

CHARAKTERISIERUNG EINER PFLANZLICHEN VARIANTE
DES CYTOSKELETTPROTEINS γ -TUBULIN DURCH
STRUKTURMODELLIERUNG, ÜBEREXPRESSION UND ANALYSE DER
INTERAKTIONSPARTNER

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität

Michael Rainer Ostertag
geboren am 17. April 1982
in Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2012

Für meine Familie

To hell with circumstances, I create opportunities!

Lee Jun-fan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Einleitung

1.1. Zielsetzung	2
1.2. Das Cytoskelett	3
1.2.1. Mikrotubuli	4
1.2.2. γ -Tubulin	8
1.3. Proteinexpression	11
1.3.1. Zellbasierte Systeme	11
1.3.2. Zellfreie Systeme	13
1.3.3. Proteinpurifikation	13
1.3.4. Posttranscriptional Gene Silencing	14
1.3.5. Posttranslational Modifications	14

Material und Methoden

2.1. Zell- und Pflanzenkultivierung sowie Gentransfer	18
2.1.1. Steriles Arbeiten und Sterilisation von Labormaterialien	18
2.1.2. Vektorsysteme und Selektionsfaktoren	18
2.1.3. Bakterienkultivierung	20
2.1.4. Hefekultivierung	24
2.1.5. Pflanzenkultivierung	26
2.2. Molekulargenetik	31
2.2.1. Nukleinsäure-Isolation	31
2.2.2. Nukleinsäureanalytik	35
2.2.3. Nukleinsäurereaktionen	39
2.3. Proteinbiochemie	47
2.3.1. Induktion einer heterologen Expression	47
2.3.2. Proteinisolation	49
2.3.3. Proteincharakterisierung und -nachweis	50
2.3.4. Proteinpurifikation	61
2.3.5. Proteinidentifikation	64
2.4. Bioinformatik	70
2.4.1. Software	70

Ergebnisse

3.1. <i>In silico</i> Berechnungen zur Identifikation potentieller Interaktionsstellen	72
3.1.1. Strukturmodellierung	73
3.1.2. Vergleichende Primärstrukturanalyse	84
3.1.3. Identifikation potentieller pflanzenspezifischer Interaktionsstellen	85
3.2. Klonierung und Expression von γ -Tubulin	87
3.2.1. Bakteriell pET-Expressionssystem	87
3.2.2. Hefe pKLAC-Expressionssystem	96
3.2.3. Pflanzliche Binäre Vektor Systeme	99
3.3. Biochemische Charakterisierung	112
3.3.1. Native Isolation und Pull-Down	112
3.3.2. Massenspektrometrische Analyse assoziierter Proteine	113

Diskussion

4.1. <i>In silico</i> Berechnungen zur Identifikation potentieller Interaktionsstellen	118
4.1.1. Bewertung des verwendeten Strukturmodells	118
4.1.2. Schlussfolgerungen aus dem elektrostatischen Oberflächenpotential	119
4.1.3. Der γ -A/B-Peptid-Bereich als Ort potentieller Proteininteraktionen	119
4.2. Klonierung und Expression von γ -Tubulin	120
4.2.1. <i>E. coli</i> -Expressionssystem	121
4.2.2. Hefe-Expressionssystem	122
4.2.3. Pflanzliche Expressionssysteme	123
4.2.4. Regulation der γ -Tubulin-Expression	124
4.3. Charakterisierung der Interaktionspartner	126

Zusammenfassung

Anhang

A.1. Strukturmodellierung	II
A.2. Massenspektrometrische-Proteinidentifikation	II

Literaturverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Alle Einheiten leiten sich, soweit nicht abweichend vermerkt, von SI-Basiseinheiten ab (ISO 1000). Einheitenpräfixe wie m, μ , n, p oder f stehen für milli, mikro, nano, piko oder femto und dienen gemäß DIN1301 zur Bildung von Teilen der Maßeinheiten. Die Indices *abs* und *rel* geben an ob es sich um absolute oder relative Fehlergrenzen handelt.

Chemische Elemente sind nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Numerische Indices in Summenformeln beschreiben das Stoffmengenverhältnis.

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyssäure
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
α-MF	α -Matingfaktor
Amd^S	Acetamidase-Selektionsfaktorgen
α-MF	α -Mating Faktor Segregations-Signalsequenz
Amp^R	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumpersulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BY-2	Bright Yellow-2
°C	Grad Celsius
Cam^R	Chloramphenicol-Resistenzgen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	kodierende Sequenz
CMV	Cucumber Mosaic Cucumovirus
CTAB	N,N,N-trimethyl-hexadecan-1-aminium-bromid
Da	Dalton [u]
$\Delta\Delta C_T$	$\Delta\Delta$ Cycle Threshold
ΔC_β	C_β -Abweichung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DsbA	Proteindisulfid-Isomerase A
IIDsbA	signalsequenzfreie Proteindisulfid-Isomerase A
DsbC	Proteindisulfid-Isomerase C
IIDsbC	signalsequenzfreie Proteindisulfid-Isomerase C
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycolbis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
zg	Schwerebeschleunigung in $m \cdot s^{-2}$
GDP	Guanosindiphosphat
gTuRC	γ -Tubulin-Ringkomplex
Gen^R	Gentamicin-Resistenzgen
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gew.-%	Gewichtsprozent
GST	Glutathion S-Transferase SjGST
GTP	Guanosintriphosphat
H₂O	Wasser
His₆	Hexahistidin
HRP	Meerrettichperoxidase
Hyg^R	Hygromycin-Resistenzgen
IAA	Isoamylalkohol
IBs	<i>Inclusion bodies</i>
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
Kan^R	Kanamycin-Resistenzgen

Abkürzungsverzeichnis

<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
LB	Lysogenie Komplexnährmedium
M	Stoffmengenkonzentration in $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
MALDI	Matrixassistierte Laser Desorption/Ionisation
MBP	Maltose-Bindeprotein MalE
MCS	Multiple Klonierungsstelle
β -ME	β -Mercaptoethanol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MTOC	Mikrotubuli organisierende Zentren
MWCO	Ausschlussgrenze
n	$n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte
P	Promoter
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PPFD	Photosynthetische Photonenflussdichte
PTGS	Posttranscriptional Gene Silencing
PTM	Posttranslational Modification
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
Rif ^R	Rifampicin-Resistenzgen
RMSD	Abweichung des quadrierten mittleren Abstandes äquivalenter Atome
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sddH ₂ O	steriles bidestilliertes Wasser
SDS _R	Natriumdodecylsulfat
Spc ^R	Spectinomycin-Resistenzgen
Str ^R	Streptomycin-Resistenzgen
t	Zeit
T	Temperatur
TBSV	Tomatenzwergbusch-Virus
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenzgen
TEV	Tabak Ätz Virus [Taxonomy ID: 12227]-Protease
T _M	Hybridisierungstemperatur
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TOF	Time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TrxA	Thioredoxin A
Vol.-%	Volumenprozent
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid
z. B.	z. B.
::	Genelementseparator

Einleitung

1.1.	Zielsetzung	2
1.2.	Das Cytoskelett	3
1.2.1.	Mikrotubuli	4
1.2.1.1.	Mikrotubuli organisierende Zentren	7
1.2.2.	γ -Tubulin	8
1.2.2.1.	Lokalisierung und Funktion	9
1.2.2.2.	γ -Tubulin-Ringkomplex	10
1.2.2.3.	Pflanzenspezifische γ -Tubulin-Proteindomänen	11
1.3.	Proteinexpression	11
1.3.1.	Zellbasierte Systeme	11
1.3.1.1.	Bakterielle Systeme	11
1.3.1.2.	Hefe Systeme	12
1.3.1.3.	Pflanzliche Systeme	12
1.3.2.	Zellfreie Systeme	13
1.3.3.	Proteinpurifikation	13
1.3.4.	Posttranscriptional Gene Silencing	14
1.3.5.	Posttranslational Modifications	14

1.1 Zielsetzung

Die Wachstumsregulation höherer Pflanzen erfolgt in meristematischen Zellen und den benachbarten Differenzierungszonen. Die Zellen umgibt eine pflanzentypische Zellwand die eine frühzeitige Determinierung der Teilungsebene und Zellform zwingend notwendig macht. Bei der Umsetzung formgebender Prozesse ist unter anderem das Cytoskelett beteiligt. Beim Cytoskelett handelt es sich um ein dynamisches Proteinnetzwerk, das der Zelle nicht nur mechanische Stabilität verleiht, sondern auch sensorische und Transportfunktionen erfüllt. Bei Eukaryoten unterscheidet man drei Filamentklassen, die sich aufgrund der Proteine unterscheiden.

- Aktinfilamente
- Intermediärfilamente
- *Mikrotubuli*

Die Existenz von Aktinfilamenten in pflanzlichen Zellen ist bereits nachgewiesen, das Vorkommen von Intermediärfilamenten ist jedoch seit mehr als zwei Jahrzehnten Gegenstand intensiver Diskussionen [1, 2]. Die Funktion der Mikrotubuli in pflanzlichen Zellen ist weitgehend verstanden, deren Organisation wirft jedoch Fragen auf. Die Mikrotubuliorganisation ist vermutlich in hohem Maß durch das Protein γ -Tubulin reguliert [3], über dessen Interaktionen und Regulation gegenwärtig wenig bekannt ist. Die Struktur pflanzlicher γ -Tubuline sowie deren direkte Interaktionspartner sind bisher unbekannt und eine Kenntnis derer würde zu einem besseren Verständnis dieser Teilungs- und Differenzierungsprozesse beitragen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es ein Strukturmodell für das pflanzliche γ -Tubulin zu erarbeiten, das zur Hypothesenentwicklung über an Proteininteraktionen beteiligte Domänenbereiche geeignet ist. Weiter soll γ -Tubulin für Röntgendiffraktionsexperimente und Interaktionspartneranalysen nativ gefaltet überexprimiert werden. Mittels Pull-Down Experimenten und massenspektroskopischen Analysen sollen potentielle γ -Tubulin-Interaktionspartner identifiziert werden.

1.2 Das Cytoskelett

Die Zellorganisation sowie Bewegungsprozesse sind durch das Cytoskelett reguliert und determiniert. Das als Cytoskelett bezeichnete Filamentsystem einer Zelle stellt eine dynamische Struktur dar. Die drei Haupt-Filamenttypen sind vielen eukaryotischen Zellen gemein und tragen zur räumlichen Organisation der Zelle bei (Abbildung 1.1). Dieses Proteinnetzwerk durchsetzt das Cytoplasma und ermöglicht die Umsetzung formgebender und intrazellulärer Bewegungsprozesse [4]. Darüber hinaus ist die Richtung der Zellteilung und Zelldifferenzierung durch das Cytoskelett determiniert [5].

Die Intermediärfilamente sind eine der drei Hauptgruppen, welche eine heterogene Proteinfamilie bilden. Die intrafamiliäre Heterogenität erschwert den spezifischen Nachweis innerhalb einer Zelle [6]. Intermediärfilamente sind seilähnliche Fasern mit einem Durchmesser von 10 nm und bieten als Netzwerk eine mechanische Stabilität gegenüber Scherkräften, die auf eine Zelle einwirken können. Die häufig auch als Mikrofilamente bezeichneten Actinfilamente bilden die zweite Hauptgruppe der Filamenttypen. Der Filamentdurchmesser von 5 bis 9 nm ergibt sich aus dem Aufbau als doppelsträngiges helikales Polymer. Die Actinfilamentgebilde sind höchst flexibel und in der gesamten Zelle vertreten. Mikrotubuli sind lange röhrenartige Strukturen aus 13 Protofilamenten, die ihrerseits aus Tubulin-Heterodimeren (α und β) aufgebaut sind. Mit einem Durchmesser von 25 nm sind sie bedeutend größer und strukturell bedingt stabiler gegenüber invers orientierten Longitudinalkräften als die Actin- und Intermediärfilamente [2, 7].

