, gegebenenfalls in Verbindung mit weiteren Proteinen, die Interaktion zwischen Mikrotubuli und mRNA vermitteln könnte, ist anhand der vorliegenden Ergebnisse nur schwer zu diskutieren. Sollte es eine Funktion im Transport von mRNA haben, könnte dies mit der Detektion von γ -Tubulin entlang der gesamten Mikrotubulilänge einhergehen (BINAROVÁ *et al.* 2006, MURATA *et al.* 2005). Da bisher jedoch noch wenige Forschungsergebnisse vorhanden sind, ist dies aber noch sehr hypothetisch.

5.3.11 Indizien für eine Kooperation zwischen Actinfilamenten und Mikrotubuli

Es kann bei allen Vorteilen, die das Y2H-System bietet nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich hier um eine indirekte genetische Methode handelt. Zusätzlich wurden die Grenzen des Systems demonstriert (GRÜNENFELDER & WINZELER 2002). Sie beurteilen die Studien von UETZ *et al.* und ITO *et al.* (1983) als zweifelhaft, welche die Abhängigkeit der Resultate von den Reportersystemen, von der stochastisch bedingten systeminhärenten Aktivierung der Reportergene sowie den Selektionsstrategien aufzeigen. Es wird darauf verwiesen, dass 90 % der bereits

bekannten Interaktionen in keinem der beiden Y2H-Screenings identifiziert wurden (GRÜNENFELDER & WINZELER 2002).

Die Sensitivität des Systems könnte z.B. schwache Interaktionen zwischen Proteinen einer Familie detektieren, die *in vivo* nicht interagieren (FIELDS 1993). Dies trifft eventuell auf die Identifikation von GAPDH zu, da hier hohe Identitäten zwischen Domänen von GAPDH und ϵ -Tubulin bestehen. Grundsätzlich besteht auch die Möglichkeit, dass Enzyme unspezifisch an das Köderkonstrukt binden. Es wurden einige Proteine identifiziert, deren Interaktion mit Tubulin aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation ungewöhnlich ist und deren Funktion nicht plausibel erscheinen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zudem äußerst unterschiedliche Proteine als potentielle Interaktionspartner pflanzlichen γ -Tubulins identifiziert werden, welche diverse Interpretationen erlauben. Aber es besteht die Möglichkeit, dass es sich dabei um systembezogene Artefakte handelt. Zu dieser Vermutung gibt die Identifikation des 26 S Proteasoms, von Peroxidasen und der GAPDH als Interaktionspartner von F-Actin Anlass (HOLTGRÄWE *et al.* 2005). Die Gefahr, dass es sich um Artefakte des Systems handelt, scheint andererseits durch andere Ergebnisse relativiert zu werden (CHUONG *et al.* 2004). Sie haben durch Affinitäts-chromatographie mit Tubulin aus *Arabidopsis* einige der von uns identifizierten Proteine bzw. Enzyme als Interaktionspartner Tubulins charakterisiert. Dazu zählen ein Poly-(A)-Bindepotein, GAPDH, peroxisomale Enzyme und Myosin-ähnliche Proteine. Die Identifikation der Proteine als Interaktionspartner von Actinfilamentkomponenten und Mikrotubuli könnte auch für eine intracytoskelettale Interaktion zwischen Actinfilamenten und Mikrotubuli sprechen. Einige Studien scheinen diese These zu stützen (TISDALE 2002, MATHUR 2005).

In diesem Zusammenhang wurde ein Modell zur autoregulierten Transkription der mRNA durch die synthetisierten Proteine entworfen, welches auf der Kooperation von Actinfilamenten und Mikrotubuli basiert (MUENCH & PARK 2006). Die Identifikation des peroxisomalen MFP als Mikrotubuli-bindendes Protein deutet auf eine entscheidende Rolle des Cytoskeletts beim Transport des MFP in Peroxisomen (CHUONG *et al.* 2002). Die Entdeckung fünf weiterer RNA-bindender Proteine mit metabolischen Funktionen verfestigt diese These (CHUONG *et al.* 2004). Das Modell geht davon aus, dass kortikale Mikrotubuli als Ort der Proteinsynthese und Verankerung dienen, bevor sie zum Ort ihrer Aktivität transportiert werden. Das Protein sollte dabei seine eigene mRNA binden, um auf diese Weise selbstregulierend deren Translation zu

kontrollieren. Wenn das synthetisierte Protein mittels mit dem Mikrotubulinetzwerk verbundenen Actinfilamente zum Ort seiner Bestimmung transportiert wird, ermöglicht dies die Translation der gebundenen mRNA.

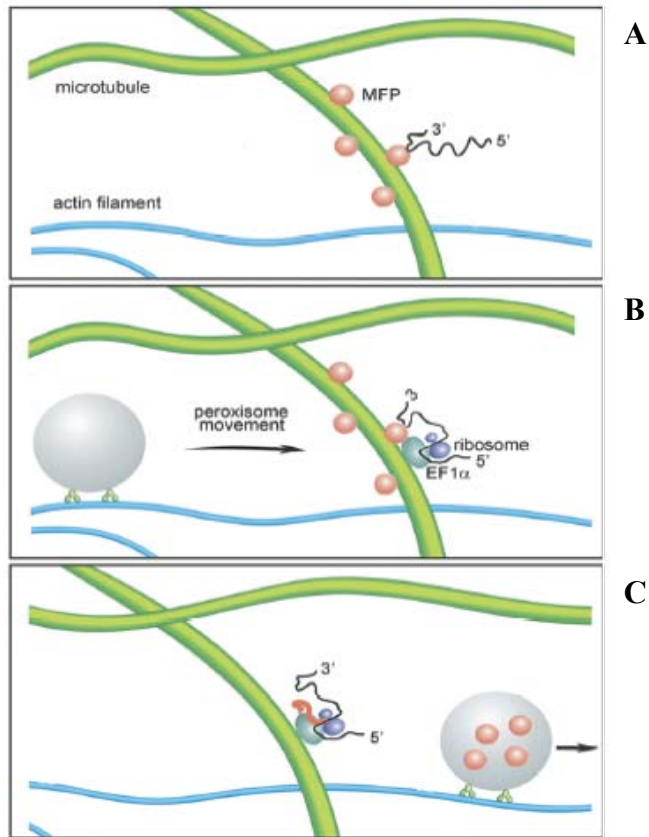


Abb75: Modell einer möglichen Kooperation zwischen Actin-filamenten und Mikrotubuli beim Transport von mRNA und synthetisierten Proteinen. **A:** Das Protein MFP, bindet sowohl an kortikale Mikrotubuli als auch an seine mRNA. **B:** Diese Verbindung führt zu einer autorregulierten Repression der Translation. **C:** Wenn Peroxisomen über Actinfilamente transportiert werden und in Kontakt treten, kann MFP in das Peroxisom importiert werden. Die Repression wird aufgehoben, es kommt zur Translation der Mikrotubuli-gebundenen mRNA durch assoziierte Translationskomplexe, welche die Translationsfaktoren (EF1 α) und Ribosomen enthalten. Die dynamische Natur des Cytoskeletts garantiert eine beständige Neupositionierung der Kreuzungsstellen von Actin und Mikrotubuli.

Erweist sich dieses Modell als möglich und trifft es neben peroxisomalen Enzymen auch auf Proteine anderer Organellen zu, könnte es entscheidende Erkenntnisse hinsichtlich der Lokalisation von mRNA, der Proteinbiosynthese und vor allem der kooperativen Funktion der Cytoskelettkomponenten innerhalb pflanzlicher Zellen

liefern. Hinsichtlich einer solchen Kooperation zwischen Actinfilamenten und Mikrotubuli scheinen die vorliegenden Ergebnisse mit denen von HOLTGRÄWE *et al.* (2005) übereinstimmend zu sein, die mit F-Actin als Köderkonstrukt das 26 S Proteasom, Peroxidasen und GAPDH identifizierten. Mikrotubuli scheinen als Matrix zur Verankerung zahlreicher Proteine zu dienen (CHUONG 2004, WASTENEYS 2004). Die Kontrolle über die Lokalisation von mRNA und Proteinen innerhalb der Zelle muss durch Proteinfaktoren vermittelt werden, die direkt oder indirekt mit dem Cytoskelett assoziiert sind (MUENCH & PARK 2006, OKITA & CHOI 2002). Es wäre möglich, dass zusätzlich ein Enzym zu seiner metabolischen oder anderen Funktion diese Interaktion vermittelt. In wiefern γ -Tubulin die Interaktion zwischen Mikrotubuli und synthetisierten Proteinen bzw. deren mRNA vermitteln könnte, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nur wage eine Aussage getroffen werden. Sollte diese Hypothese verifiziert werden können, würde sie auch mit der Detektion von γ -Tubulin entlang der gesamten Mikrotubulilänge in Einklang gebracht werden (BINAROVÁ *et al.* 2006, MURATA *et al.* 2005). Um Interaktionen von mRNA und Mikrotubuli und ihre Bewegung entlang dieser zu verifizieren, wäre es notwendig sie markieren und dadurch sichtbar machen zu können. Käme es durch eine anschließende Behandlung mit Mikrotubuli-depolymerisierenden Substanzen zum Stillstand der Bewegung, würde dies zumindest auf einen Transport der mRNA entlang der Mikrotubuli schließen lassen. Ein γ -Tubulin-vermittelter Transport von mRNA bislang jedoch nicht experimentell bestätigt ist. Die bisher erzielten Ergebnisse weisen insgesamt auf jeden Fall eine weitaus komplexere Funktionsweise hin, als bisher angenommen.

Trotzdem konnten einige der identifizierten Sequenzen definitiv als falsch Positive bewertet werden. Dies betrifft die Sequenz des 5. Chromosoms des *Medicago truncatula*-Klons mth2-16f8, die dreimal auftrat. Vergleiche auf Proteinebene weisen eine Integrase aus. Die Identitäten belaufen sich jedoch auf maximal 68%.

Zusätzlich konnten cDNA-Sequenzen der humanen Proteine DKFZp68 und DKFZp77 identifiziert werden. Es handelt sich dabei um cDNA, deren RNA im Rahmen eines großen cDNA-Projektes des Deutschen Krebsforschungszentrums aus fötalem, nicht tumorösem Gewebe isoliert wurde (Information von Stefan Wiemann vom DKFZ, 05.12.2006).

5.4 Ausblick

Im Rahmen der Sequenzuntersuchungen des γ -A und γ -B-Peptidbereichs wurde eine Konservierung innerhalb der Streptophytenlinie festgestellt. Interessant ist, dass bei den Jochalgen diese nur im γ -A-Peptidbereich vorliegt. Da dies eventuell verschiedene Interaktionspartner in den beiden Bereichen zur Folge hat, wäre es vielleicht lohnenswert dies näher zu untersuchen. Auch bezüglich möglicher verschiedener Interaktionspartner der einzelnen Motive.

Bei der Suche nach Interaktionspartnern des γ -Tubulins könnte man eine weitere Versuchsreihe durchführen, in der jedoch nur diejenigen ermittelten Proteine berücksichtigt werden sollten, die in beiden Screenings als sicher positiv erachtet ermittelt werden können. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse werfen Zweifel bezüglich der Qualifikation des Y2H-Systems im Rahmen der hier behandelten Thematik auf. Man sollte das System schrittweise optimieren. In der vorliegenden Arbeit wurde dies auf die Konstruktion der Köderhybride beschränkt.

Wahrscheinlich ist eine Identifikation von Proteinen unter Anwendung des Y2H-Systems, welche *in vivo* stattfindet nicht immer garantiert. Diese Methode kann die Reihe potentieller Kandidaten für weitere Studien einschränken. Es müssten jedoch zusätzliche Versuchsreihen durchgeführt werden, um Interaktionen zu manifestieren und Informationen über den Ablauf der Interaktion zu gewinnen. Zur Bekräftigung der Interaktionen sollten daher unter Anwendung verschiedener genetischer, biochemischer oder funktioneller Methoden wie beispielsweise Immunopräzipitation oder Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) durchgeführt werden. Dafür wäre auch eine detaillierte Untersuchung der Struktur beteiligter Proteine notwendig.