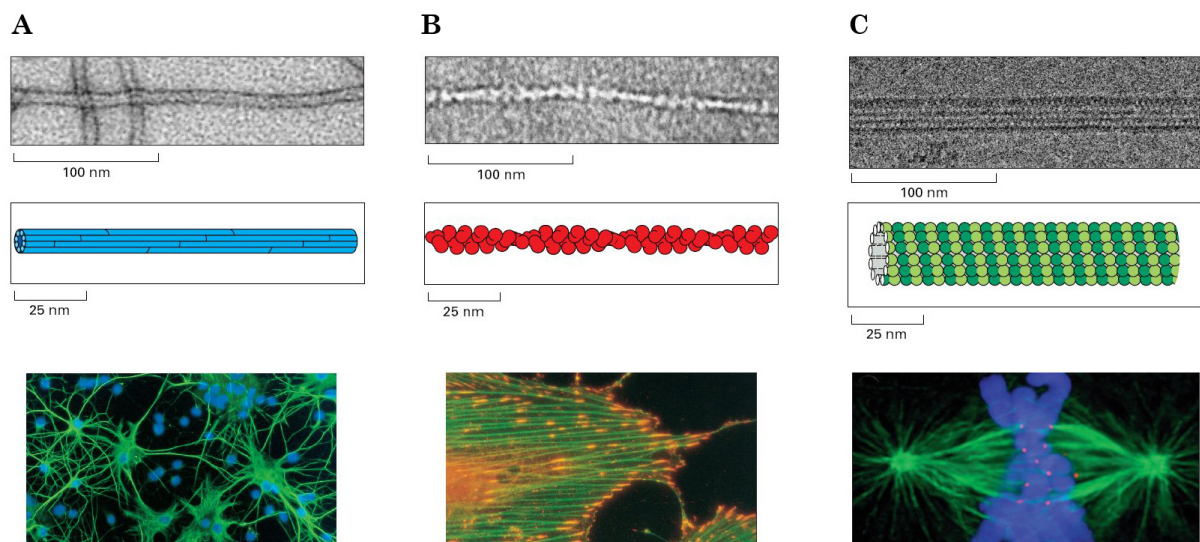


Abbildung 1.1: **Haupt-Filamenttypen des Cytoskeletts**

Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sowie ein Schema des jeweiligen Polymers in der Mitte. Die Filamentnetzwerke sind in den untenstehenden Abbildungen digital nachkoloriert. [4, 8]

A Intermediärfilamente **B** Actinfilamente **C** Mikrotubuli

Jedes Cytoskelettfilament ist als ein Polymer zu verstehen, dessen Polymerisation der einzelnen Monomere (bzw. Heterodimere) eine eigene Kinetik und Reaktionslaufzahl zeigt. Die Protofilamente werden wie die einzelnen Monomere durch schwache hydrophobe (nicht-kovalente) Wechselwirkungen zusammengehalten. Jedes Filament ist für sich alleine gesehen thermodynamisch höchst instabil. Die Zusammenlagerungsmuster und Stabilität der einzelnen Filamente sind letztlich durch die strukturellen Gegebenheiten der Monomere determiniert. So werden Intermediärfilamente überwiegend durch starke seitliche Bindungskräfte zwischen den linearen Monomeren stabilisiert. Dies beschreibt auch ihre höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber Torsionskräften. Mikrotubuli hingegen sind aus globulären α - und β -Tubulin-Monomeren aufgebaut, die im Verhältnis stärkere attraktive Kräfte innerhalb des Filaments und schwächere laterale Bindungskräfte zwischen den 13 Protofilamenten aufweisen. Daher brechen Mikrotubuli schon bei geringeren Torsionskräften als Intermediärfilamente [4].

Das aus den Einzelkomponenten der Proteinfilamente gebildete Netzwerk ermöglicht es eukaryotischen Zellen, durch die Kontrolle des dynamischen Verhaltens eine enorme Vielfalt an verschiedenen Strukturen zu bilden und so auf exo- und endogene Einflüsse zu reagieren. Eine besondere Rolle spielen hierbei die Mikrotubuli [2].

1.2.1 Mikrotubuli

Die von *Ledbetter et al.* [9] erstmals im kortikalen Cytoplasma charakterisierten Mikrotubuli nehmen Anteil an den zentralen Prozessen einer Pflanze [2]. Auch dieser Bestandteil des Cytoskeletts ist hoch konserviert, so können auch Homologe in prokaryotischen Organismen dokumentiert werden. Das bakterielle Tubulin-Homolog wird *FtsZ* genannt und gilt als Vorläufer aller bekannten Tubuline [10, 11]. Der alternierende Aufbau der linearen Protofilamente aus den strukturell nah verwandten α - und β -Tubulin-Monomeren erfolgt nicht durch Anlagerung der einzelnen Monomere. Die α - und β -Tubulin-Monomere lagern sich zuerst zu Heterodimeren zusammen, bevor sie in die Protofilamentassemblierung eintreten [7].

Das Mikrotubulus-Assemblierungsmuster zeigt eine leichte Parallelverschiebung der Heterodimere, woraus eine spiralförmige Anordnung der Dimere resultiert. Eine weitere Folge des Aufbauschemas ist, dass eine α -Tubulin-Untereinheit am Minus-Ende und eine β -Tubulin-Untereinheit am Plus-Ende frei zugänglich ist (Abbildung 1.2).

Mikrotubuli zeigen neben dieser strukturellen noch eine funktionelle Polarität, resultierend aus der GTP-Hydrolyse und GTP/GDP-Substitution der β -Tubulin-Untereinheit [2]. Wie bereits dargelegt ist die α -Tubulin-Untereinheit aufgrund von stereochemischen Bedingungen im Proteinkomplex hierzu nicht im Stande [4].

Zur Assemblierung sind GTP-aktivierte α - β -Tubulin Heterodimere erforderlich. Die Umsetzung von freiem GTP zu GDP ist unter physiologischen Bedingungen auf Grund der thermodynamischen Instabilität mit $\Delta_R G^\oplus = -48,1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ begünstigt [12]. Dieser thermodynamische Umstand erfordert eine verhältnismäßig hohe verfügbare Konzentration an GTP um ein Wachstum am sogenannten Plus-Ende (mit der GTP-Kappe) des Mikrotubulus zu ermöglichen. Die GTP-Kappe übt eine stabilisierende Wirkung auf den Mikrotubulus aus, wohingegen eine hohe GDP-Konzentration eine destabilisierende Wirkung ausübt und im Falle eines zufälligen Verlustes der GTP-Kappe den Mikrotubulus-Abbau vorantreibt [2]. Dieser destabilisierende Effekt ist durch eine GTP-Hydrolyse bedingte Konformationsänderung zu erklären [13].

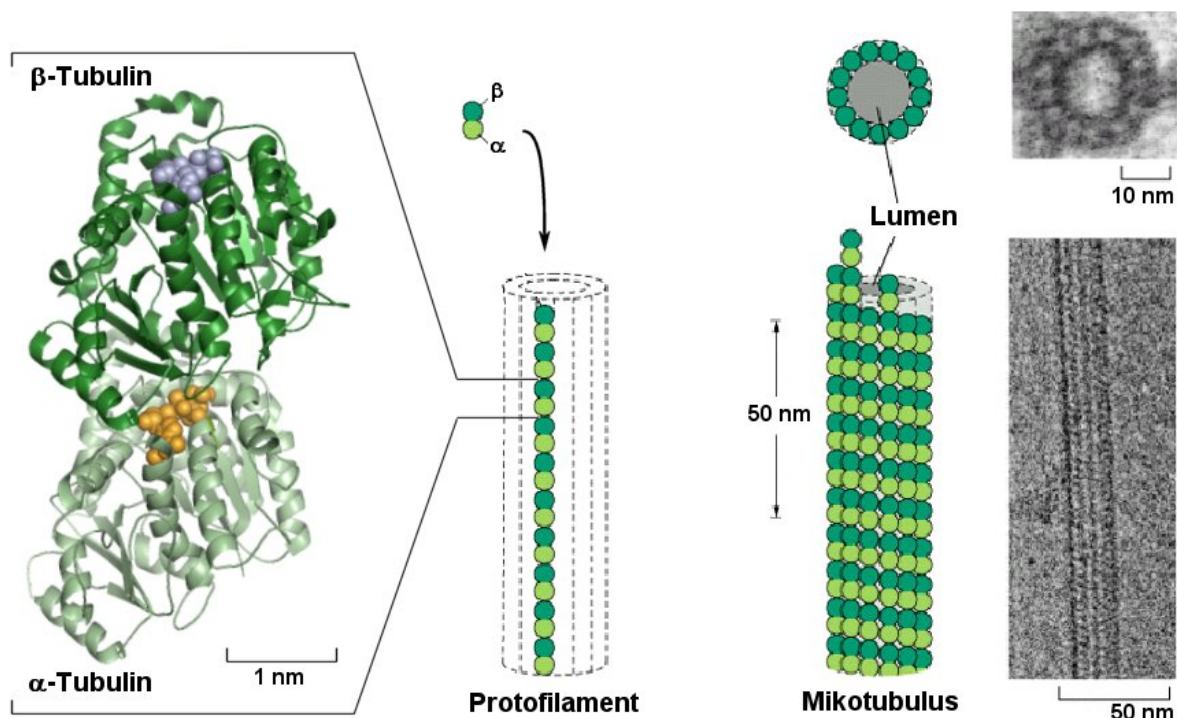


Abbildung 1.2: **Struktur eines Mikrotubulus und seiner Untereinheiten**

Die Heterodimer-Untereinheit (bestehend aus α - und β -Tubulin) enthält zwei Nukleotid-Bindestellen (sphärische Darstellung). Die Nukleotid-Bindestelle des α -Tubulins (orange) ist physikalisch fest in der Dimerengrenzfläche eingebunden und mit einem GTP-Molekül belegt, was im Dimeren- oder Polymerenzustand nicht ausgetauscht oder hydrolysiert wird. Die Nukleotidbindestelle des β -Tubulins (blau) kann mit einem GTP oder GDP belegt sein. Diese Tatsache hat einen entscheidenden Einfluss auf die Dynamik des gesamten Mikrotubulus. Bei der Darstellung des dreidimensionalen Modells der Tubulin-Untereinheiten wurden die Daten der verfeinerten Röntgenstrukturanalysen von Lowe [14] verwendet (Abbildung 1.2). Auf eine Darstellung des zur Stabilisierung enthaltenen Taxol und Magnesiumions wurde verzichtet. Zur *in silico* Berechnung der Strukturelemente wurde die Software PyMOL 0.99 (2006) von DeLano Scientific LLC in Verbindung mit dem HyperChem 7.5 Molecular Modelling System (2002) von Hypercube Inc. eingesetzt. [4, 8, 14]

Eine endständige GDP-Kappe bedingt eine 100fach höhere Depolymerisation im Gegensatz zu einer vorhandenen GTP-Kappe. Es sei jedoch angemerkt, dass die Keimbildung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Polymerisation eines Cytoskelettfilaments ist [4, 15].

Die Abbau- bzw. Aufbaureaktion ist durch die unterschiedliche freie Enthalpie und die Verfügbarkeit an GTP-aktivierten Heterodimeren reguliert [16]. Als ein Tretmühlen-Verhalten bei mittleren Konzentrationen der freien Untereinheiten wird das gleichzeitig stattfindende Wachstum am Plus-Ende und dem Schrumpfen am Minus-Ende bezeichnet [4]. Rasche Wechsel im GTP/GDP-Konzentrationsgefüge führen zu der als „Katastrophe“ bzw. „Rettung“ bezeichneten Abbau- bzw. Aufbaureaktion des Mikrotubulus. Diese Prozesse sind unter dem Begriff der dynamischen Instabilität zusammengefasst und sind auch bei Actinfilamenten zu beobachten. Es wird aber vermutet, dass in Zellen die dynamische Instabilität bei Mikrotubuli und das Tretmühlen-Verhalten bei Actinfilamenten vorherrscht [4].

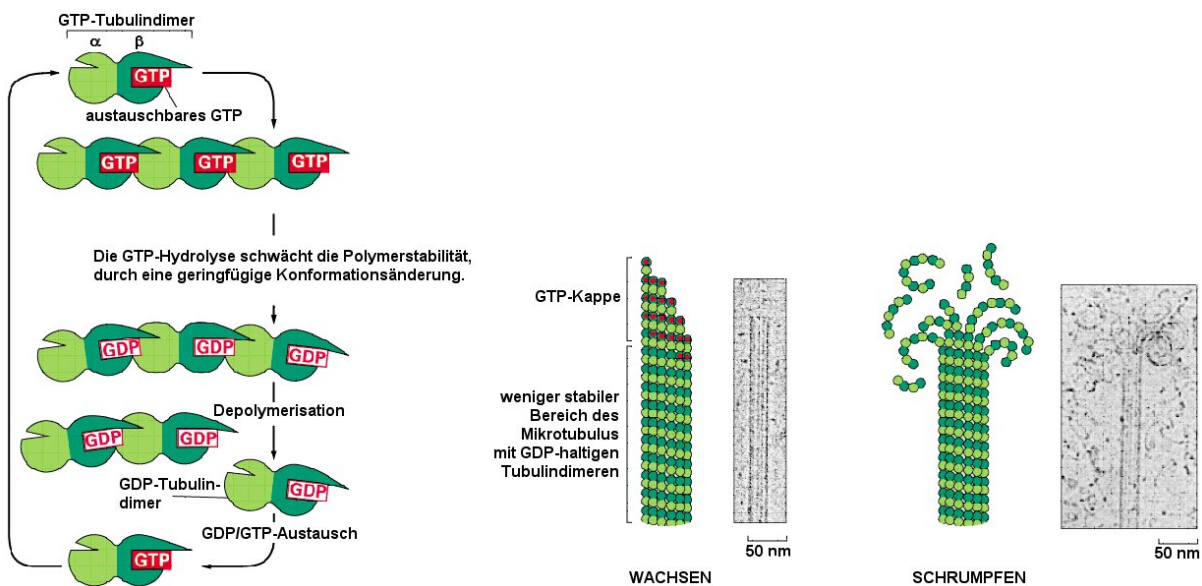


Abbildung 1.3: **Dynamische Instabilität eines Mikrotubulus**

A Schematische Darstellung des strukturellen Einflusses der GTP-Hydrolyse auf die Mikrotubulus-Matrix. Die GTP-Hydrolyse bedingt eine noch nicht näher aufgeklärte Konformationsänderung innerhalb des Protofilaments, was eine destabilisierende Wirkung auf den gesamten Mikrotubulus ausübt.

B In einem mit einer GTP-Kappe versehenen Mikrotubulus werden die GDP-haltigen Proteinfilamente in gestreckter Form gehalten. Geht die GTP-Kappe verloren, so führt dies zu einer fortschreitenden Auflösung des Mikrotubulus. [4, 8, 17]

Der damit einhergehende Energieverbrauch wäre höchst kritisch. So ist jedoch der Zelle die Möglichkeit zur Regulation der Keimbildung und -stabilisierung gegeben. Die regulierbare Keimstabilisierung bedingt auch eine Kontrolle des Filamentmetabolismus [2, 4].

So fungieren Mikrotubuli aufgrund ihrer hochgradig regulierten Dynamik und strukturellen Polarität für zahlreiche intrazelluläre Vorgänge als Basisgerüst. Zum Beispiel ist die Orientierung und Regulation der Zellelongation bei Pflanzen durch das kortikale Mikrotubulinetzwerk determiniert [18]. Auch ist dem kortikalen Mikrotubulinetzwerk durch die räumliche Nähe zur Plasmamembran eine mögliche Rolle bei der Signalperzeption und -transduktion zuzurechnen [19].

Während der Mitose zeigen die Mikrotubuli ebenfalls eine hohe Dynamik, was von entscheidender Bedeutung für die Abwicklung des gesamten pflanzlichen Zellteilungsprozesses und einer nachfolgenden Zelldifferenzierung ist (Abbildung 1.4).

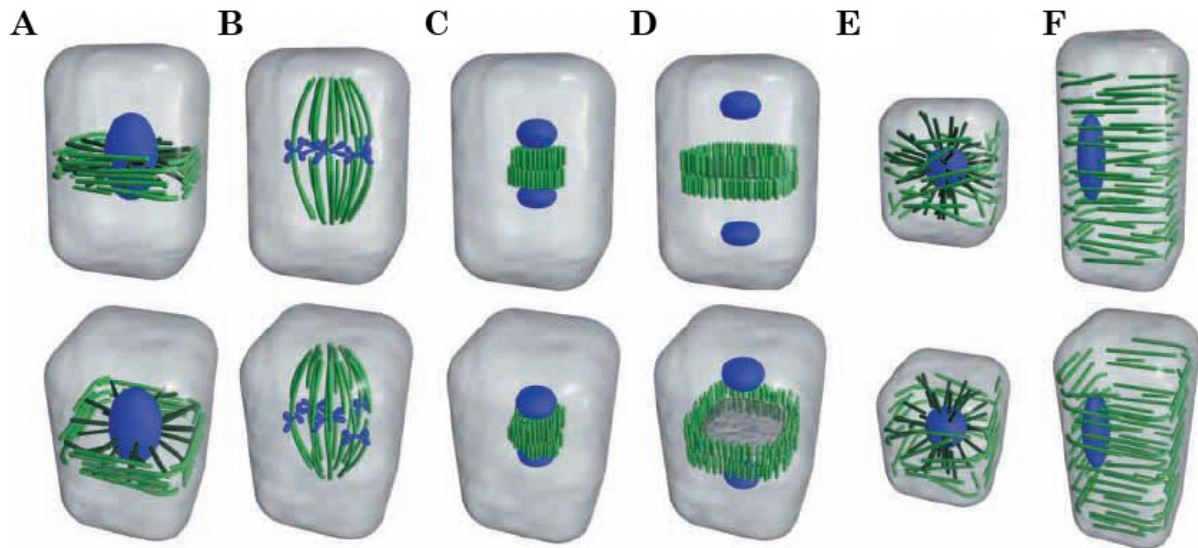


Abbildung 1.4: **Organisation der Mikrotubuli im Laufe des Zellzyklus bei höheren Pflanzen**

Zwei perspektivisch verschiedene dreidimensionale Ansichten einer Zelle. Der Zellkern ist blau und die Mikrotubuli grün koloriert. [8, 20]

A Festlegung der späteren Teilungsebene durch das Präprophaseband, welches durch phragmosomale Mikrotubuli mit dem Zellkern in Verbindung steht.

B Metaphasische bipolare Mitosespindel aufgebaut aus Mikrotubuli.

C Ausbildung des zylindrischen Phragmoplasten in der Telophase zwischen den identischen Tochterzellen.

D Zentrifugale Ausdehnung des zytokinetischen Phragmoplasten.

E Am Ende der Zytokinese verteilen sich die Mikrotubuli vom Zellkern ausgehend hin zur Plasmamembran.

F In der Interphase determinieren die kortikalen Mikrotubuli die Achsen der Zellelongation.

1.2.1.1 Mikrotubuli organisierende Zentren

In vielen Organismen entspringen die Mikrotubuli aus definierten morphologischen Strukturen, die 1969 erstmals von *Pickett-Heaps* [21] beschrieben und als Mikrotubuli organisierende Zentren (MTOC) bezeichnet wurden. In den meisten tierischen Zellen ist die Existenz eines einzelnen MTOCs lokalisierbar. Das so genannte Centrosom mit den Centriolen stellt hierbei den Ausgangspunkt für das Mikrotubuliwachstum dar, ausgehend vom Minus-Pol wächst der Plus-Pol des Mikrotubulus zur Zellwand hin. Bei Einzellern sind das die Basalkörper der Geißeln [4]. Im Pflanzenreich treten Centriolen nur bei einigen Algenfamilien und Gymnospermen auf. In Ermangelung des Auftretens von distinkten Mikrotubuli organisierenden Zentren werden viele Modelle zur Beschreibung des Mikrotubuliwachstums diskutiert. So ist bei höheren Pflanzen ein diffuses Auftreten dieser Keimbildungsstellen im kortikalen Bereich des Cytoplasma sowie des an die Kernhülle angrenzenden Cytoplasmas zu dokumentieren. Auch reagieren sie auf durch den Zellzyklus hervorgerufene Effekte mit einer definierten Dynamik [22].

Durch den Nachweis distinkter Bindungsstellen an der Plasmamembran bestätigen sich Vermutungen zu den kortikalen Ursprüngen der Mikrotubuli [23]. Die ebenfalls von *Drykova et al.* [24] vertretene Ansicht, dass integrale Membranbestandteile die Mikrotubuliorganisation regulieren, wird durch Ergebnisse von *Binarova et al.* [25] mitgetragen.

Eine Diskussion der Mikrotubuli-Selbstorganisation wurde durch *Heald et al.* [26] angestoßen. Die hierfür vermutlich mitverantwortlichen Mikrotubuli assoziierten Motorproteine wurden durch *Wasteney et al.* [20] ausführlich beschrieben. In diesem Zusammenhang wird auch ein Modell zur Genese und Translokation des Mikrotubuliinitiationskomplexes vorgestellt, auf das an anderer Stelle noch eingegangen werden soll. Getragen wird diese Modellvorstellung durch die Dokumentation einer Notwendigkeit bereits vorhandener an γ -Tubulin-bindender, kortikaler Mikrotubuli [27]. Nach der Modellvorstellung sind die „neuen“ Mikrotubuli als „Seitensprossen“ zu verstehen, an deren Gabelung γ -Tubulin lokalisiert ist. Hieraus ergibt sich eine notwendige Beweglichkeit des γ -Tubulins in Form eines großen Multiproteinkomplexes, auf den in der Folge noch eingegangen werden soll. In der Summe vereinigt dieses Modell die aus bisherigen Ergebnissen vermutete gemeinsame Beteiligung von Motorproteinen und strukturellen mikrotubuliassozierten Proteinen an der Mikrotubuliorganisation [22]. Unbestritten ist die Notwendigkeit des in einer Ringkomplexartigenstruktur vorliegenden γ -Tubulins. Dieser sogenannte γ -Tubulin-Ringkomplex (gTuRC) ist ein hochkonservierter Multiproteinkomplex, welchem nach bisherigen Ergebnissen und Vermutungen bei der Nukleation und Assemblierung eine entscheidende Rolle zukommt.

1.2.2 γ -Tubulin

Das im Zuge genetischer Untersuchungen zur Identifikation von Interaktionspartnern von β -Tubulin des filamentösen Pilzes *Aspergillus nidulans* entdeckte *mipA*-Gen wurde als γ -Tubulin bezeichnet und in die erweiterte Tubulin-Superfamilie aufgenommen [28, 29]. Nachfolgend wurde es in einer Vielzahl eukaryotischer Organismen dokumentiert [30] und scheint voraussichtlich in allen eukaryotischen Organismen aufzutreten.

Sequenzidentitätsvergleiche zeigten, dass sich die γ -Tubulin-Sequenz von den α - und β -Tubulin-Sequenzen unterscheidet. Generell zeigt jedes Tubulin (α -, β - und γ -Tubulin) eine Sequenzidentität von circa 30 % zu den beiden anderen Tubulinen. Als Folge hieraus handelt es sich bei γ -Tubulin nicht um eine Isoform einer der beiden anderen Tubuline, sondern um ein eigenständiges Mitglied der erweiterten Tubulin-Superfamilie [29]. Die pflanzliche γ -Tubulin-Superfamilie umfasst mehrere γ -Tubulin-Gene. So sind in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) fünf γ -Tubulin-Gene dokumentiert, von denen nur zwei transkribiert werden [31]. Die drei verbleibenden als Pseudogene zu bezeichnen wäre überstürzt, dennoch deuten bisherige Ergebnisse hierauf hin.

1.2.2.1 Lokalisierung und Funktion

Tatsächlich wurden von *Stoppin-Mellet et al.* [32] zwei unterschiedlich große γ -Tubulin-Multi-protein-Komplexe (0,75 und 1,5 MDa) dokumentiert, die sich auch hinsichtlich ihrer Eigenschaften stark unterscheiden. So interagiert solvatisiertes γ -Tubulin mit den α -, β -Tubulin-Heterodimeren [24], wohingegen γ -Tubulin-Multikomplexe häufig im äußeren Membranbereich lokalisiert sind. Vermutlich liegt bei tierischen Zellen ein großer Anteil des γ -Tubulins solvatisiert im Cytosol vor. Komplextiertes γ -Tubulin tritt mengenmäßig am häufigsten als gTuRC auf. Ein Centrosom enthält mehr als 50 γ -Tubulin-Makromolekülverbände, so tritt γ -Tubulin auch zum geringen Teil an den TCP-1-Komplex gebunden auf [29].

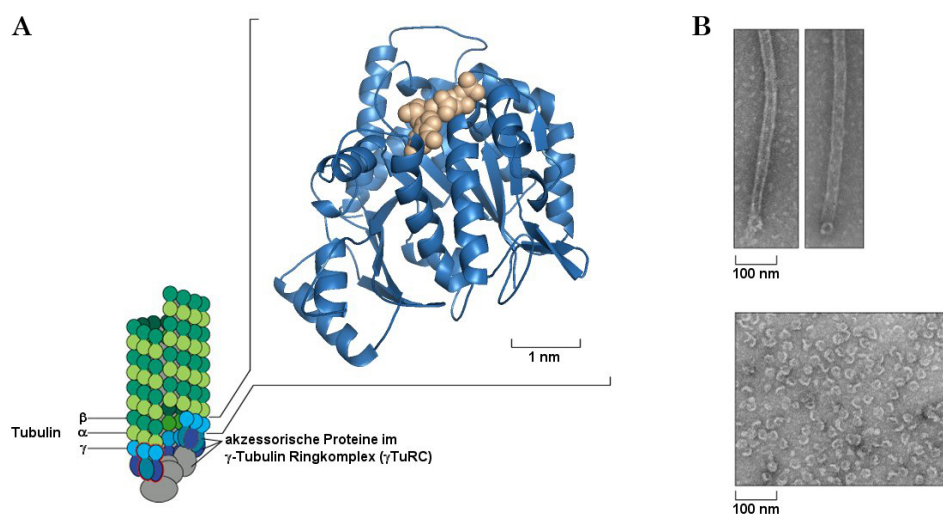


Abbildung 1.5: **Tubulinpolymerisation ausgehend vom γ -Tubulin-Ringkomplex**

A Aufbauschema des gTuRC zum Mikrotubulus-Wachstum. Die zwei rot hervorgehobenen γ -Tubulin-Dimere konnten bereits isoliert werden, weitere gTuRC-Interaktionspartner (grau) wurden bisher noch nicht charakterisiert. Zur Erstellung des dreidimensionalen Strukturmodells wurden im Zuge der eigenen Arbeit die röntgenkristallstrukturanalytischen Daten des humanen γ -Tubulins von *Aldaz et al.* [33] herangezogen (Abbildung 1.5). Zur Strukturvorhersage wurde die Aminosäuresequenz von γ -Tubulin aus *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*) an der menschlichen Aminosäuresequenz mit Hilfe des von *Edgar* [34] entwickelten Algorithmus MUSCLE 3.6 ausgerichtet. Dieses Alignment wurde zur kooperativen Proteinstrukturmodellierung mittels der Software Modeller 9.1 [35] eingesetzt. Die dreidimensionale Darstellung erfolgte durch PyMOL 0.99 (2006) in Verbindung mit Chem3D Ultra 9.0 (2005) und Discovery Studio 1.6 (2006). Das enthaltene GTP ist beige koloriert. Auf die Darstellung des enthaltenen Magnesiums wurde verzichtet.