6. Zusammenfassung

γ -Tubulin ist innerhalb mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) sehr wahrscheinlich an der Nukleation von Mikrotubuli maßgeblich beteiligt, indem es die Assemblierung der $\alpha\beta$ -Tubulindimere einleitet. Als in Interaktionen mit assoziierenden Proteinen involvierte Domänen des γ -Tubulin, die an der Proteinoberfläche exponiert sind, werden der γ -A und γ -B-Peptidbereich diskutiert. Sie sind bei den grünen Landpflanzen stark konserviert. Bisher bestand eine große phylogenetische Lücke

zwischen dem Lebermoos *Marchantia polymorpha*, welches bereits den hoch konservierten γ -A- und γ -B-Peptidbereich der bislang bekannten γ -Tubulin-Sequenzen grüner Landpflanzen aufweist, und den einzelligen Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella spec.*, die in diesem Bereich erheblich divergieren. Es wurden daher in der bestehenden phylogentischen Lücke weitere Organismen hinsichtlich des γ -A und γ -B Peptidmotivs untersucht. Auswahlkriterien der Organismen waren Ein-/Mehrzelligkeit, (Nicht-)Besitz von Centriolen und (Nicht-)Besitz von Geißeln. Die Manifestierung der Konservierung geht aufgrund der erzielten Ergebnisse allerdings nicht mit einem Verlust der Centriolen, begeißelter Stadien, oder dem Übergang zur Mehrzelligkeit einher. Vielmehr erfolgt sie innerhalb der Streptophytenlinie. Bereits bei einzelligen Algen dieser Linie (*Chlorokybus*, *Mesostigma*) ist diese Konservierung zu beobachten. Interessant bleibt jedoch die Tatsache, dass dieses Motiv bei den Jochalgen, welche ebenfalls den Strptophyten angehören, nur im γ -A-Peptidmotiv auftritt. Es besteht die Möglichkeit, dass die beiden potentiellen Interaktionspartner (γ -A- und γ -B-Peptidmotiv) verschiedene Proteine als Interaktionspartner besitzen.

Einige mitotische und postmitotische Vorgänge pflanzlicher Zellen basieren auf der Funktion von Mikrotubuli. Zur Organisation dieser Multifunktionalität liegen jedoch bislang nur wenige gesicherte Erkenntnisse vor. Eine zentrale Bedeutung wird der Nukleation der Mikrotubuli an MTOCs durch γ -Tubulin zugeschrieben. Es sind erste Hinweise vorhanden, dass zu γ -TuSCs homologe Strukturen in pflanzlichen Zellen vorliegen könnten. Außerdem konnten in höheren Pflanzen die Homologe der γ -TuSC-Komponente Spc98p nachgewiesen werden. Inzwischen konnte auch pflanzliches γ -Tubulin aus *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* und *Vicia faba* in Proteinkomplexen nachgewiesen werden, die Kompetenz zur Verankerung von Mikrotubuli in *Arabidopsis* zeigten (STOPPIN-MELLETT *et al.* 2000, DRYKOVÁ *et al.* 2003). Allerdings ist deren Zusammenlagerung an MTOCs noch nicht richtig verstanden. γ -Tubulin konnte entlang der gesamten Mikrotubuluslänge nachgewiesen werden. Es könnte eventuell neben der Mikrotubulinukleation auch weitere Aufgaben als MAP besitzen.

Mittels eines auf dem GAL4-Protein basierenden Yeast-Two-Hybrid-Systems wurde mit vier unterschiedlichen Konstrukten des γ -Tubulin-A/B-Peptidbereichs als Köderkonstrukt in einer cDNA-Bibliothek als Beutekonstrukt, nach potentiell vorkommenden Interaktionspartnern gescreent. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diverse Sequenzen identifiziert werden. Einige waren bereits mit ähnlichen Funktionen

in Verbindung gebracht worden. Die Interaktion anderer mit γ -Tubulin scheint aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation fragwürdig. Es wurde das Poly(A)-Bindeprotein (PABP), Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase sowie eine S-adenosyl-L-methionine-Synthetase (SAMS) aus *Nicotiana tabacum*, außerdem diverse Proteasom-Untereinheiten wie eine der RPT4a-Untereinheit der 26S Proteasom-AAA-ATPase ähnliche Sequenz aus *Solanum tuberosum*, die 26S Proteasom-Untereinheit alpha 4 aus *Nicotiana benthamiana* und die mutmaßliche 26S Proteasom-Untereinheit alpha 4 aus *Nicotiana tabacum* identifiziert. Des Weiteren konnte eine sekretorische Peroxidase, einer Ascorbat-Peroxidase (APX) und der NtPOX1-Peroxidase verschiedene Peroxidasen aus *Nicotiana tabacum* nachgewiesen werden. Außerdem traten Sequenzen des Chloroplastengenoms, welche für die Untereinheit 9 des PSI codieren und eine mitochondriale DNA aus *Nicotiana tabacum* als vermeintliche Interaktionspartner auf. Weitere Amplifikate der MCS des pGADT₇-Rec-Vektors sind ein Myosin-ähnliches Protein aus *Patinopecten yessoensis* (Scmlp), eine Sequenz auf dem 5. Chromosom des *Medicago truncatula*-Klons mth2-16f8 und diverse humane Sequenzen der Proteine DKFZp68 und DKFZp77. Die Detektion der Proteasom-Untereinheiten stellt zusätzlich eine strukturelle und funktionelle Korrektheit der Köder- und Beuteproteine in Frage. Ursache könnte das Ausbleiben essentieller posttranslationaler Modifikationen in Abwesenheit der dazu erforderlichen Enzyme in Hefezellen sein. In wie weit die S-Adenosyl-L-Methionin-Synthetase, Glycerinaldehyd-3-Phosphosphat-Dehydrogenase oder Peroxidasen solche posttranslationalen Modifikationen pflanzlichen γ -Tubulins bewirken könnten, ist anhand der vorliegenden Y2H-Studie nicht definitiv zu klären. Vieles deutet darauf hin, dass Enzyme wie GAPDH die Interaktion zwischen γ -Tubulin und dessen Interaktionspartnern vermitteln könnten. Einige Studien belegen auch eine Interaktion von GAPDH mit Actinfilamenten (BALABAN & GOLDMAN 1990, HOLTGRÄWE *et al.* 2005, TISDALE 2002). Aufgrund der hohen Homologien zwischen GAPDH und β -Tubulin aus *Chlamydomonas*-Chloroplasten bzw. ϵ -Tubulin könnte ein Grund der Detektion von GAPDH aber auch an der Sensitivität des Y2H-Systems hinsichtlich schwacher Interaktionen zwischen Proteinen einer Familie liegen. Die Assoziation unterschiedlicher Enzyme und Proteindomänen mit Mikrotubuli könnte in Zusammenhang mit ihrem Transport innerhalb der Zelle entlang des Cytoskeletts stehen. Sie könnten ein Reservoir inaktiver Enzyme bilden, die bei Bedarf rekrutiert werden können, wobei Mikrotubuli als zelluläre Infrastruktur dienen. Sie könnten auf

diese Weise aber auch den Transport ihrer Metabolite gewährleisten (AL-HABORI 1995).

Die Identifikation einiger der hier detektierten Proteine mit F-Actin als Köderkonstrukt (HOLTGRÄWE *et al.* 2005) sowie durch Affinitätschromatographie mit Tubulin (CHUONG *et al.* 2002) resultiert auf der Basis des Modells einer autoregulierten Translation (MUENCH & PARK 2006), in Annahmen über eine Kooperation der pflanzlichen Cytoskelettkomponenten im Rahmen der Lokalisation von mRNA und der Proteinbiosynthese.

Auf welche Weise γ -Tubulin die Interaktion zwischen Mikrotubuli und synthetisierten Proteinen bzw. deren mRNA vermitteln könnte, ist anhand der vorliegenden Ergebnisse klar. Es wäre aber möglich, dass γ -Tubulin neben der Mikrotubuli-Nukleation auch andere Funktionen innerhalb der Zelle erfüllt. Wenn dies bestätigt werden könnte, würde das auch mit der Detektion von γ -Tubulin entlang der gesamten Mikrotubulilänge konform gehen (BINAROVÁ *et al.* 2006, MURATA *et al.* 2005). Jedoch lässt die Verteilung eines Proteins innerhalb der Zelle keine sicheren Rückschlüsse auf seine Funktion zu (OAKLEY 2000). In diesem Zusammenhang sind auch Differenzen zwischen aktiven und inaktiven Formen relevant, denen die Sensitivität der meisten Methoden nicht gerecht wird. Da z.B. Antikörper aktives aber auch inaktives γ -Tubulin detektieren, könnten Nachweise seines Vorkommens entlang der Mikrotubuli auch im Zusammenhang mit dem Transport von γ -Tubulin oder γ -Tubulin-enthaltenden Komplexen zum Einsatzort stehen (SCHMIT 2002). Pflanzliches γ -Tubulin könnte aber auch vielfältige Funktionen haben. Es ist sowohl alleine als auch in Verbindung zu verschiedenen löslichen Komplexen im Cytosol nachgewiesen worden (STOPPIN-MELLET *et al.* 2000). Es wäre möglich, die unterschiedlich fungierenden γ -Tubuline aufgrund verschiedener posttranslationaler Modifikationen durch eine Vielzahl interagierender Proteine zustande kommen. Die Kombination der bisher erzielten Ergebnisse weist auf eine weitaus komplexere Funktionsweise der unterschiedlichen Komponenten des pflanzlichen Cytoskeletts und des γ -Tubulins hin, als bisher angenommen. Hypothesen über Interaktionen der Cytoskelettkomponenten können jedoch nicht allein durch die Anwendung des Y2H-Systems aufgeklärt werden. In Zukunft müsste dies eventuell mittels anderer genetischer, biochemischer oder funktioneller Methoden untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

Abe, Y.; Ohsugi, M.; Haraguchi, K.; Fujimoto, J.; Yamamoto, T. 2006

LATS2–Ajuba complex regulates c-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis

FEBS Letters **580**: 782–788

Aho, S.; Arffman, A.; Pummi, T.; Uitto, J. 1997

A novel reporter gene MEL1 for the yeast two-hybrid system

Analytical Biochemistry **253**: 270-273

Alberts, B.; Johnson A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter P. 2004

Molekularbiologie der Zelle (4. Auflage)

Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Al-Habori, M. (1995)

Microcompartmentation, Metabolic Channelling and Carbohydrate Metabolism

Int. J. Biochem. Cell Biol. **27/ 2**: 123-132.

Andrade, J.; Pearce, S.T.; Zhao, H.; Barroso, M. (2004)

Interactions among p22, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and microtubules

Biochemical Journal **384**: 327-336.

Baskin, T. I. 2002

The Cytoskeleton (Chapter 5)

In: Biochemistry & Molecular-Biology of Plants

Balaban, N.; Goldman, R. (1990)

The Association of Glycosomal Enzymes and Microtubules: A Physiological Phenomenon or an Experimental Artifact?

Experimental Cell Research **191**: 219-226.

Baskin, T. I. (2002)

The Cytoskeleton (Chapter 5)

In: Buchanan, P. B.; Gruessen, W.; Jones, R.L.: Biochemistry & Molecular-Biology of Plants

American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland

Bendixen, C.; Gangloff, S.; Rothstein, R. (1994)

A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions
Nucleic Acids Research **22/9**: 1778-1779.

Bendixen, C.; Gangloff, S.; Rothstein, R. (1994)

A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions
Nucleic Acids Research **22/9**: 1778-1779.

Bhattachary, D.; Weber, K.; An, S.S.; Berning-Koch, W. (1998)

Actin Phylogeny Identifies Mesostigma viride as a Flagellate Ancestor of the Land Plants
Journal of Molekular Evolution **47**: 544-550.