B Eine Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des gereinigten gTuRC (unten) und eines vom gTuRC ausgehenden, gereinigten Mikrotubulus (oben). [4, 8, 33]

Der Nachweis der Beteiligung von γ -Tubulin an der Mikrotubuliorganisation erfolgte zuerst molekularbiologisch [36], bevor immunochemische Untersuchungen diese bestätigten [37]. Als gesichert gilt die Beteiligung des γ -Tubulin am γ -Tubulin-Ringkomplex und der Ausbildung der Mitosespindeln. Dies wird durch die Ergebnisse von *Oakley* [38] untermauert, da eine Mutation im γ -Tubulin-Gen von *Aspergillus nidulans* die Assemblierung der Mitosespindel unterbindet mit letalen Auswirkungen für die Zelle.

1.2.2.3 Pflanzenspezifische γ -Tubulin-Proteindomänen

Bei strukturellen Untersuchungen wurden von *Burns et al.* [43] zwei bemerkenswerte Peptidbereiche dokumentiert, die als γ -A-Peptid und γ -B-Peptid bezeichnet wurden. Bei Studien in der Arbeitsgruppe wurde eine starke Konservierung dieser Sequenzbereiche innerhalb der Streptophytenlinie beobachtet [44]. Diese beiden, zusammen am C-Terminus gelegenen, pflanzenspezifischen Domänen könnten potentielle Interaktionen mit anderen Proteinen vermitteln und bieten sich auch als Epitop für einen pflanzenspezifischen γ -Tubulin-Antikörper an. Immunochemische Untersuchungen dieser Bereiche lieferten keine eindeutigen Ergebnisse [45], sodass ein γ -Tubulin-Antikörper gegen eine als *Joshi*-Domäne [37] bezeichnete Peptid-Sequenz entwickelt und eingesetzt wurde. Dieser Sequenzbereich, nahe des N-Terminus (Aminosäure 38-53), zeigte für alle untersuchten phylogenetischen Gruppen einen hohen Grad an Konservierung. Somit ist dieser Bereich für Studien zu pflanzenspezifischen Interaktionspartnern uninteressant, aber für die Herstellung eines Antikörpers aufgrund seiner Aminosäurekomposition geeignet. In wie weit die pflanzenspezifischen Domänen entscheidenden Einfluss auf die Tertiärstruktur nehmen und an potentiellen Interaktionen beteiligt sind, ist unklar. Hierfür ist es notwendig, das Protein in verhältnismäßig größeren Mengen für biochemische Analysen zur Verfügung zu haben.

1.3 Proteinexpression

Zur Translation einer Nukleinsäuresequenz besteht die Möglichkeit einer *in vivo* oder *in vitro* Strategie. Zellfreie *in vitro*-Translationssysteme basieren auf nukleinsäurefreien Zellextrakten bzw. -lysaten. Zu nennen wären hier das Kaninchen-Reticulozyten-Lysat und der Weizenkeimling-Extrakt von Promega. Bei der *in vivo*-Expression in Zellen sind die Freiheitsgrade der Systeme bedeutend größer, erfordern aber auch einen Zellaufschluss zur Proteinisolation.

1.3.1 Zellbasierte Systeme

Nachteilig ist der relativ hohe Eigenproteinanteil von *in vivo*-Expressionssystemen mit circa 20 – 80% [7]. Dieser Aspekt kann die Darstellung des Zielproteins als ein Tag modifiziertes Fusionsprotein erfordern, was bei *in vitro*-Systemen nicht unbedingt erforderlich ist und so je nach Fragestellung den Kostenvorteil der *in vivo*-Systeme wieder aufheben kann.

1.3.1.1 Bakterielle Systeme

Neben *Bacillus subtilis* und *Corynebacterium* ist *Escherichia coli* (*E. coli*) ein verbreitetes bakterielles Expressionssystem zur intra- und extrazellulären Proteinexpression. Üblicherweise wird die zu exprimierende kodierende Sequenz (CDS) in Form eines high-copy Plasmids in die Zel-

le eingebracht. Bakterielle Systeme zeichnen sich durch einfache Handhabung, frei skalierbare Ansatzgrößen und einer daraus resultierenden günstigen Kosten/Nutzeneffizienz aus. Besonders für strukturbiochemische Untersuchungen benötigt man größere Proteinmengen, aus diesem Grund finden bakterielle Systeme häufig Verwendung. Bakterielle Systeme verfügen nicht über eine den Eukaryoten gleichwertige Ausstattung an Chaperonen, was bei der Expression eukaryotischer Proteine zur Präzipitation der Peptide führen kann [46]. Die Co-Expression bakterienendogener Proteine (wie z. B. Proteindisulfid-Isomerase A) kann bei der Expression löslicher Proteine von Nutzen sein [47] und werden auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung finden.

1.3.1.2 Hefe Systeme

Für die rekombinante Proteinexpression in Hefe sind *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) und *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) etablierte Systeme. Methylotrrophe Hefesysteme (wie z. B. *Pichia pastoris*) liefern verhältnismäßig hohe Proteinausbeuten im Bereich von 1 bis 12.000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Auch sind bereits etablierte Hefeexpressionsvektoren verfügbar, die hochgradig regulierte RNA-Polymerase-Promotoren nutzen [48, 49]. *S. cerevisiae* und *K. lactis* sind aufgrund der lizenzrechtlichen Situation von *Pichia pastoris* weiter verbreitet, liefern vergleichbare Ausbeuten [50] und bieten den Vorteil einer verhältnismäßig unkomplizierten Proteinsegregation [51]. Auch wurden bereits pflanzliche Tubuline erfolgreich in Hefen exprimiert [52, 53]. Das *K. lactis*-System ist etabliert und auch für Membran-Proteine geeignet, deren Expression bzw. Faltung häufig sehr problematisch ist [54–57].

1.3.1.3 Pflanzliche Systeme

Eine Expression von Proteinen in pflanzlichen Zellen ist sowohl mit Vor- als auch mit Nachteilen verbunden. Die Kosteneffizienz, Verfügbarkeit komplexerer Faltungsmaschinen und einfache Skalierbarkeit sind die stärksten Vorteile pflanzlicher Systeme. Dem gegenüber steht die pflanzentypische Zellwand, die einen Aufschluss unter nativen Bedingungen im Vergleich zu tierischen Zellen deutlich erschwert, und die verhältnismäßig lange Dauer bei der Etablierung transgener Linien. Typische Ausbeuten liegen im Bereich von 0,02 - 0,2% der Trockenzellmasse [58]. Vorwiegend finden transgene Pflanzen Verwendung in den Bereichen Cropscience und Impfstoffproduktion und der Expression von Proteinen mit komplexer Tertiärstruktur [58–60].

Es kann sowohl eine stabile Zell- und Pflanzenlinie [61–63] etabliert, als auch nur eine nicht stabile, transiente Transfektion [64, 65] durchgeführt werden. Die Transfektion ist mittels *Agrobacterium tumefaciens* und der sogenannten Genkanone möglich, jedoch ist die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transfektion technisch einfacher und bedeutend kosteneffizienter.

1.3.2 Zellfreie Systeme

Die zu translatierende Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird je nach *in vitro*-System linear oder zirkulär dargeboten. Essentiell ist für die Translation ein am 5'-Ende lokalisierter Promotor, an dem eine Ribonukleinsäure (RNA)-Polymerase anbinden kann. Als Promotor ist der T7-, gegenüber den T3- und SP6- Promotoren, der am häufigsten verwendete. Dies ist durch die Expressionsstärke begründet. Handelsübliche Systeme (wie z. B. das Kaninchen-Reticulozyten-Lysat oder das Weizenkeimling-Extrakt von Promega) liefern Zielproteinausbeuten im Bereich von 2,0 bis 4,0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, bei verhältnismäßig hohen Kosten. Proteine, die posttranslationelle Modifikationen erfordern, sind durch die Kombination der oben genannten Systeme mit mikrosomalen Membran-Isolaten darstellbar. Die Erweiterung der CDS um eine Tag-Sequenz zur Purifikation ist bei zellfreien Systemen nicht zwingend notwendig, kann jedoch die Purifikation erleichtern [58].

1.3.3 Proteinpurifikation

Die Gewinnung von gelöstem, aktiven Protein stellt eine der größten Herausforderungen an die Methode der Proteinisolation und -purifikation dar. Zur Isolation und Purifikation großer Mengen rekombinanten Proteins bietet sich ein Protein-Tag-vermitteltes Chromatographieverfahren an. Die Modifikation der cDNA-Sequenz um eine N- oder C-terminale als Tag bezeichnete Sequenz erfolgt auf molekulargenetischer Ebene [66]. Bei der Auswahl des Tags sind Kriterien wie die Matrixspezifität und -affinität sowie die Größe des Tags zu beachten. Die Größe des Tags kann einen störenden Einfluss auf die Konformation des Zielproteins ausüben, was bei der Gewinnung möglichst nativen Proteins berücksichtigt werden sollte.

Die gebräuchlichste Purifikationstechnik ist die von *Porath et al.* [67] erstmals beschriebene Immobilisierte Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie (IMAC). Die Wechselwirkungen zwischen den immobilisierten Übergangsmetallkationen (wie z. B. Ni^{2+} , Co^{2+}) und den spezifischen Aminosäureketten bewirken eine Bindung der Proteine an die Matrix. Der Imidazolring der Histidinseitenkette zeigt die stärksten koordinativen Wechselwirkungen. Hieraus begründet sich die Verwendung von Histidin als Tag und Imidazol als Elutionsmittel.

Für Studien zu Interaktionspartnern hat sich die Technik der Tandempurifikation weitgehend durchgesetzt [68]. Hierbei wird die Zielproteinsequenz um zwei Affinitätstags zur Purifikation erweitert, die entweder über ein geringes Molekulargewicht (wie der His₆-tag mit circa 0,8 kDa) oder im Falle größerer Molekulargewichte (wie der GST-Tag mit circa 26 kDa) über eine Proteaseerkennungssequenz zur Entfernung verfügen.

1.3.4 Posttranscriptional Gene Silencing

Beim Posttranscriptional Gene Silencing (PTGS) in Pflanzen handelt es sich um einen RNA-Degradationsmechanismus, der große Ähnlichkeiten mit der Ribonukleinsäure-Interferenz (RNAi) in tierischen Zellen aufweist. So ist in beiden Prozessen eine doppelsträngige RNA, diverse RNA-Polymerasen und -Helicasen sowie Proteine mit PAZ- und PiWi-Domänen involviert. So unterscheidet sich PTGS von der RNAi bzgl. der pflanzenspezifischen Gene *SGS3* und *MET1*, welche in *Caenorhabditis elegans* nicht vorhanden sind und bei der RNAi nicht vorkommen. Auch zeigten alle bisher untersuchten *A. thaliana* Mutanten mit verminderter PTGS-Aktivität eine stark erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem Cucumber Mosaic Cucumovirus (CMV). Dies lässt auf eine Partizipation des PTGS-Mechanismus bei der Pathogenabwehr schließen [69]. Viele Viren, wie z. B. das Tomatenzwergbusch-Virus (TBSV), haben Strategien zur Umgehung dieses Abwehrmechanismus entwickelt. So wurde, neben vielen anderen Proteinen das Protein *p19* als starker PTGS-Suppressor identifiziert [70, 71]. Eine technische Anwendung findet dieses Suppressor-Protein vor allem bei der *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) vermittelten transienten Expression. Die Co-Expression solch viral-kodierter PTGS-Suppressorproteine ermöglicht Steigerungsraten bei der Expression des Zielproteins von bis zu 5000% [70]. Die Steigerung der Ausbeute hängt jedoch auch sehr stark von dem zu exprimierenden Protein ab und generelle Aussagen sind schwer zu treffen [72]. So spielen vermutlich auch die Anzuchtbedingungen (wie z. B. Licht) eine Rolle bei der RNA-Degradation [73].

1.3.5 Posttranslational Modifications

Die als Posttranslational Modifications (PTMs) bezeichneten Protein-Veränderungen nehmen auf die Proteinstruktur, -aktivität sowie -stabilität und so in vielen regulatorischen Prozessen entscheidenden Einfluss. In pflanzlichen Zellen wären als Modifikationen vor allem Redox gesteuerte (wie S-Nitrosylation, S-Glutathionylation, etc.), Glykosilierungen, Ubiquitinylierung und Phosphorylierung zu nennen, da dies die häufigsten Modifikationen sind. Die reversible Protein-Phosphorylierung ist einer der Hauptregulationsmechanismen und betrifft neben dem Zellzyklus auch den Metabolismus, Hormonhaushalt, Zellentwicklung und Zytokinese. So verfügt *Arabidopsis thaliana* über 1100 Protein Kinasen, wo hingegen im menschlichen Genom nur circa 500 Kinase-Gene enthalten sind. Wie bereits gezeigt spielt der Protein-Phosphorylierung bei der Regulation der Mikrotubuli eine essentielle Rolle.

Die Regulation zellulärer Prozesse erfolgt jedoch nicht nur durch Modulation der Aktivität regulatorischer Proteine, sondern auch durch eine kontrollierte Proteindegradation [74]. Ein zentrales proteolytisches System in eukaryotischen Zellen ist der Multiproteinkomplex des 26S-Proteasoms. Dieser Multiproteinkomplex ist nicht nur in die Degradation fehlgefalteter oder beschädigter Proteine involviert, sondern auch in die kontrollierte Degradation regulatorischer Proteine. Zur regulierten Degradation wird das Zielprotein am C-Terminus um eine 76 Aminosäure lange Ubiquitin-Sequenz erweitert, was das Zielprotein dem Proteasom zuführt.

Material und Methoden

2.1.	Zell- und Pflanzenkultivierung sowie Gentransfer	18
2.1.1.	Steriles Arbeiten und Sterilisation von Labormaterialien	18
2.1.2.	Vektorsysteme und Selektionsfaktoren	18
2.1.3.	Bakterienkultivierung	20
2.1.3.1.	Bakterienstämme	20
2.1.3.2.	Anzucht und Nährmedien	21
2.1.3.3.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	21
2.1.3.4.	Hitzeschock vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	22
2.1.3.5.	Blau-Weiss Selektion des pGEM-T-Vektorsystems	22
2.1.3.6.	Lethalfaktor Selektion des pJET1.2/blunt-Vektorsystems	23
2.1.3.7.	Chloramphenicol Selektion pflanzenspezifischer Vektorsysteme	23
2.1.3.8.	Präparation und Transformation kompetenter <i>A. tumefaciens</i>	23
2.1.4.	Hefekultivierung	24
2.1.4.1.	Anzucht und Nährmedien	24
2.1.4.2.	Transformation und Selektion transgener <i>K. lactis</i>	24
2.1.5.	Pflanzenkultivierung	26
2.1.5.1.	Anzucht in Sterilkultur	26
2.1.5.2.	Pflanzenkultivierung auf unsterilen Substraten	28
2.1.5.3.	<i>Arabidopsis thaliana</i> in <i>Planta</i> Transfektion	29
2.1.5.4.	Transiente <i>A. thaliana</i> -Transfektion	30
2.1.5.5.	Transiente <i>N. benthamiana</i> -Transfektion	30
2.2.	Molekulargenetik	31
2.2.1.	Nukleinsäure-Isolation	31
2.2.1.1.	RNA-Isolation	31
2.2.1.2.	DNA-Isolation	32
2.2.1.3.	Plasmidextraktion aus Bakterien	33
2.2.2.	Nukleinsäureanalytik	35
2.2.2.1.	Photometrische Nukleinsäure-Quantifizierung	35
2.2.2.2.	Gelelektrophorese	35
2.2.2.3.	Didesoxy-Sequenzanalyse nach Sanger	38
2.2.3.	Nukleinsäurereaktionen	39
2.2.3.1.	Reverse Transkriptase-PCR	39
2.2.3.2.	Polymerase Kettenreaktion	40
2.2.3.3.	Quantitative Real-Time-PCR	41
2.2.3.4.	Oligonukleotid-Primer	41
2.2.3.5.	Restriktion	45
2.2.3.6.	Ligation	46
2.3.	Proteinbiochemie	47
2.3.1.	Induktion einer heterologen Expression	47
2.3.1.1.	IPTG vermittelte Aktivierung	47
2.3.1.2.	17 β -Estradiol vermittelte Aktivierung	48
2.3.2.	Proteinisolation	49
2.3.2.1.	Denaturierende Proteinisolation	49
2.3.2.2.	Native Proteinisolation aus <i>E. coli</i>	49
2.3.2.3.	Native Proteinextraktion aus pflanzlichen Geweben	50
2.3.3.	Proteincharakterisierung und -nachweis	50
2.3.3.1.	Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung	50
2.3.3.2.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
2.3.3.3.	Western Blot	56
2.3.3.4.	ELISA	59
2.3.4.	Proteinpurifikation	61
2.3.4.1.	Affinitäts-Chromatographie	61
2.3.4.2.	Gelfiltration	62
2.3.4.3.	Ultrafiltration	64
2.3.5.	Proteinidentifikation	64
2.3.5.1.	Trypsin-Verdau	64
2.3.5.2.	MALDI-Massenspektrometrie	67
2.3.5.3.	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	68
2.4.	Bioinformatik	70
2.4.1.	Software	70

2.1 Zell- und Pflanzenkultivierung sowie Gentransfer

2.1.1 Steriles Arbeiten und Sterilisation von Labormaterialien

Alle zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen zur Vermeidung von Kontaminationen. Hierzu wurden die Arbeiten (z. B. An- und Überimpfen von Kulturen) unter einer Laminar Air-Flow Sterilbank durchgeführt. Lösungen, Medien sowie hitzestabile Materialien wurden autoklaviert. Hitzesensitive Lösungen wurden durch eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- bzw. Celluloseacetat-Membran mit einer Porengröße von 0,22 μm sterilfiltriert. Hitzeunempfindliche Mehrwegglasgeräte wurden für ca. 3 Stunden bei 180 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) im Trockenschrank sterilisiert. Nach Versuchsende wurden alle mit gentechnisch veränderten Organismen kontaminierten Materialien, Geräte und Lösungen autoklaviert und sachgerecht entsorgt.

2.1.2 Vektorsysteme und Selektionsfaktoren

Es wurde eine Klonierungsstrategie mit der Verwendung von Restriktionsenzymen entwickelt entsprechend der technischen Möglichkeiten des Labors und der Vektoren. Eine Rekombinase basierte Klonierung wurde aufgrund der mangelnden Kosteneffizienz nicht in Betracht gezogen, obwohl die Rekombinase in Bezug auf die Transformations-Effizienz als deutlich überlegen einzustufen ist. Die gewählte Strategie erforderte (zum Teil) den Einsatz eines Subklonierungsvektors, um die γ -Tubulin-cDNA-Vollängensequenz in einen Expressionsvektor einzubringen. Dies war notwendig, da eine direkte Klonierung des modifizierten γ -Tubulin-cDNA-Vollängenamplifikats in einen Expressionsvektor nicht darstellbar ist. Alle verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.1 gezeigt. Die Lagerung der Plasmid erfolgte bei -80°C .

Tabelle 2.1: Plasmide

Zweck	Bezeichnung	Merkmale	Referenz
Subklonierung	pJET1.2/blunt	Amp ^R , linearisiert, stumpfe MCS Enden	[75]
	pGEM-T	Amp ^R , linearisiert, an beiden 3'-Enden ein Thymidin Überhang	[76]
<i>E. coli</i> Expression	pET-44a(+)	Amp ^R , P _{T7} ::MCS::His ₆	[77, 78]
	pETMM20	Kan ^R , P _{T7} :: $\left\{ \begin{array}{c} \text{TrxA} \\ \text{GST} \\ \text{MBP} \\ \text{DsbA} \\ \text{IIDsbA} \\ \text{DsbC} \\ \text{IIDsbC} \end{array} \right\}$::TEV::MCS	[79] [†]
	pETMM30		
	pETMM40		
	pETMM50		
	pETMM52		
	pETMM80		
<i>K. lactis</i> Expression	pKLAC1	Amp ^R , P _{LAC4} -PBI 3':: α -MF::MCS, Amd ^S	[56]
	pKLAC1-malE	Amp ^R , P _{LAC4} -PBI 3':: α -MF::MBP, Amd ^S	
Pflanzen Expression	pMDC7	Spc ^R , P _{GV10-90} ::XVE::P _{OLEX-46} ::MCS, Hyg ^R	[80, 81]
	pCATgfp	Amp ^R , P _{d35S} ::GFP	[82]
	pZPnpt	Spc ^R , MCS, Kan ^R	[83]

[†] Alle pETMM Vektoren entstammen dem pET-24d Vektor, und sind Modifikationen der pETM-Baureihe.

Alle verwendeten Vektoren enthielten mindestens ein Gen zur Selektion. Wenn möglich wurden Vektorkombinationen mit orthogonalen Resistenzgenen verwendet um Kreuzkontaminationen zu unterbinden. Die einzelnen Resistenzgene und deren Wirkungsweise sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Das *bla*-Gen (als Amp^R bezeichnet) kodiert für eine β -Lactamase. In wachsenden Bakterienzellen besteht ein Gleichgewicht zwischen der Wirkung von Enzymen, die das bestehende Mureinnetz spalten und Enzymen, die unter Einfügung neuer Mureinbausteine die entstandenen Spaltstellen wieder schließen. Die Hemmung des Mureineinbaus durch Ampicillin verschiebt das Gleichgewicht auf die Seite der spaltenden Enzyme und es erfolgt die für die Zelle tödliche Lyse. Entsprechend wirken β -Lactam-Antibiotika auf nicht transformierte *E. coli* Zellen, die ohne die vektorständige β -Lactamase in ihrem Wachstum inhibiert sind [84–86].

Das *nptII*-Gen (Kan^R) kodiert für eine Neomycin-Phosphotransferase. Die Neomycin-Phosphotransferase ist eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs II (APH(3')II), die die ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-Hydroxyl-Gruppe des Aminohexose-Rings bestimmter Aminoglycosid-Antibiotika katalysiert und sie damit inaktiviert. Das Enzym zeichnet sich durch eine hohe Substratspezifität aus [87]. Kanamycin wirkt auf grampositive wie -negative Bakterien [86] durch Inhibierung der Proteinbiosynthese via Interaktion mit der ribosomalen 30S Untereinheit und gehört zu den bakteriostatischen Antibiotika [85].

Das *aadA*-Gen (Spc^R) stammt aus dem Plasmid R538-1 von *E. coli* und kodiert für eine Streptomycin-Adenyltransferase. Die Streptomycin-Adenyltransferase modifiziert die 3'-OH Position des Streptomycin-N-methyl-L-glucosamin-Rings bzw. eine 9-OH Position des Spectinomycins [87]. Spectinomycin wirkt bakteriostatisch auf aerobe gramnegative und -positive Bakterien durch Hemmung der Translokation der Peptidyl-tRNA von der A- zur P-Stelle [86].

Das *cmR*-Gen (Cam^R) stammt aus dem Transposon Tn9 und kodiert für eine Acetyltransferase, die eine Acetyl-CoA-abhängige Acetylierung des Antibiotikums Chloramphenicol katalysiert und damit dessen antibakterielle Wirkung aufhebt [87]. Die bakterioeristische Wirkung des Chloramphenicols resultiert aus der Hemmung der Proteinbiosynthese durch Bindung an die 50S Untereinheit [85].

Das *hph*-Gen (Hyg^R) stammt aus *E. coli* und kodiert für eine Hygromycin-Phosphotransferase. Diese inaktiviert spezifisch das Antibiotikum Hygromycin durch Phosphorylierung. Andere Aminoglycosid-Aminocyclitol-Antibiotika wie Kanamycin oder Geneticin werden nicht umgesetzt. [87]. Hygromycin B ist wirksam sowohl gegen Pro- als auch Eukaryotenzellen. In Prokaryoten inhibiert Hygromycin die bakterielle Translation durch Interaktion mit der 16S-rRNA. In Eukaryoten hemmt das Antibiotikum das Spleißen spezieller Introns und bei der Translation die Translokation der wachsenden Peptidkette, möglicherweise durch frühes Freisetzen der Peptidyl-tRNA, wodurch es zu Lesefehlern und Kettenabbrüchen kommt [85].