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

Association of γ -tubulin with kinetochore/centromeric region of plant
chromosomes
The Plant Journal **14**: 751-757.

Binarová, P.; Cenklová, V.; Procházková, J.; Doskočilová, A.; Volc, J.; Vrlík, M.; Bögre, L. (2006)

γ -Tubulin Is Essential for Acentrosomal Microtubule Nucleation and Coordination of Late Mitotic Events
in *Arabidopsis*
Plant Cell **18**: 1199-1212

Birnboim, H. C.; Doly, J. 1979

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucleic Acid Research **7**: 1513-1523t Cell **18**: 1199-1212.

Boyko, V.; Ferralli, J.; Ashby, J.; Schellenbaum, P.; Heinlein, M. (2000)

Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA
Nature and Cell Biology **2**: 826–832.

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

American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland
BD Matchmaker™ Library Construction and Screening Kits User Manual 2003
PT3529-1 (PR32047), CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, Ca, USA

Burns, R. G. (1995)

Analysis of the γ -tubulin sequences: implications for the functional properties of γ -tubulin
Journal of Cell Science **108**: 2123-2130.

Byers, B.; Shriver, K.; Goetsch, L. (1978)

The Role of Spindle Pole Bodies And Modified Microtubule Ends in the Initiation of Microtubule Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae*
Journal of Cell Science **30**: 331-352.

Campbell, N.A.; Reece, J.B. (2003)

Biologie (6. Auflage)
Deutsche Übersetzung herausgegeben von Jürgen Markl
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin

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

Higher Plant Cells: Gamma-tubulin and microtubule nucleation in the absence of centrosomes.
Microscopy Research and Technique **49**: 487-495.

Cerff, R.; Hundrieser, J.; Friedrich, R. (1986)

Subunit B of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is related to β -tubulin
Mol Gen Genet. **204**: 44-51

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

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

Chien, C-T.; Bartel, P. L.; Sternglanz, R.; Fields, S. (1991)

The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 9578-9582.

Chuong, S.D.X.; Mullen, R.T.; Muench, D.G. (2002)

Identification of a Rice RNA- and Microtubule-binding Protein as the Multifunctional Protein, a Peroxisomal Enzyme Involved in the β -Oxidation of Fatty Acids
The Journal of Biological Chemistry **277(4)**: 2419–2429.

Chuong, S.D.X.; Goods, A.; Taylor, G.J.; Freeman, M.C.; Moorhead, G.B.G.; Muench, D.G. (2004)

Large-scale Identification of Tubulin-binding Proteins Provides Insight on Subcellular Trafficking, Metabolic Channeling, and Signaling in Plant Cells
Molecular & Cellular Proteomics **3**: 970-983.

van Criekinge W.; Beyaert, R. (1999)

Yeast Two-Hybrid: State of the Art
Biological Procedures Online **2(1)**: 1-38.

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

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

Desai, A.; Mitchison, T.J. (1997)

Microtubule polymerization dynamics
Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 13: 83-117.

Drykova, D.; Cenklová, V.; Sulimenko, V.; Volc, J.; Dráber, P.; Binarová, P. (2003)

Plant gamma tubulin interacts with $\alpha\beta$ -Tubulin Dimers and Forms Membrane-Associated Complexes
Plant Cell 15: 465-480.

Durfee, T.; Becherer, K.; Chen, P.-L.; Yeh, S.-H.; Yang, Y.; Kilburn, A. E.; Lee, W. H.; Elledge, S. J. (1993)

The retinoblastoma protein associates with the phosphatase type 1 catalytic subunit
Genes Dev. 7: 555-569

Durrieu, C. ; Bernier-Valentin, F. ; Rousset, B. (1987)

Binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to microtubules
Molecular and Cellular Biochemistry 74: 55-65

Eckardt, N. (2006)

Function of γ -Tubulin in Plants
The Plant Cell 18: 1327-1329.

Endoh, H; Vincent, S.; Jacob, Y.; Réal, E.; Walhout, A.J.M. ; Vidal, M. (2002)

Integrated Version of Reverse Two-Hybrid System for the Postproteomic Era. In: Guthrie, C.; Fink, G.R..
Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology Part B
Methods in Enzymology 350: 525-545.

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

The plant Spc98p homologue colocalizes with γ -tubulin at microtubule nucleation sites and is required for microtubule nucleation
Journal of Cell Sciences 115: 2423-2431.

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

Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to α/β and γ -tubulin.
J. Cell Biol. 135: 5-8.

Erickson, H. P. (2000)

γ -tubulin nucleation: template or protofilament?
Nature Cell Biology **2**: E93-E96.

Evangelista, C.; Lockshon, D.; Fields, S. (1996)

The yeast two-hybrid system: prospects for protein linkage maps
Trends in Cell Biology **6**: 196-199.

Fang, Y.; Macool, D.J.; Xue, Z.; Heppard, E.P.; Hainey, C.F.; Tingey, S.V.; Miao, G.-H. (2002)

Development of a high-throughput yeast two-hybrid screening system to study protein-protein interactions in plants
Molecular Genetics and Genomics **267**: 142-153.

Fields, S. & Song, O. (1989)

A novel genetic system to detect protein-protein interactions
Nature **340**: 245-246.

Fields, S. (1993)

The Two-Hybrid System to Detect Protein-Protein Interactions
Methods in Enzymology **5**: 116-124.

Finley, R.L. jr.; Brent, R. (1994)

Interaction mating reveals binary and ternary connections between Drosophila cell cycle regulators
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 12980-12984.

Fröhlich, M. S. (2005)

Funktionen molekularer Chaperone in der Qualitätskontrolle zytosolischer Proteine
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Fromont-Racine, M.; Rain, J.-C. ; Legrain, P. (2002)

Building Protein-Protein Networks by Two-Hybrid Mating Strategy. In: Guthrie, C.; Fink, G.R.. Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology Part B
Methods in Enzymology **350**: 513-524.

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

Isolation, characterization and sequence of a cDNA encoding gamma-tubulin protein from the fern *Anemia phyllitidis* L. Sw.
Plant Mol. Biol **23**: 595-603.

Gardiner, J.; Marc, J. (2002)

Putative microtubule-associated proteins from the *Arabidopsis* genome
Protoplasma **222**: 61-74.

Geissler, S.; Pereira, G.; Spang, A.; Knop, M.; Soues, S.; Kilmartin, J.; Schiebel, E. (1996)

The spindle pole body component Spc98 interacts with the gamma-tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* at the sites of microtubule attachment.
The EMBO Journal **15**: 3899-3911.

Geissler, S.; Siegers, K.; Schiebel, E. (1998)

A novel protein complex promoting formation of functional α - and γ -tubulin
EMBO Journal **17** : 952-966.

Gera, J.F.; Hazbun, T.R.; Fields, S. (2002)

Array-Based Methods for Identifying Protein-Protein and Protein-Nucleic Acid Interactions.
In: Guthrie, C.; Fink, G.R.. Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology Part B
Methods in Enzymology **350**: 499-512.

Gietz, D.; St. Jean, A.; Woods, R.A.; Schiestl, R. H. (1992)

Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells.
Nucleic Acids Res. **20**: 1425.

Gietz, D.; Woods, R.A. (2002)

Transformation of Yeast by Lithium Acetat/Single-Stranded Carrier DNA/ Polyethylene Glycol Method.
In: Guthrie, C.; Fink, G.R.. Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology Part B
Methods in Enzymology **350**: 87-96.

Graham, L.E.; Cook, M.E.; Busse, J.S. (2000)

The origin of plants: Body plan changes contributing to a major evolutionary radiation
PNAS **97**: 4535-4540.

Grünenfelder, B.; Winzeler, E.A. (2002)

Treasures and Traps in Genome-wide Data Sets: Case Examples from Yeast
Natural Review Genetics **3**: 653-661.

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

γ -Tubulin complexes and their role in microtubule nucleation.
Curr. Top Dev Biol **49**: 55-73.

Gunawardane, R.N.; Martin, O.C.; Zheng, Y. (2003)

Characterization of a New γ TuRC subunit with WD Repeats

Mol. Biol. Cell **14**: 1017-1026.

Guo, D.; Hazbun, T.R.; Xu, X.J.; Ng, S.L.; Fields, S.; Kuo, M.H. (2004)

A tethered catalysis, two-hybrid system to identify protein-protein interactions requiring post-translational modifications

Nature Biotechnology **22**: 888-892.

Haber, J. E. (2002)

Uses and Abuses of HO Endonuclease

In: Guthrie, C.; Fink, G.R.. Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology Part B

Methods in Enzymology **350**: 141-164.

Hancock, J.T.; Henson, D.; Nyirenda, M. ; Desikan, R.; Harrison, J.; Lewis, M.; Hughes, J.; Neill, S. J. (2005)

Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis

Plant Physiology and Biochemistry **43**: 828–835.

Hawes, C.R. ; Satiat-Jeunemaitre, B. (2001)

Trekking along the cytoskeleton.

Plant Physiol **125**: 119–122.

Heald, R.; Tournebize, R.; Blank, T.; Sandaltzopoulos, R.; Becker, P.; Hyman, A.; Karsenti, E. (1996)

Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts

Nature **382**: 420-425.

Heldt, H.W. (2003)

Pflanzenbiochemie, 3. Auflage

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Hill, J.; Donald, K. A.; Griffiths, D. E. (1991)

DMSO-enhanced whole cell yeast transformation.

Nucleic Acids Research **19**: 5791.

Holtgräwe, D.; Scholz, A.; Altmann, B.; Scheibe, R. (2005)

Cytoskeleton-associated, carbohydrate-metabolizing enzymes in maize identified by yeast two-hybrid screening

Physiologia Plantarum **125**: 141-156.

Hong, Z.; Geisler-Lee C. J.; Zhang Z.; Verma, D. P. S. (2003)

Phragmoplastin dynamics: multiple forms, microtubule association and their roles in cell plate formation in plants

Plant Molecular Biology **53**: 297-312.

Horio, T.; Uzawa, S.; Jung, M. K.; Oakley, B. R.; Tanaka, K; Yanagida, M. (1991)

The fission yeast γ -tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers

Journal of Cell Science **99**: 693-700.

Horio, T.; Oakley, B.R. (2003)

Expression of Arabidopsis gamma tubulin in fission yeast reveals conserved and novel functions of gamma-tubulin.

Plant Physiol. **133**: 1926–1934.

Huitorel, P. ; Pantaloni, D. (1985)

Bundling of microtubules by glyceraldehyde 3-phosphat dehydrogenase and its modulation by ATP

European Journal of Biochemistry **150**: 265-269.

Inclán, Y. F.; Nogales, E. (2001)

Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of γ -, δ - and ϵ -tubulin

Journal of Cell Science **114**: 413-422.

Ito, H.; Fukuda, Y.; Murata, K.; Kimura, A. (1983)

Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations.

Journal of Bacteriology **153**: 163-168.

James, P; Halladay, J.; Craig; E. A. (1996)

Genomic libraries and host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast

Genetics **144**: 1425-1436.

Jedd, G. & Chua, N-H. (2002)

Visualization of Peroxisomes in Living Plant Cells Reveals Acto-Myosin-Dependent Cytoplasmic Streaming and Peroxisome Budding

Plant Cell Physiology **43(4)**: 384-392.

Job, D.; Valiron, O.; Oakley, B. (2003)

Microtubule nucleation

Current Opinion in Cell Biology **15**: 111-117.

Joshi, H. C.; Palacios, M. J.; McNamara, L.; Cleveland, D. W. (1992)

γ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation
Nature **356**: 80-83.

Joshi, H. C.; Palevitz, B. A. (1996)

γ -Tubulin and microtubule organization in plants
Trends in Cell Biology **6**: 41-44.

Karol, K.G.; McCourt, R.M.; Cimino, M.T.; Delwiche, C.F. (2001)

The Closest Living Relatives of Land Plants
Science **294**: 2351-2353

Keating, T.J.; Borisy, G.G. (2000)

Immunostructural evidence for the template mechanism of microtubule nucleation
Nature Cell Biology **2**: 352-357.

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

The centrosome and cellular organization.
Annu. Rev. Biochem. **63**: 639-674.

Kim, Y.K.; Cha, Y.K.; Jun, H.Y.; Kim, J.D.; Choi, J.S.; Kim, H.R.; Han, L.S. (1999)

Nucleotide sequence of a cDNA (OstubG2) (accession no. AF036957) encoding a gamma-tubulin in the rice plant (*Oryza sativa*)
Plant Gene Register PGR 99-186
Plant Physiology **121**: 1384.

Klanner, C. (2001)

Qualitätskontrolle von Proteinen in Mitochondrien: Identifizierung und Charakterisierung neuer AAA-Proteasen und Chaperone
Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Knop, M.; Schiebel, E. (1997)

Spc98p and Spc97p of the yeast γ -tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p
The EMBO Journal **16**: 6985-6995.

Knop, M.; Schiebel, E. (1998)

Receptors determine the cellular localization of a γ -tubulin complex and thereby the site of microtubule formation
The EMBO Journal **17**: 3952-3967.

Lange, B.M.H. (2002)

Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways

Current Opinion in Cell Biology **14**: 35-43

Ledbetter, M.C.; Porter, K.R. (1963)

A "Microtubule" in Plant Cell Fine Structure

J. Cell Biol. **19**: 239-250.

Leguy, R.; Melki, R.; Pantaloni, D.; Carlier, M-F. (2000)

Monomeric γ -Tubulin Nucleates Microtubules

Journal of Biological Chemistry **275/29**: 21975-21980.

Li, B.; Fields, S. (1993)

Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV 40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system

The FASEB Journal **7**: 957-963.

Li, Q. & Joshi, H.C. (1995)

γ -Tubulin is a minus end-specific microtubule binding protein

Journal of Cell Biology **131**: 207-214.

Ling M.; Merantel F.; Robinson, B.H. (1995)

A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction

Nucleic Acids Research **23**: 4924-4925.

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

A tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner

Journal of Cell Science **104**: 1217-1228.

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

Experimental manipulation of gamma-tubulin distribution in Arabidopsis using anti-microtubule drugs

Cell Motility and the Cytoskeleton **31**: 113-129.

Liu, J. O. (1998)

Everything you need to know about the yeast two-hybrid system

Nature Structural Biology **5**: 535-536.

Lloyd, C.; Chan, J. (2004)

Microtubules and the Shape of Plants to come
Nature Reviews **5**: 13-22.

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

Molekulare Zellbiologie
Spektrum Akademischer Verlag

Lopez, I.; Khan, S.; Sevik, M.; Zacheus Cande, W.; Hussey, P.J. (1995)

Isolation of a full-length cDNA encoding *Zea mays* γ -tubulin
Plant Physiology **107**: 309-310.

Lottspeich, F.; Engels, J.W. (2006)

Bioanalytik, (2. Auflage)
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

Luduena, R.F. (1998)

Multiple Forms of Tubulin: Different Gene Products and Covalent Modifications
International Review of Cytology **178**: 207-275

Lüders, J.; Patel U. K.; Stearns, T. (2006)

GCP-WD is a γ -tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation
Nature Cell Biology **8**: 137-147.

Lüttge, U.; Schnepf, E.; Läubli, D.; Nagata, T. (1994)

Botanica Avta **107** (3)
Georg Thieme Verlag - Stuttgart

Ma, H.; Kunes, S.; Schatz, P. J.; Botstein, D. (1987)

Plasmid construction by homologous recombination in yeast
Gene **58**: 201-216.

MacDonald, R.J.; Swift, G.H.; Przybyla, E.; Chirgwin, J.M. (1987)

Isolation of RNA Using Guanidinium Salts
Methods in Enzymology **152**: 219-227

Madigan, M.T.; Martinko, J.M. (2006)

Brock Mikrobiologie (11. Auflage)
Deutsche Übersetzung von Lazar, T. und Thomm-Reitz, F.
Pearson Studium München

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

Microtubule structure

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

Marc, J. (1997)

Microtubule-organizing centres in plants

Trends in Plant Science 2: 223-230.

Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual (1999)

PT3247-1 (PR94575), CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, Ca, USA

Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits User Manual (2006)

PT3529-1 (PR631434), CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, Ca, USA

Mathur, J.; Mathur, N.; Hülskamp, M. (2002)

Simultaneous Visualization of Peroxisomes and Cytoskeletal Elements Reveals Actin and Not Microtubule-Based Peroxisome Motility in Plants

Plant Physiology 128: 1031–1045.

Mathur, J. (2005)

Conservation of boundary extension mechanisms between plants and animals

Journal of Cell Biology 168: 679-682.

Menzel, D. (1993)

Chasing coiled coiles: Intermediate filaments in plants

Btanika Acta 106: 294-300

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

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

Nature 378: 638-640.

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

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

Nature Cell Biology 2: 365-370.

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

γ -Tubulin complexes and microtubule nucleation

Current Opinion in Structural Biology 11: 174-181.

Mühlhardt, C. (2003)

Molekularbiologie/Genomics (4.Auflage)

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

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

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

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

Tobacco BY-2 Cell Line as the "HeLa" Cell in the Cell Biology of Higher Plants
Int. Rev. Cyt. 132: 1-30.

Nultsch, W. (2001)

Allgemeine Botanik (11. Auflage)
Thieme-Verlag, Stuttgart

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

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

Oakley, B. R.; Oakley, C.E.; Yoon, Y.; Jung, M.K. (1990)

γ -tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*
Cell 61: 1289-1301.

Oakley, B. (2000)

γ -Tubulin
Current Topics in Developmental Biology 49: 27-53.

Oegema, K.; Wiese, C.; Martin, O. C.; Milligan, R. A.; Iwamatsu, A.; Mitchison, T. J.; Zheng, Y. (1999)

Characterisation of two related *Drosophila* γ -tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules
Journal of Cell Biology 144: 721-733.

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

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

Okita, T.W.; Choi, S.-B. (2002)

mRNA localization in plants: targeting to the cell's cortical region and beyond
Current Opinion in Plant Biology 5: 553-559.

Oldenburg K.R.; Vo, K.T.; Michaelis, S.; Paddon, C. (1997)

Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast
Nucleic Acids Research **25/ 2**: 451–452.

Orr-Weaver, T.L.; Szostak, J.W.; Rothstein, R.J. (1981)

Yeast transformation: A model system for the study of recombination
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78/10**: 6354-6358.

O'Toole, E.T.; Winey, M.; McIntosh, J.R. (1999)

High-Voltage Electron Tomography of Spindle Pole Bodies and Early Mitotic Spindles in the Yeast
Saccharomyces Cerevisiae
Molecular Biology of the Cell **10**: 2017-2031.

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

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

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

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

Panteris, E.; Apostolakis, P.; Gräf, R.; Galatis, B. (1999)

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

**Pastuglia, M.; Azimzadeh, J.; Goussot, M.; Camilleri, C.; Belcram, K.; Evrard, J.-L.; Schmit, A.-C.;
Guerche, P.; Boucheza, D. (2006)**

γ -Tubulin Is Essential for Microtubule Organization and Development in Arabidopsis
The Plant Cell **18**: 1412–1425.

Petracek, M.E.; Longtine, M.S. (2002)

PCR-Based Engineering of Yeast Genome. In: Guthrie, C.; Fink, G.R.. *Guide to Yeast Genetics and
Molecular and Cell Biology Part B*
Methods in Enzymology **350**: 445-468.

Pickett-Heaps, J. D. (1969)

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

- Pickett-Heaps, J.D.; Gunning, B.E.S.; Brown, R.C.; Lemmon, B.E.; Cleary, A.L. (1999)**
The Cytoplasm Concept in Dividing Plant Cells: Cytoplasmic Domains and the Evolution of Spatially Organized Cell Division
American Journal of Botany **86**: 153-172
- Preble, A.M.; Giddings Jr., T.M.; Dutcher, S.K. (2000)**
Basal Bodies and Centrioles: Their Function and Structure
Current Topics in Developmental Biology **49**: 207-233
- Pryer, K.M.; Schneider, H.; Smith, A.R.; Cranfill, R.; Wolf, P.G.; Hunt, J.S.; Sipes, S.D. (2001)**
Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants
Nature **409**: 618-622
- Raff, J.W. (1996)**
Centrosomes and microtubules: wedded with a ring
Trends in Cell Biology **6**: 248-251.
- Renzaglia, K.S.; Duff, R.J.; Nickrent, D.L.; Garbary, D.J. (2000)**
Vegetativ and reproductiv innovations od early land plants: implications for a unified phylogeny
Phil. Trans. R. Soc. Cond. B **355**: 769-793
- Richter, G. (1998)**
Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels, 6. Auflage
Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Rupp, S. (2002)**
LacZ Assays in Yeast. In: Guthrie, C.; Fink, G.R. Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology Part B
Methods in Enzymology **350**: 112-130.
- Sato, Y.; Wada, M.; Kadota, A. (2000)**
Choice of tracks, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo movement is differentially controlled by phytochrome and a blue light receptor.
Journal of Cell Science **114**: 269–279
- Schmit, A-C. (2002)**
Acentrosomal Microtubule Nucleation in Higher Plants
International Review of Cytology **220**: 257-289.

Schnackenberg, B.J.; Khodjakov, A.; Rieder, C.L.; Palazzo, R.E. (1998)

The disassembly and reassembly of functional centrosomes *in vitro*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 9295–9300.

Schröder, G.; Eichel, J.; Breinig, S. ; Schröder, J. (1997)

Three differentially expressed S-adenosylmethionine synthetases from *Catharantus roseus*: Molecular and functional characterization.
Plant Mol. Biol. **33**: 211-222.

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

γ -Tubulin in Barley and Tabaco: Sequence Relationship an RNA Expression Patterns in Developing Leaves during Mitosis and Post-Mitotic Growth
Plant Cell Physiology **43**: 224-229

Seyffert, W. (2003)

Lehrbuch der Genetik, 2. Auflage
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Shaw, S.L.; Kamyar, R.; Ehrhardt, D.W. (2003)

Sustained Microtubule Treadmilling in *Arabidopsis* Cortical Arrays
Science **300**: 1715-1718.

Sherman, F. (2002)

Getting started with Yeast. In: Guthrie, C.; Fink, G.R., Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology Part B
Methods in Enzymology **350**: 3-41.

Somers, M.; Engelborghs, Y.; Baert, J. (1990)

Analysis of the binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to microtubules, the mechanism of bundle formation and the linkage effect
European Journal of Biochemistry **193**: 437

Stoppin, V., Vantard, M., Schmit, A.C., and Lambert, A.M. (1994)

Isolated plant nuclei nucleate microtubule assembly: The nuclear surface in higher plants has centrosome-like activity.
Plant Cell **6**: 1099–1106.

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

Distribution of γ -tubulin in higher plant cells: cytosolic-tubulin is part of high molecular weight complexes
Plant biology **2**: 290-296.

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

Identification of an α -tubulin mutant of fission yeast from γ -tubulin-interacting protein screening: genetic evidence for α - γ -tubulin interaction

Journal of Cell Science **113**: 4557-4562.

Takeuchi, J.; Tamura, T. (2004)

Recombinant ATPases of the yeast 26S proteasome activate protein degradation by the 20S proteasome

FEBS Letters **565**: 39-42.

Tisdale, E.J. (2002)

Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Is Phosphorylated by Protein Kinase C α / λ and Plays a Role in Microtubule Dynamics in the Early Secretory Pathway

Journal of Biological Chemistry **277/5**: 3334-3341.

Tretyakova, I.; Zolotukhin, A.S.; Tan, W.; Bear, J.; Propst, F.; Ruthel, G.; Felber, B.K. (2005)

Nuclear Export Factor Family Protein Participates in Cytoplasmic mRNA Trafficking

Journal of Biological Chemistry **280**: 31981-31990.