Material und Methoden

Aus Gründen der thermodynamischen Stabilität wurden alle Selektionsfaktor-Stammlösungen bei -20 °C gelagert. Die verwendeten Massenkonzentrationen sind Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Tabelle 2.2: Verwendete Selektionsfaktor-Stammlösungen

Organismus	Substanz	Lösungsmittel	Massenkonzentration im Medium, µg/ml
<i>E. coli</i>	Ampicillin-Natriumsalz	<i>sdd</i> H ₂ O	100
	Chloramphenicol	EtOH	25
	Kanamycin-Sulfat	<i>sdd</i> H ₂ O	50
	Spectinomycin-Dihydrochlorid	DMSO/ <i>sdd</i> H ₂ O (1:1)	100
	Streptomycin-Sulfat	<i>sdd</i> H ₂ O	200
	Tetracyclin-Hydrochlorid	EtOH/ <i>sdd</i> H ₂ O (1:1)	30
<i>K. lactis</i>	Acetamid	<i>sdd</i> H ₂ O	1.17×10 ⁴
<i>A. tumefaciens</i>	Chloramphenicol	EtOH	25
	Gentamycin-Sulfat	<i>sdd</i> H ₂ O	25
	Kanamycin-Sulfat	<i>sdd</i> H ₂ O	50
	Rifampicin	DMSO/ <i>sdd</i> H ₂ O (1:1)	150
	Spectinomycin-Dihydrochlorid	DMSO/ <i>sdd</i> H ₂ O (1:1)	100
	Streptomycin-Sulfat	<i>sdd</i> H ₂ O	100
<i>A. thaliana</i> und <i>N. benthamiana</i>	Hygromycin B	<i>sdd</i> H ₂ O	35
	Kanamycin-Sulfat	<i>sdd</i> H ₂ O	50
	Phosphinothricin	<i>sdd</i> H ₂ O	3

2.1.3 Bakterienkultivierung

Die Kultivierung der in Tabelle 2.3 benannten Mikroorganismen erfolgte ausschließlich in Laboren der Sicherheitsstufe 1. Zur Lagerung wurden die Mikroorganismen in 65 Vol.-% Glycerol aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

2.1.3.1 Bakterienstämme

Alle zur Klonierung bzw. Expression genutzten *E. coli*- sowie *A. tumefaciens*-Stämme sind in Tabelle 2.3 mit ihrem Genotyp aufgeführt.

Tabelle 2.3: Merkmale der verwendeten *E. coli* bzw. *A. tumefaciens*

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>supE44 thi-1 λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15	[88]
2T1R Survival	F ⁻ <i>mrcA</i> Δ(<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG fhuA::IS2</i>	[89]
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	[90, 91]
BL21(DE3)pChaper	BL21 (DE3) Hsp60/GroEL	[92]
BL21(DE3)Origami	Δ(<i>ara, leu</i>)7697 Δ <i>lacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> F'[<i>lac⁺ lacI^q pro</i>] (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> (Kan ^R , Str ^R , Tet ^R)	[93, 94]
BL21(DE3)Rosetta	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> pRARE (Cam ^R)	[94]
BL21(DE3)Rosetta-gami	Δ(<i>ara, leu</i>)7697 Δ <i>lacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> F'[<i>lac⁺ lacI^q pro</i>] (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> pRARE (Cam ^R , Kan ^R , Str ^R , Tet ^R)	[93, 94]
LBA4404	Ach5 pTiAch5ΔT (Rif ^R , Str ^R)	[95–97]
GV3101(pMP90)	C58 (Rif ^R , Gen ^R) NOP	[97–101]
C58C1-rif(pTiC58)	C58 (Rif ^R) NOP	[97, 100–102]

2.1.3.2 Anzucht und Nährmedien

Die Medien wurden gemäß der bakterienspezifischen Selektionsmarker (Tabelle 2.3) und der durch Transformation zusätzlich erworbenen Resistenzen mit den in Tabelle 2.2 angegebenen Antibiotikamengen versetzt. Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte im Schüttelwasserbad bei 140 Umdrehungen pro Minute (rpm). *E. coli* wurden bei 37 °C in Lysogenie Komplexnährmedium (LB) [103] modifiziert nach Miller [104] angezogen. *A. tumefaciens* wurde hingegen bei 28 °C in YEB-Medium kultiviert. Bakterien für Dauerkulturen wurden in SOC-Medium angezogen. Für Ausstriche wurde den Nährmedien vor dem Autoklavieren 1,5 Gew.-% Bacto-Agar zugesetzt. Ausstriche wurden für 16 bis 20 Stunden im Trockenbrutschrank inkubiert.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Nährmedien zur Bakterienanzucht

LB		YEB		SOC	
Bacto-Trypton	1,0 Gew.-%	Fleisch-Extrakt	0,5 Gew.-%	Bacto-Trypton	2,0 Gew.-%
Bacto-Hefeextrakt	0,5 Gew.-%	Bacto-Pepton	0,5 Gew.-%	Bacto-Hefeextrakt	0,5 Gew.-%
NaCl	171,1 mM	Bacto-Hefeextrakt	0,1 Gew.-%	MgCl ₂ * 6 H ₂ O	9,8 mM
		Saccharose	14,6 mM	NaCl	8,6 mM
		MgSO ₄ * 7 H ₂ O	2,0 mM	KCl	2,7 mM
pH = 7,0		pH = 7,2		pH = 7,0	

2.1.3.3 Herstellung kompetenter *E. coli*

Diese Methode basiert auf dem von Cohen *et al.* [105] vorgestellten Protokoll zur Präparation kompetenter *E. coli*, mit der Transformations-Effizienzen von 10^6 – 10^8 erreichbar sind.

Tabelle 2.5: Medien zur Präparation RbCl-kompetenter *E. coli*

TFB I		TFB II	
Kalium-Acetat	30,0 mM	Pipes	10,0 mM
RbCl	100,0 mM	CaCl ₂	75,0 mM
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	50,0 mM	RbCl	10,0 mM
CaCl ₂	10,0 mM	Glycerol	15,0 Vol.-%
Glycerol	15,0 Vol.-%		
pH = 5,8		pH = 6,5	

Die Puffer wurden bis zum Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt.

Das Pellet wurde anschließend in 20 ml TFB I Puffer (Tabelle 2.5) resuspendiert und nach 5 Minuten auf Eis erneut für 5 Minuten bei 3.000xg und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann vorsichtig in 2 ml TFB II resuspendiert, in Aliquots von 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und abschließend bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* wurden 400 ml frisches LB-Medium (Tabelle 2.4) mit 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 140 rpm inkubiert. Die Kultur wurde nach Erreichen einer Optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,8 bei $\lambda = 600$ nm auf Eis abgekühlt und danach für 5 Minuten bei 4.000xg und 4 °C abzentrifugiert. Das Bakterienpel-

2.1.3.4 Hitzeschock vermittelte Transformation von *E. coli*

Die Transformation kompetenter *E. coli* erfolgte nach den Protokollen von *Hanahan* [106] sowie *Pope und Kent* [107]. Hierzu wurden 50 µl einer Suspension kompetenter *E. coli* mit 25 fmol des einzubringenden Plasmids für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 45 Sekunden dauernden Hitzeschock bei 42°C erfolgte eine kurze Inkubation auf Eis bevor 200 µl SOC-Medium (Tabelle 2.4) zugegeben wurden. Die nachfolgende 90 minütige Inkubation erfolgte bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad.

Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte auf Basis von dem verwendeten Vektorsystem und der darin enthaltenen Resistenzgene. Vektoren die über kein differenziertes System zur Detektion einer Insertion (z. B. Blau-Weiss Selektion) verfügten, wurden auf einer LB-Selektionsfaktor-Agarplatte ausgebracht und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dies führte zu einem größeren Probenumfang, da Vektorselbstligationen oder Insertionen kleiner unspezifischer Fragmente nicht von Klonen mit korrekten Insertionen zu unterscheiden waren. Die entstandenen Kolonien wurden mittels einer PCR auf mögliche Insertionen untersucht.

2.1.3.5 Blau-Weiss Selektion des pGEM-T-Vektorsystems

Die Ligation eines Taq-Polymerase Amplifikats erfolgte beim pGEM-T-Vektor in eine Multiple Klonierungsstelle (MCS), die in einem β -Galactosidase (*lacZ*) Gen liegt. Bei einer erfolgreichen Insertion in die MCS ist das Enzym nicht mehr zur katalytischen Hydrolyse des exogenen, artifiziellen und chromogenen 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) im Stande. Somit bleiben Kolonien mit modifizierter β -Galactosidase im Wachstumsverlauf weiß. Kolonien die einen Vektor mit keinem oder nur einem kleinen – den Leserahmen nicht verschiebenden – Insert tragen, zeigen aufgrund der Umsetzung des X-Gal eine sich akkumulierende blaue Färbung. Die Expression der β -Galactosidase wird durch Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert.

Im Vorfeld eines Transformationsvorhabens wurden auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte 40 µl einer X-Gal- und 8 µl einer IPTG-Stammlösung (Tabelle 2.6) ausgespatelt und für 30 Minuten bei 37 °C im Trockenbrutschrank vorinkubiert. Die transformierten *E. coli* wurden auf der mit X-Gal und IPTG vorbereiteten LB-Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen und für 16 Stunden

Tabelle 2.6: Stammlösungen zur Blau-Weiss-Selektion

X-Gal-Stammlösung		IPTG-Stammlösung	
X-Gal	50,0 mM	IPTG	100,0 mM
N,N-Dimethylformamid	Lösungsmittel		

bei 37 °C inkubiert. Die Instabilität des X-Gal gegenüber Licht erforderte eine Inkubation im Dunkeln. Weiße Einzelkolonien wurden entnommen, auf einer frischen LB-Ampicillin-Agarplatte weiter kultiviert und mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) hinsichtlich möglicher Insertionen untersucht.

2.1.3.6 Lethalfaktor Selektion des pJET1.2/blunt-Vektorsystems

Die MCS ist bei diesem System in der CDS der Restriktions-Endonuklease *eco47IR* eingebettet. Die Restriktions-Endonuklease steht unter Kontrolle eines modifizierten, IPTG unabhängigen *lac*-Promoters. Im nativen Zustand erkennt das Enzym eine doppelsträngige DNA-Sequenz, bindet und zerschneidet diese [108]. Erfolgt nun die Insertion eines Amplifikats größer als 50 Basenpaare (bp) oder eines kleineren, das zu einer Leserasterverschiebung führt, ist die Restriktions-Endonuklease funktionslos und die *E. coli* Zellen können hiervon unbeeinträchtigt auf dem Selektionsmedium wachsen. Erfolgt keine oder eine kleine Insertion, die das Leseraster nicht verschiebt, führt dies zum Absterben der Zelle.

Der Transformationsansatz wurde auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausgebracht und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Entstandene Kolonien wurden weiter kultiviert und mittels PCR hinsichtlich möglicher Insertionen untersucht.

2.1.3.7 Chloramphenicol Selektion pflanzenspezifischer Vektorsysteme

Zur Steigerung der Transformationseffizienz, durch Reduktion falsch-positiver Klone, wurde die MCS pflanzenspezifische binäre Expressionsvektoren der pPZP/AlcR/AlcA-Reihe um ein Chloramphenicol Resistenzgen erweitert. Die Transformanten wurden entsprechend den vektorspezifischen Resistenzgenen (Tabelle 2.1) auf LB-Selektions-Agarplatten ausgebracht und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Einzelne *E. coli*-Kolonien wurden dann auf einer analogen LB-Selektions-Agarplatte sowie einer LB-Chloramphenicol-Agarplatte unter gleichen Bedingungen weiter kultiviert. Transformierte *E. coli*, die dann auf einer LB-Chloramphenicol-Agarplatte nicht wuchsen, enthielten einen Vektor mit modifizierter MCS und sollten via PCR hinsichtlich des Integrats untersucht werden.

2.1.3.8 Präparation und Transformation kompetenter *A. tumefaciens*

Die Präparation und Transformation kompetenter *A. tumefaciens* erfolgte nach der von Höfgen und Willmitzer [109] vorgestellten Frier-Tau-Methode. 200 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer *A. tumefaciens*-Suspension angeimpft und für 16 Stunden bei 28 °C und 140 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 wurde die Suspension für 10 Minuten bei 5.000xg und

22 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit sterilem TE-Puffer [Tris 10,0 mM; EDTA 1,0 mM; pH = 7,5] gewaschen, bevor es in 20 ml frischem LB-Medium resuspendiert und zu 500 µl aliquotiert wurde. Die Bakterien-Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Transformation wurden die kompetenten *A. tumefaciens* mit 150 - 750 fmol des einzubringenden Plasmids auf Eis aufgetaut und für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie für 5 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37 °C aufgetaut wurden. Nach der Zugabe von 0,8 ml LB-Medium erfolgte eine Inkubation für 4 Stunden bei 150 rpm und 22 °C. Je 200 µl der Zellsuspension wurden auf LB-Selektions-Agarplatten ausgestrichen und für 48 Stunden bei 28 °C im Trockenbrutschrank inkubiert. Einzelne *A. tumefaciens*-Kolonien wurden auf eine frische LB-Selektions-Agarplatten überführt, 24 Stunden bei 28 °C inkubiert und mittels PCR hinsichtlich einer erfolgreichen Transformation untersucht.

2.1.4 Hefekultivierung

Die Hefekultivierung erfolgte ausschließlich in Laboren der Sicherheitsstufe 1, die Lagerung der Dauerkulturen bei -80 °C in 65 Vol.-% Glycerol.