Vardy, L.; Toda, T. (2000)

The fission yeast γ -tubulin complex is required in G1 phase and is a component of the spindle assembly checkpoint

The EMBO Journal **19**: 6098-6111.

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

Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants

International Review of Cytology **181**: 75-149

.

Vogel, J. & Snyder, M. (2000)

The carboxy terminus of Tub4p is required for γ -tubulin function in budding yeast

Journal of Cell Science **113**: 3871-3882.

Vogel, J.; Drapkin, B.; Oomen, J.; Beach, D.; Bloom, K.; Snyder, M. (2001)

Phosphorylation of γ -Tubulin Regulates Microtubule Organization in Budding Yeast

Developmental Cell **1**: 621-631.

Walsh, J. L.; Keith, T.J.; Knull, H.R. (1989)

Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules

Biochim. Biophys. Acta **999**: 64-70.

Wasteney, G.O (2002)

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

Wasteney, G.O.; Yang, Z. (2004)

New Views on the Plant Cytoskeleton
Plant Physiology **136**: 3884-3891.

Whittington, A.T.; Vugrek, O.; Wei, K.J.; Hasenbein, N.H.; Sugimoto, K.K.; Rashbrooke M.C.; Wasteney, G. (2001)

MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants.
Nature **411**: 610-613.

Wiese C.; Zheng, Y. (2000)

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

Ye, Q.; Worman, H.J. (1995)

Protein-Protein Interactions between Human Nuclear Lamins Expressed in Yeast
Experimental Cell Research **219**: 292-298.

Zhang, L.; Keating, T.; Wilde, A.; Borisy, G.; Zheng, Y. (2000)

The role of Xgrip210 in γ -tubulin ring complex assembly and centrosome recruitment
Journal of Cell Biology **151**: 1525-1535.

Zheng, Y.; Wong, M. L.; Alberts, B.; Mitchison, T. (1995)

Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex
Nature **378**: 578-583.

Zhu, Y.Y.; Machleder, E.M.; Chenchik, A.; Li, R.; Siebert, P.D. (2001)

Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction
Biotechniques **30 (4)**: 892-897.

7 Anhang

7.1 Transformationseffizienzen der ersten Transformationen

Transfor- mierter Stamm	Bezugsvektor und eingesetzte Menge	Selektiv- medium	Anzahl der gewach- senen Kolonien pro Platte	Auspl. Vol. (μ l)	Verd.- faktor	Transformations- effizienz Koloniebildende Einheiten/ μ g Plasmid-DNA	Mittelwert
Aktivierungsdomänenvektor							
AH 109	pGADT ₇ -Rec (0,1 μ g)	SD-Leu	10	30	0,04	4,17 x 10 ⁴	6,96 x 10 ⁴
			28			1,17 x 10 ⁵	
			12			5 x 10 ⁴	
Bindedomänenvektoren							
AH 109	pGBKT ₇ -/ AB (0,1 μ g)	SD-Trp	932	100	1	46 600	2,994 x 10 ⁴
			700	150		23 333	
			796	200		19 900	
AH 109	pGBKT ₇ -/ AB+ (0,1 μ g)	SD-Trp	1104	100	1	55 200	4,243 x 10 ⁴
			1164	150		38 800	
			1332	200		33 300	
AH 109	pGBKT ₇ -/ AB _C -Term. (0,1 μ g)	SD-Trp	246	100	1	12 300	1,2 x 10 ⁴
			372	150		12 400	
			512	200		12 800	
AH 109	pGBKT ₇ -/ γ -Tub (0,1 μ g)		124	150	1	13 900	1,32 x 10 ⁴
			140	150		14 100	
			107	150		11 600	
Y 187	pGBKT ₇ -/ AB (0,1 μ g)	SD-Trp	2504	100	1	125 200	9,46 x 10 ⁴
			3040	150		101 333	
			2288	200		57 200	
Y 187	pGBKT ₇ -/ AB+ (0,1 μ g)	SD-Trp	4032	100	1	201 600	1,311 x 10 ⁵
			4192	150		139 733	
			2080	200		52 000	
Y 187	pGBKT ₇ -/ AB _C -Term. (0,1 μ g)	SD-Trp	4800	100	1	240 000	1,385 x 10 ⁵
			2912	150		97 066	
			3136	200		78 400	
Kontrollvektoren							
AH 109	pGBKT ₇ -Lam (0,1 μ g)	SD-Trp	18	100	1	900	1,175 x 10 ³
			29			1 450	
AH 109	pGBKT ₇ -53 (0,1 μ g)	SD-Trp	9	100	1	450	5,5 x 10 ²
			13			650	
Y 187	pGBKT ₇ -Lam (0,1 μ g)	SD-Trp	22	30	0,04	9,17 x 10 ⁴	7,5 x 10 ⁴
			14			5,83 x 10 ⁴	
Y 187	pGBKT ₇ -53 (0,1 μ g)	SD-Trp	9	30	0,04	3,75 x 10 ⁴	3,96 x 10 ⁴
			10			4,17 x 10 ⁴	
AH 109	pGADT ₇ -T (0,1 μ g)	SD-Leu	1	30	0,04	4,17 x 10 ³	8,69 x 10 ³
			3			1,25 x 10 ⁴	
			188	100		1	
Referenzvektor							
AH 109	pCL1 (0,1 μ g)	SD-Leu/ X- α -Gal	369	150	1	12 300	1,118 x 10 ⁴
			201	100		10 050	
Y 187	pCL1 (0,1 μ g)	SD-Leu/ X- α -Gal	109	150	1	3 633	3,316 x 10 ³
			60	100		3 000	

7.2 Transformationseffizienzen der zweiten Transformationen und Anzahl gescreenter Klone

Alle Ansätze wurden um den Faktor 25 verdünnt und zu 150 µl ausplattiert. Es wurden 0,1 µg Vektor-DNA eingesetzt.

Ansatz	KbE auf SD-Leu	Mittelwert	Transformations-effizienz bzgl. pGADT ₇ -Rec [KbE/ µg Plasmid-DNA]	KbE auf SD-Trp/-Leu	Mittelwert	Anzahl gescreenter Klone
AH 109/pGBKT ₇ /AB/Rec/cDNA	280	280	2,33 x 10 ⁵	153	165	1,38 x 10 ⁴
	280			177		
AH 109/pGBKT ₇ /AB+/Rec/cDNA	177	169	1,41 x 10 ⁵	90	94,5	7,88 x 10 ³
	161			99		
AH 109/pGBKT ₇ /AB C-Term./Rec/cDNA	112	121	1,01 x 10 ⁵	94	74	6,17 x 10 ³
	130			54		
AH 109/pGBKT ₇ /γ-Tub/Rec/cDNA	134	128		67	64	
	122			61		
AH 109/pGBKT ₇ -53/pGADT ₇ -T (PK)	42	46	3,83 x 10 ⁴	13	12	1 x 10 ³
	50			11		
AH 109/pGBKT ₇ -Lam/pGADT ₇ -T (NK)	20	25	2,08 x 10 ⁴	1	2	1,67 x 10 ²
	30			3		

7.3 Übersicht über die Ergebnisse des Matings und die Matingeffizienzen

Bezugsstamm SD-Medium	Verdünnungsfaktor	Auspl. Vol. [µl]	KbE/Platte	Wachstums-Fähigkeit [KbE/ml]	Mittelwert [KbE/ml]
AH 109 SD-Leu	1	10	33 820	3 382 000	1 675 685
			30 075	3 007 500	
	10		15 889	158 890	
	15 435		154 350		
Y 187 SD-Trp	1	10	13 392	1 339 200	603 767,5
			10 214	1 021 400	
	10		2 837	28 370	
	2 610		26 100		
Diploide SD-Trp/-Leu	1	10	12 257	1 225 700	568 017,5
			10 214	1 021 400	
	10		1 135	11 350	
	1 362		13 620		
Matingeffizienz					94,08 %
Anzahl gescreenter Klone					284 008,75

Tabelle 7.4.1 Auszählung koloniebildender Einheiten, Berechnung der Wachstumsfähigkeit der Stämme AH 109/Rec/cDNA und Y 187/pGBKT₇/AB und Berechnung der Matingeffizienz

Bezugsstamm SD-Medium	Verdünnungs- faktor	Auspl. Vol. [μ l]	KbE/PLatte	Wachstums- Fähigkeit [KbE/ml]	Mittelwert [KbE/ml]
AH 109 SD-Leu	1	10	62 955	6 295 500	2 945 672,5
			50 843	5 084 300	
	10		19 747	197 470	
			20 542	205 420	
Y 187 SD-Trp	1	10	14 073	1 407 300	1 011 465
			25 194	2 519 400	
	10		7 944	79 440	
			3 972	39 720	
Diploide SD-Trp/-Leu	1	10	11 349	1 134 900	713 862,5
			16 570	1 657 000	
	10		3 745	37 450	
			2 610	26 100	
Matingeffizienz					70,58 %
Anzahl gescreenter Klone					356 913,25

Tabelle 7.4.2 Auszählung koloniebildender Einheiten, Berechnung der Wachstumsfähigkeit der Stämme AH 109/Rec/cDNA und Y 187/pGBKT₇/AB⁺ und Berechnung der Matingeffizienz

Bezugsstamm SD-Medium	Verdünnungs- faktor	Auspl. Vol. [μ l]	KbE/Platte	Wachstums- Fähigkeit [KbE/ml]	Mittelwert [KbE/ml]
AH 109 SD-Leu	1	10	20 882	2 088 200	1 139 720
			23 606	2 360 600	
	10		4 426	44 260	
			6 582	65 820	
Y 187 SD-Trp	1	10	35 295	3 529 500	1 672 552,5
			30 075	3 007 500	
	10		6 128	61 280	
			9 193	91 930	
Diploide SD-Trp/-Leu	1	10	7 263	726 300	379 902,5
			7 604	760 400	
	10		2 497	24 970	
			794	7 940	
Matingeffizienz					33,33 %
Anzahl gescreenter Klone					189 951,25

Tabelle 7.4.3 Auszählung koloniebildender Einheiten, Berechnung der Wachstumsfähigkeit der Stämme AH 109/Rec/cDNA und Y 187/pGBKT₇/AB_{C-Term} und Berechnung der Matingeffizienz

Bezugsstamm SD-Medium	Verdünnungs- faktor	Auspl. Vol. [μ l]	KbE/Platte	Wachstums- Fähigkeit [KbE/ml]	Mittelwert [KbE/ml]
AH 109 SD-Leu	1	10	44 034	4 403 400	2 088 775
			37 111	3 711 100	
	10		9 874	98 740	
			14 186	141 860	
Y 187 SD-Trp	1	10	(Platte verpilzt)	-	723 320
			20 542	2 054 200	
	10		3 859	38 590	
			7 717	77 170	
Diploide SD-Trp/-Leu	1	10	2 610	261 000	136 692,5
			2 837	283 700	
	10		63	630	
			144	1 440	
Matingeffizienz					18,90%
Anzahl gescreenter Klone					68 346,25

Tabelle 7.4.4 Auszählung koloniebildender Einheiten, Berechnung der Wachstumsfähigkeit der Stämme AH 109/pGADT₇-T und Y 187/pGBKT₇-53 und Berechnung der Matingeffizienz

Bezugsstamm SD-Medium	Verdünnungs- faktor	Auspl. Vol. [μ l]	KbE/Platte	Wachstums- Fähigkeit [KbE/ml]	Mittelwert [KbE/ml]
AH 109 SD-Leu	1	10	43 694	4 369 400	2 166 520
			39 721	3 972 100	
	10		19 520	195 200	
			12 938	129 380	
Y 187 SD-Trp	1	10	18 272	1 827 200	807 477,5
			13 505	1 350 500	
	10		2 951	29 510	
			2 270	22 700	
Diploide SD-Trp/-Leu	1	10	10 781	1 078 100	452 530
			6 923	692 300	
	10		2 951	29 510	
			1 021	10 210	
Matingeffizienz					56,04 %
Anzahl gescreenter Klone					226 265

Tabelle 7.4.5 Auszählung koloniebildender Einheiten, Berechnung der Wachstumsfähigkeit der Stämme AH 109/pGADT₇-T und Y 187/pGBKT₇-Lam und Berechnung der Matingeffizienz


```
Query 143 AAAATTTCCAAATTTATCCAAGTGGAGGGATGAGTACATTAAGTGCAGCCAAGTCAAGGA 202
          |||||
Sbjct 2236 AAAATTTCCAAATTTTGTAAAGTGGAGAGGTGAGTACATTAAGTGCAGCCAATCAAGGA
2295

Query 203 TTCTCTACCTCTAAGATATAAGTTGCTTGCtttttttCGAGCTCGTTCTCAAGCTGCTGC 262
          |||||
Sbjct 2296 ATCTCTACCTCCAAGAGATGAGTTGCTTGCtttttttACCGATCTCGCTGTCAA---GCTGC
2352

Query 263 TGCAGCTTCTGCGTCCGCTCCCAAATGAACACATTCTCACTCATTTTATGAGGTACTTTT 322
          |||||
Sbjct 2353 TGCAGCTTCTGCTTCCGCTCCCAAATGAACACATCCTCATTCATCTTATGA---AGTTTC
2409

Query 323 GAGATAATGTGTTAGAATAAAATGCGAATTTAGGACGAGGTTGTAGATTCAATTATGT 382
          |||||
Sbjct 2410 GA-ATTATGTGTCAGAATAAAATATCAATCTACAACGAGTTCTATAGATT-AATTGTAT 2467

Query 383 ATACGTATGCAAAAAAAAAAAAA 404
          |||||
Sbjct 2468 TTACGTATGCAAAAAGAAAAGAA 2489
```

Wer 64 (unbekannte mRNA Sequenzen von *Nicotiana benthamiana*)

```
Query 108 GGGTTTTTCCATATATTTTCAGAA-GCGCAGTCTGCAGC-CGACTTCA-GAAGATGGGTCA 164
          |||||
Sbjct 1 GGGTTTTTGG-ATATATATCAGAAAAGCGCAGCCTCAACCTCTGCTTCGTGAAGATGGGTCA 59

Query 165 CTCCAACATCTGGAACGCTCACCCCAAAAACCTACGGCCCTGGCTCTCGGACCTGCCGCGT 224
          |||||
Sbjct 60 CTCTAACATCTGGAACGCTCATCCCAAGAACCTACGGCCCTGGTTCCCGCACCTGCCGCTGT 119

Query 225 ATGTGGCAATCCACATGCCATTATTAGGAAGTATGGGCTTATGTGCTGCAGGCAGTGCTT 284
          |||||
Sbjct 120 GTGTGGAAATCCACATGCAATTATTAGGAAGTATGGACTCATGTGCTGCAGGCAGTGCTT 179

Query 285 CCGCAGCAATGCAAAGGAAATGGCTTCATTAAGTACCGTTAATGGAATTCAGTTTCCAT 344
          |||||
Sbjct 180 CCGCAGCAATGCCAAGGAAATGGTTTCATTAAGTACCGCTGATTGAGGCTAGTTTCGGT 239

Query 345 GGAGGATCTTTCTCCAGATGGTGTGATGCGATTATTTTATTATGTTTGC-ATG--TACT 401
          |||||
Sbjct 240 AGAGGATC--TCTTCATATGGTGAATGGGATCTTTT--TTATTTATGCTAAGCATATT 295

Query 402 CGAAGTGAATTGCT--AGACTTAAAGATCTTTGTGTTTAGCTTTGTTTTCAGTTTCTA 458
          |||||
Sbjct 296 TATAGTGGATTGCTTTTCAGAC---ATATATCACTGTGTTTAGCTTTGTTTTCAGTGTCTA 352

Query 459 TTTCTATTTAC---TCTCCTACGTAACCTTTGTTTCGT 492
          |||||
Sbjct 353 TTTTCATTTACTTTTTTACTACACAACCTCTGTTTTGT 389
```

Wer 64 (unbekannte mRNA Sequenzen von *Solanum lycopersicum*)

```
Query 154 AAGATGGGTCACTCCAACATCTGGAACGCTCACCCCAAAAACCTACGGCCCTGGCTCTCGG 213
          |||||
Sbjct 55 AAGATGGGTCACTCTAACATCTGGAATGCTCACCCCAAGAACCTACGGCCCTGGCTCCCGT 114

Query 214 ACCTGCCGCGTATGTGGCAATCCACATGCCATTATTAGGAAGTATGGGCTTATGTGCTGC 273
          |||||
Sbjct 115 ACCTGCCGCTGTCTGTGGGAATCCTCATGCAATTATAAGGAAGTATGGACTCATGTGCTGC 174
```

```

Query 274 AGGCAGTGCTTCCGCAGCAATGCAAAGGAAATTGGCTTCATTAAGTACCGTTAA 327
          |||
Sbjct 175 AGGCAGTGCTTCCGCAGCAACGCCAAGGAAACTGGCTTCATCAAGTACCGTTAA 228

```

Wer 70 (unbekannte mRNA Sequenzen von *Nicotiana benthamiana*)

```

Query 127 AGGGTTTTTCATA-CAACGAAGCGCCGCTCTCTCGCTTACAGCTTCTGAAGAAGAAAAAT 185
          |||
Sbjct 1 AGGGTTTTTCA-AGCAACGCAGNGCGGGCTCTCTCGCTTACAGCTTCTGAATAAGAAAGAT 59

Query 186 GGGTCACTCTAACATCTGGAATGCTCACCCCTAAGAACTACGGTCNTGGGTCTCGTACCTG 245
          |||
Sbjct 60 GGGTCACTCTAACATCTGGAATGCTCACCCCAAGAACTACGGCCCTGGCTCCCGTACCTG 119

Query 246 CCGTGTCTGTGGTAATCCTCATGCAATT 274
          |||
Sbjct 120 CCGTGT-CTGTGGGAATCCTCATGCAATT 147

```

Wer 70 (unbekannte mRNA Sequenzen von *Solanum lycopersicum*)

```

Query 154 AAGATGGGTCACTCCAACATCTGGAACGCTCACCCCAAAAACCTACGGCCCTGGCTCTCGG 213
          |||
Sbjct 55 AAGATGGGTCACTCTAACATCTGGAATGCTCACCCCAAGAACTACGGCCCTGGCTCCCGT 114

Query 214 ACCTGCCCGTATGTGGCAATCCACATGCCATTATTAGGAAGTATGGGCTTATGTGCTGC 273
          |||
Sbjct 115 ACCTGCCGTGTCTGTGGGAATCCTCATGCAATTATAAGGAAGTATGGACTCATGTGCTGC 174

Query 274 AGGCAGTGCTTCCGCAGCAATGCAAAGGAAATTGGCTTCATTAAGTACCGTTAA 327
          |||
Sbjct 175 AGGCAGTGCTTCCGCAGCAACGCCAAGGAAACTGGCTTCATCAAGTACCGTTAA 228

```

Wer 71 (Mitochondriale ribosomale RNA von *Cinnamomum camphora*)

```

Query 106 GAATGCATTGGATGGATGCCCGGGCATTGAGAAGGAAGGACGCTTTCAGAGGCGAAAGGC 165
          |||
Sbjct 16 GAATGCATTGGATGGATGCCCGGGCATTGAGAAGGAAGGACGCTTTCAGAGGCGAAAGGC 75

Query 166 CATTGGGGAGATACCGTCTGTGGTCCATGGATCTCCGATCGGGAAACCGTATCCAAGCTC 225
          |||
Sbjct 76 CA-TGGGGAGATACCGTCTGTGATCCATGGATCTCCGATCGGGAAACCGTATCCAAGCTC 134

Query 226 CGTGGCTAGTCTGCGCTCTTTG 247
          |||
Sbjct 135 CGTGGCTAGTCTGCGCTCTTTG 156

```

Wer76 (Ribosomale RNA von *Nicotiana tabacum*)

```

Query 100 CGGGGGAAAAGAAACTTACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAAACCGGGAACAGCCC 159
          |||
Sbjct 30 CGGAGGAAAAGAAACTTACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAAACCGGGAACAGCCC 89

Query 160 AGCCTTAGAATCGGGCGGCTCCGCCGTTTTCGAATTGTAGCCTGGAGAAGNGTCTCTCA 215
          |||
Sbjct 90 AGCCTTAGAATCGGGCGGCTCCGCCGTTTTCGAATTGTAGTCTGGAGAAGCGTCTCTCA 145

```


Wer 88 (ScmMyosin-ähnliches Protein von *Patinopecten yessoensis*)

```

Query 72  TATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGA 102
          |||
Sbjct 10  TATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGA 40

```

Wer 89 (Sekretorische Peroxidase (PER) von *Nicotiana tabacum*)

```

Query 89  GGCCATATGTCCCGCTCAAAACAGGAAGAAGAGATGGAAGGAAGAGCAGAGTANCANCAT 148
          |||
Sbjct 461  GGCCATATGTCCCACTCAAACTGGAAGAAGAGATGGAAGAAAGAGCAGAGCAG--ACAT 518

Query 149  TCTTGAGCAACACCTCCCAGACCACAATGAAAGCATGNGTGTATGTTCTTNAGAGGTTAG 208
          |||
Sbjct 519  TCTTGAGCAACACCTCCCAGACCACAATGAAAGCATGAGTGT-TGTTCTTGAGAGGTTTG 577

Query 209  TCAATGTTGGTATTTACACTCCTGGATTTGTTGCCTTGTTAGNGCT 255
          |||
Sbjct 578  CCAATGTTGGTATCAACGCTCCTGGAGTTGTTGCCTTGCTAGGGGCT 624

```

Wer 90 (DKFZp686H1748 von *Homo sapiens*)

```

Query 60  AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGT 99
          |||
Sbjct 1   AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGT 40

```

Wer 91 (Chloroplasten Genom DNA *Nicotiana tabacum*)

```

Query 91  CATCCGGGAAAAACGATTAATCTCTATCAATAGACCTGCTAAAGCCCCGAACCATAGCG 150
          |||
Sbjct 69675  CATCCGGGAAAAACGATTAATCTCTATCAATAGACCTGCTAAAGCCCCGAACCATAGCG 69616

Query 151  TACTTAGTACTGGTGCCACAGAGAGATATGTTTTAGATCTCGCATTGAAAAACCTCCTT 210
          |||
Sbjct 69615  TACTTAGTACTGGTGCCACAGAGAGATATGTTTTAGATCTCGCATTGAAAAACCTCCTT 69556

Query 211  CTTTTGTATTATTTGTTGGAATAGATAATACATATATAATCAGATGCATATGTAGTTAAG 270
          |||
Sbjct 69555  CTTTTGTATTATTTGTTGGAATAGATAATACATATATAATCAGATGCATATGTAGTTAAG 69496

Query 271  GGCTGCTTAGAGTTGGACACAGAATTCCTAATTCAAAATGCAATGTACAATGATTCGGGA 330
          |||
Sbjct 69495  GGCTGCTTAGAGTTGGACACAGAATTCCTAATTCAAAATGCAATGTACAATGATTCGGGA 69436

Query 331  AATAAGATTTTCCTTTTCTTANAACAG 357
          |||
Sbjct 69435  AATAAGATTTTCCTTTTCTTANAACAG 69409

```

Wer 92 (Poly(A)-Bindepotein (PABP) *Nicotiana tabacum* Klon)

```

Query 130  TGCAACAAACTCAGCAGCCCACGCTCTCATGATGCAGCATCAGATGCTCCCAAGGGGAAG 189
          |||
Sbjct 959  TGCAACAAACTCAACAGCCTATGCCCT--TGATGCAGCAGCAGATGCTCCCTAGGGGAAG 1016

Query 190  AATGTATCGGTATCCACCTGGTTCGTAAT 217
          |||
Sbjct 1017  AATGTACCGCTATCCACCAGGACGTAAT 1044