2.1.4.1 Anzucht und Nährmedien

Zur Kultivierung des *K. lactis* GG799 Hefestammes wurden nur Nährmedien (Tabelle 2.7) verwendet, die nicht älter als 2 Wochen waren. Die Anzucht der *K. lactis* Zellen erfolgte in YPD-Medium über 24 Stunden bei 30 °C

Tabelle 2.7: Medien zur Hefekultivierung

YPD		YCB	
Bacto-Pepton	2,0 Gew.-%	YCB Trockenmedium	1,17 Gew.-%
Bacto-Hefeextrakt	1,0 Gew.-%	NaH ₂ PO ₄	15,0 mM
Glucose	111,0 mM	Na ₂ HPO ₄	15,0 mM
pH = 7,5		pH = 7,0	

und 140 rpm im Schüttelwasserbad. Transformanten wurden ausschließlich in YCB-Nährmedien unter analogen Bedingungen kultiviert. Für Ausstriche wurde den Nährme-

dien 2,5 Gew.-% Bacto-Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt. Ein Ausstrich erfolgte nur auf frische Platten und wurde für 24 bis 48 Stunden bei 37 °C im Trockenbrutschrank inkubiert.

2.1.4.2 Transformation und Selektion transgener *K. lactis*

Zur Transformation des *K. lactis* GG799 Hefestammes wurden 5 ml YPD-Medium mit einer Dauerkultur angeimpft und für 16 Stunden bei 200 rpm und 30 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden 10 µl der Hefezellsuspension in 990 µl steriles bidestilliertes

Wasser (*sdd*H₂O) aufgenommen und die OD₆₀₀ gemessen. Wie auch für viele andere Hefestämme galt hier folgender Zusammenhang, dass eine OD₆₀₀ von 0,1 näherungsweise 1×10^6 Zellen pro ml entspricht [50]. Aus einer Übernachtskultur wurden $2,5 \times 10^8$ Zellen in 50 ml frisches YPD-Medium überführt, was einer finalen Zellkonzentration von $5,0 \times 10^6$ Zellen pro ml entsprach. Die Zellen wurden für 3 bis 5 Stunden bei 200 rpm und 30 °C inkubiert, so dass es ihnen möglich war, mindestens 2 Teilungszyklen zu durchlaufen und genügend Zellmasse für 10 Transformationen zu liefern. Sobald eine OD₆₀₀ von 0,7 erreicht war, wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 3.000xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 25 ml *sdd*H₂O gewaschen und in 1 ml *sdd*H₂O resuspendiert. Die Zellen wurde für 30 Sekunden bei 11.000xg in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 1,2 ml TE/LiAc Puffer (Tabelle 2.8) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert und die Zellen erneut für 30 Sekunden bei 11.000xg abzentrifugiert.

Tabelle 2.8: Lösungen zur Präparation kompetenter Hefen

TE/LiAc		TE/LiAc/PEG	
Tris	10,0 mM	Tris	10,0 mM
EDTA	10,0 mM	EDTA	10,0 mM
Lithium-Acetat	150,0 mM	Lithium-Acetat	150,0 mM
		PEG 4000	36,0 Gew.-%
pH = 7,5		pH = 7,5	

Die Puffer wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

15 µl Volumen. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten bei 30 °C wurden 70 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben und ein Hitzeschock für 15 Minuten bei 42 °C mit abschließender Abkühlung auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden bei 7.000xg für 2 Minuten zentrifugiert und in 1 ml YPD-Medium resuspendiert, anschließend erneute 30 Minuten bei 250 rpm und 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch die Zentrifugation für 2 Minuten bei 7.000xg pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml *sdd*H₂O resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 50, 200 und 500 µl auf je einer mit 5 mM Acetamid versetzten YCB-Agar-Platte ausgebracht. Nur transgene Zellen, die das *amdS* Gen exprimierten, waren in der Lage auf dem stickstofffreien Minimalmedium zu wachsen, in dem sie Ammoniak als Stickstoffquelle für deren Metabolismus aus Acetamid erschließen konnten.

Die Zellen wurden zur Transformation mit 600 µl TE/LiAc/PEG-Puffer und 50 µl einer zuvor für 5 Minuten bei 95 °C gekochten und anschließend auf Eis abgekühlten, 2 mg/ml konzentrierten DNA Probe aus He-ringssperma versetzt. Die Transformation erfolgte mit 1 µg linearisiertem pKLAC1-Vektor in maximal

2.1.5 Pflanzenkultivierung

Die gesamte Pflanzenkultivierung erfolgte in den Anzuchtsräumen des Instituts bei 20 ± 2 °C unter den in Abbildung 2.7 dargestellten Lichtverhältnissen. Die Leuchtfelder sind mit L36/20W hellweiß Leuchtstoffröhren der Marke Osram bestückt und auf Langtag geschaltet (15 Stunden Hell- zu 9 Stunden Dunkelpase). Zur Überwachung des Insektenbefalls wurden Kombi-Gelbtafeln (Bayer CropScience Deutschland GmbH, Langenfeld) in relativer Nähe zu den Pflanzen angebracht, zusätzlich erfolgte eine tägliche Sichtprüfung der Pflanzen auf Schädlingsbefall. Experimente mit transgenen Pflanzen wurden in einem Anzuchtsraum der Sicherheitsstufe 1 ausgeführt.

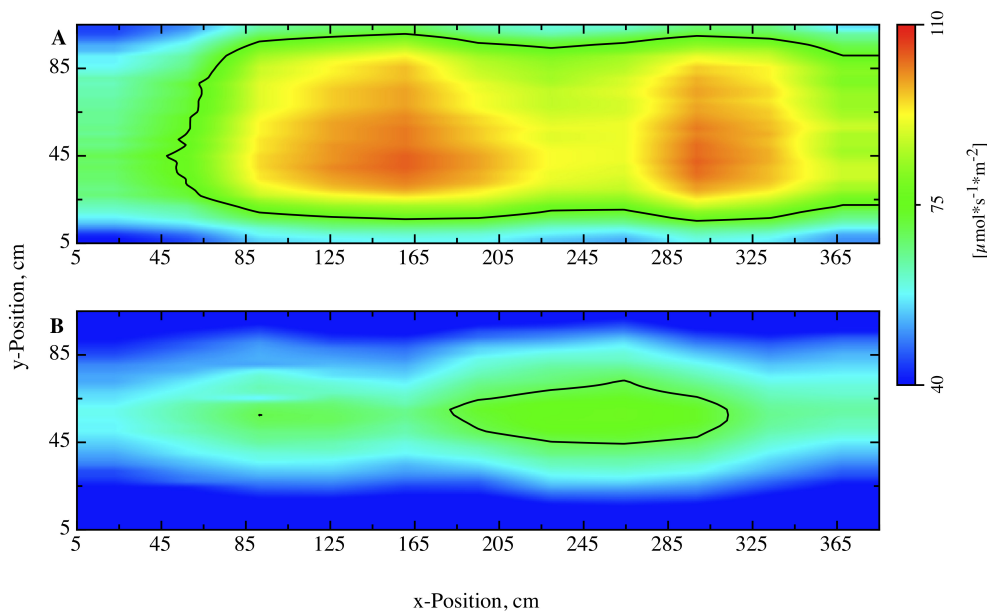


Abbildung 2.7: **PPFD-Verteilung in den Pflanzenanzuchtsräumen**

Die Photosynthetische Photonendichte (PPFD) wurde mittels eines *LI-COR Quantum/Radio/Photometers* Modell *LI-189* in Verbindung mit einem *LI-1000 Multiplier Quantum* in den Räumen -2 114 (A) sowie -2 126 (B) gemessen. Eine Isophote (—) kennzeichnet Bereiche mit $70,0 \mu E \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$. Die Messpunkte lagen je $10,0 \pm 0,5$ cm von einander entfernt und die Messhöhe betrug $15,0 \pm 0,5$ cm über der Tischplatte. Die Variation der Lichtintensität Δz_{abs} betrug $0,8 \pm 0,05 \mu E \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$ pro cm_z im Bereich von 10,0 bis 30,0 cm über der Tischplatte. Vereinzelte Kontrollmessungen ergaben eine Schwankung von $\Delta z_{abs} \pm 3 \mu E \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$ über einen Zeitraum von 4 Monaten.

2.1.5.1 Anzucht in Sterilkultur

BY-2 Zellsuspensionskultur Die Kultivierung der BY-2 Zellsuspensionskultur wurde in den Laboratorien des heutigen *Tobacco Science Research Laboratory* der *Japan Tobacco Inc.* aus dem Kallus eines *N. tabacum* Sämlings gewonnen [110]. Kennzeichen dieser Zelllinie ist die hohe Homogenität und Teilungsaktivität [5]. Die Bright Yellow-2 (BY-2)-Zellsuspensionskultur bot sich zur Gewinnung der γ -Tubulin-Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) an, da im Vergleich zu differenzierten Tabakpflanzen diese über einen höheren mitotischen Index verfügt und γ -Tubulin auch in höherem Maße exprimiert (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).

Tabelle 2.9: Medien zur Pflanzenkultivierung

Stammlösung [†]		LS-Medium		MS-Medium	
I (10fach)	NH ₄ NO ₃	205,4	mM	205,4	mM
	KNO ₃	187,9	mM	187,9	mM
	CaCl ₂	29,9	mM	29,9	mM
	MgSO ₄	15,0	mM	15,0	mM
	KH ₂ PO ₄	27,0	mM	12,5	mM
II (100fach)	MnSO ₄	10,0	mM	10,0	mM
	H ₃ BO ₃	10,0	mM	10,0	mM
	ZnSO ₄	2,99	mM	2,99	mM
	KI	0,50	mM	0,50	mM
	Na ₂ MoO ₄	0,10	mM	0,10	mM
	CoCl ₂	10,5	µM	10,5	µM
	CuSO ₄	10,0	µM	10,0	µM
III (1000fach)	Glycin	-	-	26,6	mM
	Nicotinsäure	-	-	4,06	mM
	Pyridoxin HCl	-	-	2,95	mM
	Thiamin HCl	3,0	mM	0,30	mM
IV (100fach)	FeSO ₄	10,0	mM	10,0	mM
	EDTA	10,0	mM	10,0	mM
Additive	myo-Inosit	0,56	mM	0,56	mM
	Saccharose	87,6	mM	87,6	mM
	2,4-D [‡]	0,45	nM	-	-

[†] Die Lösungen I bis IV wurden entsprechend den Angaben in den Klammern zu einer finalen einfachen Konzentration verdünnt. Die Konzentrationsangaben der Inhaltsstoffe beziehen sich auf die jeweiligen Stammlösungen. Die Konzentrationsangaben der Additive beziehen sich auf das fertige Medium.

[‡] 2,4-D wurde nur dem Versuchskulturmedium zugesetzt.

Als Nährmedium kam ein nach *Nagata et al.* modifiziertes LS-Medium [5, 111] zum Einsatz (Tabelle 2.9). 0,5 ml einer BY-2-Erhaltungskultur wurden wöchentlich in 25,0 ml LS-Nährmedium im 100 ml Erlenmeyerkolben überimpft und im Klimakonstantraum auf einem Rotationsschütteltisch bei 100 rpm im Dunkeln angezogen. Für eine Versuchskultur wurden 1,0 ml einer Erhaltungskultur in 25,0 ml LS-Medium überimpft und für 96 Stunden unter analogen Bedingungen inkubiert. Eine Kultivierung als langsam wachsender Kallus auf verfestigtem LS-Gelrite (2,5 Gew.-%) war ebenfalls möglich und wurde zur Sicherung der Kultur praktiziert.

Pflanzensamen Die Aussaat von Pflanzen erfolgte stets in Sterilkultur auf 1/2 MS-Gelrite (2,5 Gew.-%)

[112] (Tabelle 2.9) angezogen bevor sie auf Erde bzw. einem Tonsubstrat weiter kultiviert wurden. Hierzu war eine Oberflächensterilisation erforderlich. Die Sterilisation der *A. thaliana* Samen erfolgte mit Ethanol und Natriumhypochlorit, *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) und *N. tabacum* Samen nur mit Natriumhypochlorit. Zur Beendigung der Samenruhe wurden angefeuchtete *A. thaliana*-Samen vor der Oberflächensterilisation für 3 Tage bei 4 °C gelagert.

Ethanol-Oberflächensterilisation der *A. thaliana* Samen Hierzu wurden ca. 200 bis 500 *A. thaliana* Samen in eine 70 Vol.-%ige Ethanol (EtOH)-Lösung gegeben und für 5 Minuten geschüttelt. Nachfolgend wurden die Samen für 10 Minuten in einer 10 Vol.-%igen Natriumhypochlorit-Lösung inkubiert und anschließend dreimal für 5 Minuten in *sdd*H₂O gewaschen. Zur Selektion transgener Samen wurden die oberflächensterilisierten Samen auf 1/2 MS-Selektions-Gelriteplatten ausgebracht (Tabelle 2.2 und 2.9). Die Platten wurden mit 3M *Micropore* Klebeband verschlossen, was einen Gasaustausch unter sterilen Bedingungen ermöglichte.