```

Wer 93 (Scmlp Myosinähnliches Protein von *Patinopecten yessoensis*)

```

Query 62  AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGA 101
          |||
Sbjct 1    AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGA 40

```

Wer 94 (DKFZp686D18109 von *Homo sapiens*)

```

Query 70  TGGTATCAACGCAGAGTGGCCGTTATGGGGG 100
          |||
Sbjct 7    TGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGGGG 37

```

Wer 95 (GapC Cytosolische G cerialdehyd-3-Phosphophat-Dehydrogenase von *Nicotiana tabacum*)

```

Query 92  TATGGCCGGGAGTGGTCTTCTTGCTTAATTGTAATGGAATAACCAGAGAGGAACTACTGT 151
          |||
Sbjct 1045 TATGGCCGGGAGTGGTCTTCTTGCTTAATTGTAATGGAATAACCAGAGAGGAACTACTGT 1104

Query 152  GTTATCTTTGAGGAATGTTGGGCTTTTTTCGTTTGAATTATCATGAATGAAATTTACTT 211
          |||
Sbjct 1105 GTTATCTTTGAGGAATGTTGGGCTTTTTTCGTTTGAATTATCATGAATGAAATTTACTT 1164

Query 212  TTTCCCAA 219
          |||
Sbjct 1165 TTTCCCAA 1172

```

Wer 96 (Scmlp Myosin-ähnliches Protein von *Patinopecten yessoensis*)

```

Query 66  CAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGA 102
          |||
Sbjct 4    CAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGA 40

```

Wer 97 (GapC Cytosolische G cerial-dehyd-3-Phosphophat-Dehydrogenase von *Nicotiana tabacum*)

```

Query 88  TATGGCCGGGAGTGGTCTTCTTGCTTAATTGTAATGGAATAACCAGAGAGGAACTACTGT 147
          |||
Sbjct 1045 TATGGCCGGGAGTGGTCTTCTTGCTTAATTGTAATGGAATAACCAGAGAGGAACTACTGT 1104

Query 148  GTTATCTTTGAGGAATGTTGGGCTTTTTTCGTTTGAATTATCATGAATGAAATTTACTT 207
          |||
Sbjct 1105 GTTATCTTTGAGGAATGTTGGGCTTTTTTCGTTTGAATTATCATGAATGAAATTTACTT 1164

Query 208  TTTCCCAA 215
          |||
Sbjct 1165 TTTCCCAA 1172

```

Wer 98 (Scmlp Myosin-ähnliches Protein von *Patinopecten yessoensis*)

```

Query 61  AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGA 100
          |||
Sbjct 1    AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGA 40

```

Wer 99 (Chromosom 5, Klon mth2-16f8, komplette Sequenz von *Medicago truncatula*)

```

Query 136   CTCATAGGAGGAAATTTGGTTACATGGAGAAGCAAGAAGCAAAGTGTAGTTGCTGGATCA 195
          ||||| ||||| ||||| || ||||| ||| ||||| ||||| ||| ||||| |||||
Sbjct 58263 CTCATTGGAGGCAATTTGATTTTCATGGAAAAGTAAGAAGCAAAATGTCGTTGCTAGATCA 58204

Query 196   AGTGCGGAGGCAGAATATAGAGCTATGGC 224
          ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 58203 AGTGCAGAGGCAGAATATAGAGCTATGGC 58175

```

Wer100 DKFZp779I1240 (from clone DKFZp779I1240, *Homo sapiens*)

```

Query 62     CCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGTC 99
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3574   CCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTCGCCATTATGTC 3611

```

Wer 102 (Chromosom 5, Klon mth2-16f8, komplette Sequenz, *Medicago truncatula*)

```

Query 133   CTCATAGGAGGAAATTTGGTTACATGGAGAAGCAAGAAGCAAAGTGTAGTTGCTGGATCA 192
          ||||| ||||| ||||| || ||||| ||| ||||| ||||| ||| ||||| |||||
Sbjct 58263 CTCATTGGAGGCAATTTGATTTTCATGGAAAAGTAAGAAGCAAAATGTCGTTGCTAGATCA 58204

Query 193   AGTGCGGAGGCAGAATATAGAGCTATGGC 221
          ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 58203 AGTGCAGAGGCAGAATATAGAGCTATGGC 58175

```

Wer 103 (Chromosom 5, Klon mth2-16f8, komplette Sequenz, *Medicago truncatula*)

```

Query 134   CTCATAGGAGGAAATTTGGTTACATGGAGAAGCAAGAAGCAAAGTGTAGTTGCTGGATCA 193
          ||||| ||||| ||||| || ||||| ||| ||||| ||||| ||| ||||| |||||
Sbjct 58263 CTCATTGGAGGCAATTTGATTTTCATGGAAAAGTAAGAAGCAAAATGTCGTTGCTAGATCA 58204

Query 194   AGTGCGGAGGCAGAATATAGAGCTATGGC 222
          ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 58203 AGTGCAGAGGCAGAATATAGAGCTATGGC 58175

```

Wer 106 (S-adenosyl-L-Mhionin- Synthetase (SAMS) complete cds, *Nicotiana tabacum*)

```

Query 118   GGTACATGTTTGGCTATGCCACTGATGAAACCCAGAGCTCATGC 163
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 465   GGTACATGTTTGGCTATGCCACTGATGAAACCCAGAGCTCATGC 510

```

Wer 107 (proteasome AAA-ATPase Untereinheit RPT4a-like protein, complete cds, *Solanum tuberosum*)

```

Query 92     GGTATGTGGTTGGCTGTTCGAGTAAAGTTGACAAGGAAAAATGACTTCGGGCACAAGAG 151
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 317   GGTATGTGGTTGGCTGTTCGAGTAAAGTTGACAAGGAAAAACTGACTTCAGGCACACGAG 376

Query 152   TGGTTCTCGATATGACGACACTTACAATTATGCGAGCACTCACCCTGAAGTTGATCCTG 211
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 377   TGGTTCTCGATATGACAACACTTACAATCATGCGGGCACTCCCCCTGAAGTTGATCCTG 436

Query 212   TAGTACACAACGTGCTTCATGAAGATCCTGGTAACATAAGTTACTCTGCTGTGGGTGGAC 271
          | ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 437   TTGTATACAACATGCTTCATGAAGATCCTGGCAACATCAGTTACTCTGCCGTGGGTGGAC 496

```

Query	272	TGTCAGATCAGATCAGGGAGCTGAGAGAATCCATAGAGTTACCTCTAATGAACCCCGAGC	331
Sbjct	497	TGTCAGATCAGATCAGGGAGCTGAGAGAATCCATTGAGTTACCTCTAATGAACCCCTGAGC	556
Query	332	TTTTCTTCGTGTGGGATTAAGCCTCCAAAGGGTGTCTTCTCTATGGGCCCGCTGGAA	391
Sbjct	557	TTTTCTCCGGTGGGATTAAGCCTCCAAAGGGTGTCTTCTCTACGGGCCACCTGGAA	616
Query	392	CGGGCAAGACATTGTTAGCCAGGGCAATTGCTAGCAACATAGATGCCAATTTCTTAAAGG	451
Sbjct	617	CAGGCAAGACATTGTTAGCCAGGGCAATCGCTAGCAACATAGATGCCAATTTCTTAAAGG	676
Query	452	TTGTGTCAAGTGCCATTATTGATAAGTACATAGGTGAGAGTGCAAGATTGATCCGGGAAA	511
Sbjct	677	TTGTATCAAGTGCCATTATTGATAAGTACATTGGTGAGAGTGCAAGATTAATTCGGGAAA	736
Query	512	TGTTTAATTATGCTCGTGATCACCAACCCTGCATCATTTTTCGTGGATGAGATTGATGCAA	571
Sbjct	737	TGTTTAACATGCTCGTGATCACCAACCCTGCATCATATTCATGGATGAGATAGATGCAA	796
Query	572	TTGGTGGACGTCGTTTTAGCGAGGGGACAAGTGCAGACCGTCAAATTCAAAGAACGCTCA	631
Sbjct	797	TTGGTGGACGTCGTTTTAGTGAGGGAACCAGTGCAGACCGTCAAATTCAAAGAACGCTCA	856
Query	632	TGGAATTGCTTAATCAGTTGGATGGATTGACCAGCTTGGAAAGGTAAAAATGATTATGG	691
Sbjct	857	TGGAGTTGCTCAATCAGTTGGATGGATTTGACCAGCTTGGAAAGGTAAAAATGATTATGG	916
Query	692	CAACGAATAGACCTGATGTTTTGGACCCAGCTCTTCTACGCCCTGGTCGGTTAGATAGAA	751
Sbjct	917	CAACAAATAGACCTGATGTTTTGGACCCAGCTCTTCTTCGTCTGGTCGATTAGATAGAA	976
Query	752	AGATAGAAATACCCTTTGCCTAATGAACAATCAAGAATGGAAGTCTCAAGATCCATGCT	811
Sbjct	977	AGATAGAAATACCC-TTGCCTAATGAACAATCAAGAATGGAATCCTCAAGATCCATGCT	1035
Query	812	GCTGGGGATAGCCAAACATGGGTGAAATTGATTATGAGGCTGTTGTCAAGCTTGCTGANG	871
Sbjct	1036	GCT-GGGATTGCCAAACAT-GGTGAAATTGATTATGAGGCTGCTATTAAGCTCGCTGAGG	1093
Query	872	GNTTTTAATGGGGCTGATCTGCG	894
Sbjct	1094	GA-TTTAATGGGGCTGATATGCG	1115

Wer108 (Vermutliche alpha4 proteasome Untereinheit (a4 gene), *Nicotiana tabacum*)

Query	89	CATTTGGTCTTTCAACCTTGATCATTGGTTTTGATCCTTACACTGGTGTCCATCACTTT	148
Sbjct	41	CATTTGGTCTTTCAACCTTGATAATTGGTTTTGATCCTTACACTGGTGTCCCGTCACTTT	100
Query	149	ATCAAACAGATCCACCTGGAACATTCTCAGCATGGAAAGCCAATGCAACAGGGAGAAACT	208
Sbjct	101	ATCAAACAGATCCATCTGGAACATTCTCAGCATGGAAAGCCAATGCAACAGGGAGAAACT	160
Query	209	CCAACTCTCTCCGGGAGTTCTTGGAGAAAAATTACAAAGAAACATCTGGCCAGGAAACTG	268
Sbjct	161	CCAACTCTCTCCGGGAGTTCTTGGAGAAAAATTACAAAGAAACATCTGGCCAGGAAACTG	220
Query	269	TGAAACTTGCAATACGTGCTTTGCTCGAAGTTGTTGAGAGCGGCGGAAAGAATATTGAAG	328
Sbjct	221	TGAAACTTGCAATACGTGCTTTGCTTGAAGTTGTTGAGAGTGGTGAAAGAATATTGAAG	280
Query	329	TTGCTGTCATGACAAAAGAGCATGGGCTTAAGCAACTCGAGGAAGCTGAGATCGATGCAA	388
Sbjct	281	TTGCTGTCATGACAAAAGAGCATGGGCTTAAGCAACTCGAGGAAGCTGAGATTGATGCCA	340

```

Query 389 TTGTTGCTGAGATTGAGGCAGAGAAAGCNGCTGCNNAAGCTGCAAAAANGGCTCCT 444
          |||
Sbjct 341 TTGTTGCTGAGATTGAGGCAGAGAAAGCAGCTGCAGAAGCTGCAAAAANGGCTCCT 396

```

Wer109 (26S proteasome Untereinheit alpha 4, partial cds, *Nicotiana benthamiana*)

```

Query 87 CATTGGTCTTTCAACCTTGATCATTGGTTTTGATCCTTACACTGGTGTCCATCACTTT 146
          |||
Sbjct 41 CATTGGTCTTTCAACCTTGATAATTGGTTTTGATCCTTACACTGGTGTCCCCTCACTTT 100

Query 147 ATCAAACAGATCCACCTGGAACATTCTCAGCATGGAAAGCCAATGCAACAGGGAGAAACT 206
          |||
Sbjct 101 ATCAAACAGATCCATCTGGAACATTCTCAGCATGGAAAGCCAATGCAACAGGGAGAAACT 160

Query 207 CCAACTCTCTCCGGGAGTTCTTGAGAAAAATTACAAAGAAACATCTGGCCAGGAAACTG 266
          |||
Sbjct 161 CCAACTCTCTCCGGGAGTTCTTGAGAAAAATTACAAAGAAACATCTGGCCAGGAAACTG 220

Query 267 TGAAACTTGCAATACGTGCTTTGCTCGAAGTTGTTGAGAGCGGCGAAAGAATATTGAAG 326
          |||
Sbjct 221 TGAAACTTGCAATACGTGCTTTGCTCGAAGTTGTTGAGAGTGGTGGAAAGAATATTGAAG 280

Query 327 TTGCTGTCTATGACAAAAGAGCATGGGCTTAAGCAACTCGAGGAAGCTGAGATCGATGCAA 386
          |||
Sbjct 281 TTGCTGTCTATGACAAAAGAGCATGGGCTTAAGCAACTCGAGGAAGCTGAGATTGATGCCA 340

Query 387 TTGTTGCTGAGATTGAGGCAGAGAAAGCAGCTGCNGAAGCTGC 429
          |||
Sbjct 341 TTGTTGCTGAGATTGAGGCAGAGAAAGCAGCTGCAGAAGCTGC 383

```

Wer110 (Ascorbat-Peroxidase (APX), complete cds, *Nicotiana tabacum*)

```

Query 105 TAAGGGGAAACTCAGAGGACTCATTGCTGAGAAGAATTGCGCTCCTCTTATGCTCCGTCT 164
          |||
Sbjct 140 TAAGAGGAAACTCAGAGGACTCATTGCTGAGAAGAATTGCGCTCCTCTTATGCTCCGTCT 199

Query 165 TGCATGGCACTCTGCTGGTACCTATGATGTGTGCTCCAAAACCTGGAGGTCCATTCCGGTAC 224
          |||
Sbjct 200 TGCATGGCACTCTGCTGGTACCTATGATGTGTGCTCCAAAACCTGGAGGTCCATTCCGGTAC 259

Query 225 CGTGAGGCTCAAGGCTGAGCAAGGACATGGAGCAAACAATGGTATTGACATTGCTATAAG 284
          |
Sbjct 260 CATGAGGCTCAAGGCTGAGCAAGGACATGGAGCAAACAATGGTATTGACATTGCTATAAG 319

Query 285 ACTCTTGAGCCATTAAGGAGCAGTTTCCTATCCTCTCATATGGTGATTTCTATCAATT 344
          |||
Sbjct 320 ACTCTTGAGCCATTAAGGAGCAGTTTCCTATCCTCTCATATGGTGATTTCTATCAATT 379

Query 345 AGCTGGAGTTGTTGCTGTTGAAGTTACTGGAGGACCTGATGTTCCCTTTACCCCTGGTAG 404
          |||
Sbjct 380 AGCTGGAGTTGTTGCTGTTGAAGTTACTGGAGGACCTGATGTTCCCTTTACCCCTGGTAG 439

Query 405 AGAGGACAAGACAGAGCCACCCGTTGAAGGTCGCTTGCCTGATGCTACCAAGGGTTCTGA 464
          |||
Sbjct 440 AGAGGACAAGACAGAGCCACCCGTTGAAGGTCGCTTGCCTGATGCTACCAAGGGTTCTGA 499

Query 465 CCACTT 470
          |||
Sbjct 500 CCACTT 505

```

Wer 111 (Peroxidase NtPOX1, complete cds, *Nicotiana tabacum*)

```

Query 99  TGGGTTTTACCAGGTGCGCCACCGCGTGCAACAGCAACAACGTTAACCCAGCGGCACGTC 158
|
Sbjct 762  TGGGTTTTACCAGGTGCGCCACCGCGTGCAACAGCAACAACGTTAACCCAGCGGCACGTC 821

Query 159  TTCAATGCAACTGCTCCGTCACCCAAAACGACACCAACTTGCAACAACCTGGATAGAACTC 218
|
Sbjct 822  TTCAATGCAACTGCTCCGTCACCCAAAACGACACCAACTTGCAACAACCTGGATAGAACTC 881

Query 219  CTGCAGTGTTCGACAAAGTTTACTTCCAGGACTTAAACAGGAACCAGGGTATACTTTTCT 278
|
Sbjct 882  CTGCAGTGTTCGACAGAGTTTACTTCCAGGACTTAAACAGGAACCAGGGTATACTTTTCT 941

Query 279  CGGATCAAGTGTGACGGGGAATACCACCCTGCTGCTATTGTTACAACCTACAGCAATA 338
|
Sbjct 942  CGGATCAAGTGTGACGGGGAATACCACCCTGCTGCTATTGTTACAACCTACAGCAATA 1001

Query 339  ATGGTGCTGCTTTTCTTGGAGATTTGCTGCTGCTATGATCAAGATGGGGAACCTGCCTC 398
|
Sbjct 1002  ATGGTGCTGCTTTTCTTGGAGATTTGCTGCTGCTATGATCAAGATGGGGAACCTGCCTC 1061

Query 399  CCTCACCGGGCGTTCAATTGGAAATTCGTGATGTTTGCAGCAGGGTCAATCCCAGCTCTG 458
|
Sbjct 1062  CCTCACCGGGCGTTCAATTGGAAATTCGTGATGTTTGTAGCAGGGTCAATCCCAGCTCTG 1121

Query 459  TGGCTTCTATGTGAAAGGAAAACCTGAATTNNGCAAAAAGGAATTCATGAACTCACTATN 518
|
Sbjct 1122  TGGCTTCTATGTGAAAGGAAAACCTGAATTTGGCAAAAAGGAATTCATGAACTCACTATT 1181

Query 519  ANNTGGTNGATGTTTTCTTAAAATAAAAAGAATCCACTGGTTCCTGAATGTGGTCCAAAAT 578
|
Sbjct 1182  AGTTGGTTGATGTTTTCTTAAAATAAAAAGAAT-CACTGGTTCCTGAATGTGGTCCAAAAT 1240
Query 579  TAATGNACTCTATATNATTTTTCCNGTGNTGAANAAATTCCTNAAT 624
|
Sbjct 1241  TAATGTACTCTATATATTTTTCCAGTGTGAA-AAATTCCTGAAT 1285

```

Wer 112 (mitochondriale DNA, complete genome, *Nicotiana tabacum*)

```

Query 97  GAATGCATTGGATGGATGCCCCGGGCATTGAGAAGGAAGGACGCTTTCAGAGGCGAAAGGC 156
|
Sbjct 66870  GAATGCATTGGATGGATGCCCCGGGCATTGAGAAGGAAGGACGCTTTCAGAGGCGAAAGGC 66929

Query 157  CATGGGGAGATACCGTCTGTGGTCCATGGATCTCCGATCGGGAAACCGTATCCAAGCTCC 216
|
Sbjct 66930  CATGGGGAGATACCGTCTGTGATCCATGGATCTCCGATCGGGAAACCGTATCCAAGCTCC 66989

Query 217  GTGGCTAGTCTGCGCTCTTTGGACTTTTCAAACCTTAGCGAACTGAAACATCTTAGTAGCT 276
|
Sbjct 66990  GTGGCTAGTCTGCGCTCTTTGGACTTTTCAAACCTTAGCGAACTGAAACATCTTAGTAGCT 67049

Query 277  AAAGGAAGGGAAATCAACCGAGACCCCGTTAGTAGCGGCGAGCGAGAGCGGATTGGGGGT 336
|
Sbjct 67050  AAAGGAAGGGAAATCAACCGAGACCCCGTTAGTAGCGGCGAGCGAGAGCGGATTGGGGGT 67109

Query 337  TTGAAG 342
|
Sbjct 67110  TTGAAG 67115

```

7.5 Materialien

7.5.1 Chemikalien und andere Reagenzien

Adenin-Hemisulfat.....	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Agarose QualexGold.....	Hybaid, Heidelberg
Ampicillin Na-Salz	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Bacto-Agar.....	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt.....	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Pepton.....	Becton,Dickinson&Company, Frankreich
Bacto-Trypton.....	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bromphenolblau.....	Serva Feinbiochemica,Heidelberg
Calciumchlorid.....	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Chloroform.....	Labor Service GmbH, Darmstadt
D-Sorbit	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Dithiothreitol.....	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Dropout Supplement –Leu/-Trp.....	BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA
Dropout Supplement –Ade/-His/-Leu/-Trp	BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA
DTT.....	Serva Feinbiochemica,Heidelberg
dNTPs	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
EDTA·Na ₂	Serva Feinbiochemica,Heidelberg
Ethidiumbromid.....	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol	Labor Service GmbH, Darmstadt
Glucose	Serva Feinbiochemica,Heidelberg
Glycerol	Serva Feinbiochemica,Heidelberg
Heringssperma-DNA	Promega, Mannheim
Isopropanol	Labor Service GmbH, Darmstadt
Kaliumjodid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Lithiumacetat-Dihydrat.....	ICN Biochemicals, Inc., Aurora, USA
MES	Serva Feinbiochemica,Heidelberg
MOPS.....	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Natriumchlorid.....	Labor Service GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid.....	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
N-Laurylsarcosol	Sigma, Deisenhofen
N, N-Dimethylformid (DMF)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Quarz.....	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
PEG.....	ICN Biochemicals, Inc., Aurora, USA
peqGOLD RNAPure™	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
SDS	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
SYBR®Gold.....	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Tris.....	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe

Triton-X-100.....	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Universal Agarose.....	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids.....	Becton, Dickinson & Company, Sparks, USA
α -xGal.....	Warrington, England

Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

7.5.2 Enzyme

Extensor Hi-Fidelity PCR Enzyme Mix	ABgene, Hamburg
T4-Ligase.....	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Lyticase.....	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mid-Range Polymerase.....	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
M-MLV Reverse Transkriptase	
RNase H Minus.....	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> Polymerase.....	
Go-Taq [®] -Polymerase.....	Promega, Mannheim

Sämtliche verwendete Restriktionsenzyme wurden bei MBI Fermentas (St. Leon Roth) bezogen.

7.5.3 Labormaterialien

Einmal-Küvetten 2,5 ml.....	Carl Roth, GmbH & Co, Karlsruhe
Nesco-Film.....	Carl Roth, GmbH & Co, Karlsruhe
Reagiergefäße (2 ml, 1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße (0,2 ml)	Abgene, Hamburg

7.6 Abkürzungen

Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
<i>Bam</i> H I	<i>Bacillus amyloiquefaciens</i> H
Bsp.	Beispiel
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
Chl.	Chloroform
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	deionisiertes zweifach destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid
EthBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
GU-HCl	Guanidinium-Hydrochlorid
gRNA	gesamt-RNA
IAA	Isoamylalkohol
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
LB	Luria Bertani
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonucleic acid (Boten-RNA)
MTOC	Microtubule organizing center
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
p.A.	pro Analyse
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pDNA	Plasmid-DNA
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute (Umdrehungszahl)
rRNA	ribosomale RNA

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit folgender PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sddH ₂ O	steriles (→ ddH ₂ O)
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

7.7 Symbole für die Darstellung der Aminosäuren

Alanin.....	A	Leucin.....	L
Arginin.....	R	Lysin.....	K
Asparagin.....	N	Methionin	M
Asparaginsäure.....	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure.....	E	Threonin	T
Glycin.....	G	Tryptophan	W
Histidin.....	H	Tyrosin	Y
Isoleucin.....	I	Valin	V