Natriumhypochlorit-Oberflächensterilisation der Tabaksamen 50 bis 100 Tabaksamen wurden in einer 30 Vol.-%igen Natriumhypochlorit-Lösung für 5 Minuten unter schütteln inkubiert. Zur Entfernung der Natriumhypochlorit-Lösung wurden die Samen dreimal für 5 Minuten in *sdd*H₂O gewaschen und umgehend auf LS-Gelrite (2,5 Gew.-%) ausgebracht. Die Selektion transgener Samen erfolgte auf LS-Selektions-Platten (Tabelle 2.2 und 2.9).

Chlorgas-Oberflächensterilisation der transgenen AlcR/AlcA Samen Die Samen mit dem AlcR/AlcA transfizierter Pflanzen bedurften einer gesonderten Oberflächenbehandlung, da der EtOH induzierbare Promoter des AlcR/AlcA-Systems bereits auf geringste Mengen EtOH, selbst in der unmittelbaren Gasphase [113], reagierte. So wurden die Samen transfizierter Pflanzen in einem Exsikkator mittels Chlorgas oberflächensterilisiert.

Die Sterilisation erfolgte in abgewandelter Form nach dem von *Clough und Bent* [114] vorgestellten Protokoll. Hierzu wurden in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß ca. 50 mg Samen eingewogen, was ca. 2400 Samen entspricht [115], und in einem 10 l Exsikkator platziert. Zur Chlorgassynthese wurden in einem Abzug 100 ml Natriumhypochlorit mit 3 ml konzentrierter Salzsäure in einem 250 ml Becherglas gemischt und umgehend neben dem Eppendorf Reaktionsgefäß im Exsikkator platziert und dieser verschlossen. Nach 1 bis 3 Minuten wurde der Exsikkatorhahn kurz geöffnet, um den Überdruck abzubauen. Die Samen wurden für 3 bis 16 Stunden im Exsikkator inkubiert, bevor sie auf Gelrite-Nährmedien ausgebracht wurden.

2.1.5.2 Pflanzenkultivierung auf unsterilen Substraten

A. thaliana-Keimlinge wurden 2 Wochen nach der sterilen Aussaat auf ein Vermiculit/Fruhstorfer Topferde Typ T/Fruhstorfer Pikiererde Typ P-Gemisch (Archut-Produktionserden, Vechta) im Verhältnis 2:4:4 bzw. Vermiculit/Fruhstorfer Aussaat- und Stecklingserde-Gemisch (Archut-Produktionserden, Vecheta) im Verhältnis 1:4 umgepflanzt. *N. benthamiana*- sowie *N. tabacum*-Keimlinge wurden nach 4 bis 6 Wochen auf Fruhstorfer Aussaat- und Stecklingserde umgepflanzt. Die Versorgung mit Nährelementen erfolgte durch die Bewässerung mit einer Nährlösung nach *Hoagland* [116] (Tabelle 2.10).

Tabelle 2.10: Nährstofflösungen nach Hoagland zur Pflanzenkultivierung

Substanz	<i>A. thaliana</i>		<i>N. benthamiana</i> <i>N. tabacum</i>	
KNO ₃	5,00	mM	6,03	mM
Ca(NO ₃) ₂	5,00	mM	4,02	mM
KH ₂ PO ₄	1,00	mM	-	-
(NH ₄)H ₂ PO ₄	-	-	1,04	mM
MgSO ₄	0,50	mM	1,99	mM
MnSO ₄	10,0	µM	-	-
MnCl ₂	-	-	2,02	µM
ZnSO ₄	1,00	µM	0,31	µM
CuSO ₄	0,50	µM	0,20	µM
H ₃ BO ₃	30,0	µM	0,97	µM
Na ₂ MoO ₄	1,00	µM	0,093	µM
Co(NO ₃) ₂	0,50	µM	0,086	µM
FeSO ₄	27,0	µM	89,6	µM
EDTA	27,0	µM	89,1	µM

2.1.5.3 *Arabidopsis thaliana* in Planta Transfektion

Die Transfektion von *A. thaliana* erfolgte nach dem von *Clough und Bent* [114] vorgestellten Floral-Dip Protokoll. Hierzu wurden 8 Wochen vor der geplanten Transformation oberflächens-sterilisierte *A. thaliana* Samen auf 1/2 MS-Gelrite (Tabelle 2.9) ausgesät. Nach 7 bis 10 Tagen wurden 5 Keimlinge je Vierkant-Blumentopf umgepflanzt. Die Keimlinge wurden zunächst unter Kurztagbedingungen (10 Stunden Licht) angezogen. Die erste Infloreszenz wurde knapp über der Blattrosette abgeschnitten und dann für 4 Wochen unter Langtagbedingungen (14 Stunden Licht) angezogen. Diese Maßnahmen dienen der Erhöhung der Anzahl an Seitenblütenständen. Je Transfektionsansatz wurden 2 bis 5 solcher Vierkant-Blumentöpfe benötigt, abhängig von der Anzahl Infloreszenzen.

Der das Gen-Konstrukt tragende *A. tumefaciens* Stamm wurde 4 Tage vor der Transfektion frisch ausplattiert, vereinzelt und mittels Kolonie-PCR auf das Genkonstrukt untersucht. Positive Klone wurden in 5 ml YEB-Medium (Tabelle 2.4) für 48 Stunden bei 28 °C und 175 rpm inkubiert. Zur Transfektion wurden 300 ml YEB-Medium (Tabelle 2.4) mit 2,0 ml der YEB-*A. tumefaciens*-Kultur angeimpft und für 16 Stunden bei 28 °C und 175 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 bis 2,0 inkubiert. Die *A. tumefaciens*-Suspension wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 5.000xg und 22 °C pelletiert, und in 5,0 ml einer 5,0 Gew.-%igen Saccharose-Lösung resuspendiert. Durch die Zugabe von bis zu 400 ml einer 5,0 Gew.-%igen Saccharose-Lösung mit 0,044 µM 6-Benzylaminopurin wurde eine OD₆₀₀ von 0,8±0,05 eingestellt. Abschließend wurde der Zellsuspension noch 0,02 Vol.-% Silwet L-77 zugegeben. Bei Silwet L-77 handelt es sich um nicht-ionisches Netzmittel, dass die Oberflächenspannung von wässrigen Lösungen stark reduziert. Daraus resultiert eine ausgezeichnete Benetzung und somit eine um den Faktor 4 erhöhte Transfektionsrate [114, 117, 118].

Zur Transfektion wurde eine Anzuchtsschale (60 × 40 × 6 cm) mit befeuchtetem Papier ausgelegt und die Löcher der transparenten Abdeckhaube (60 × 40 × 14 cm) mit 3M Micropore Klebeband – zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit – verschlossen. Alle bereits vorhandenen Schötchen wurden entfernt. Der Vierkant-Blumentopf wurde angefeuchtet und mit Aluminiumfolie abgedeckt, so dass nur die Infloreszenzen frei zugänglich waren. Die gebündelten Infloreszenzen wurden durch umstülpen des Vierkant-Blumentopfes für 1 Minute in der *A. tumefaciens*-Suspension inkubiert. Die Pflanzen wurden nach der Inkubation mit einem Stab stabilisiert und auf der Seite liegend – ohne dass die Blüten den Boden berühren – für 16 Stunden bei 22 °C inkubiert. Danach wurden die Pflanzen bis zur Samenreife aufrecht bei 22 °C kultiviert. Die Samen wurden geerntet, auf 1/2 MS-Gelrite-Selektionsmedien (Tabelle 2.2) ausgebracht und hinsichtlich möglicher Transfektionen untersucht.

2.1.5.4 Transiente *A. thaliana*-Transfektion

Die Transfektion wurde nach dem Protokoll von *Kim et al.* [119] durchgeführt.

2.1.5.5 Transiente *N. benthamiana*-Transfektion

Zur transienten Transfektion von *N. benthamiana* wurden die *A. tumefaciens*-Stämme GV3101(pMP90) und C58C1-rif(pTiC58) verwendet. Viele Protokolle verweisen auf den Laborstamm LBA4404, ein Abkömmling des Ach5 Wildtyps. Die Nopaline bildenden C58-Abkömmlinge scheinen aber dem Ach5-Abkömmling in Bezug auf die Transfektions-Effizienz deutlich überlegen zu sein [62]. Die Transfektion erfolgte zum Teil in Co-Kultur mit einem GV3101(pMP90/p19) Stamm. Dieser enthielt ein Plasmid mit einem *p19*-Gen des Tomato-Bushy-Stunt-Virus, das unter der Kontrolle eines 35S-Promoters ist. Exprimiert wirkt *p19* als Suppressor auf den als PTGS bezeichneten Effekt, indem es die Ausbildung eines RISC-Komplexes verhindert [70, 71, 120] und so zur Erhöhung der Expressionsrate beiträgt.

Präparation der *A. tumefaciens*-Suspension Der Ausstrich einer Dauerkultur des das Gen-Konstrukt tragenden *A. tumefaciens*-Stammes auf einer YEB-Selektionsplatte wurde über Nacht bei 28 °C inkubiert. Durch eine PCR wurden die Kolonien auf die Anwesenheit des Genkonstruktes untersucht. Eine positive getestete Kolonie wurde in 100 ml YEB-Medium (Tabelle 2.4) mit entsprechenden Selektionsfaktoren (Tabelle 2.3, 2.1 sowie 2.2) über Nacht bei 28 °C und 160 rpm kultiviert. Auf analoge Weise wurde mit dem GV3101(pMP90/p19) Stamm verfahren. Die Zellsuspensionen wurden für 5 Minuten bei 2.000 $\times$ g und 4 °C zentrifugiert und in 20 ml Infiltrations-Medium (Tabelle 2.11) resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 Minuten bei 2.000 $\times$ g und 4 °C wurden die Zellen in Infiltrationsmedium resuspendiert. Nach der Einstellung der OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur.

Tabelle 2.11: Medien zur transienten Expression in *N. benthamiana*

Infiltrationsmedium	
MES-KOH	10,0 mM
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	10,0 mM
Acetosyringon	200,0 µM
1/2 MS-Medium als Solvens	

Agroinfiltration der *N. benthamiana*-Blätter Die Agroinfiltration erfolgte auf der Blattunterseite mit einer 1 ml spritze ohne Nadel [121]. Blätter aus dem oberen Drittel der 6 bis 8 Wochen alten Tabakpflanzen mit einem Blattdurchmesser von ca. 6 bis 8 cm wurden für die Prozedur ausgewählt, da diese die höchsten Ausbeuten versprachen [122]. Die *A. tumefaciens*-Suspension wurde appliziert, bis das Blatt vollständig beimpft war. Bei der Transfektion mit induzierbaren Expressionssystemen erfolgte noch eine 24 stündige Inkubationsphase vor der Zugabe des Induktors.

2.2 Molekulargenetik

Als Referenz für die Versuchsvorschriften gilt soweit nicht abweichend angegeben *Sambrook et al.* [123], *Eckert-Kartenbeck* [124] sowie *Schrimpf* [125]. Für die nachfolgenden Versuche wurden Puffer, Lösungen sowie hitzestabile Materialien für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Hitzeunempfindliche Mehrwegglasgeräte wurden für $3\pm 0,1$ Stunden bei 180 ± 5 °C im Trockenschrank sterilisiert.

2.2.1 Nukleinsäure-Isolation

Um einer Kontamination mit Nukleasen oder anderer Verunreinigungen vorzubeugen, erfolgten alle Isolationen nicht unter dem Abzug sondern stets an einer Laminar-Airflow-Sterilbank.

Generell wurde das Probenmaterial unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem mit Chloroform gereinigtem Mörser homogenisiert. Hierbei war darauf zu achten, dass das Homogenisat noch gefroren in dem jeweiligen Extraktionsfluid aufgenommen wurde, um das Risiko eines Abbaus durch endo- oder exogene Nukleasen möglichst gering zu halten. Die Nukleinsäuren wurden zur abschließenden Lagerung stets in *sdd*H₂O aufgenommen, um die negativen Einflüsse von EDTA auf die Folgereaktionen (wie z.B. Polymerasekettenreaktion) zu vermeiden. Auf den Einsatz eines üblichen Tris/NaOH/EDTA-haltigen Aufnahme- und Lagerungspuffers, der die Nukleinsäuren gegenüber einer säurekatalysierten Hydrolyse stabilisiert, wurde aus pragmatischen Gründen verzichtet.

2.2.1.1 RNA-Isolation

Die Ersatzstoffprüfung für Diethylpyrocarbonat ergab aufgrund der Gesundheitsgefährdung eine Entscheidung zu Gunsten des Guanidinisoithiocyanats. Durch Diethylpyrocarbonat erfolgt eine kovalente Proteinmodifikation [126] und somit ist die RNA während der Isolation einer geringeren Degradierungsgefahr durch RNasen exponiert, da Guanidinisoithiocyanats als chaotropes Salz Proteine nur denaturiert. Diethylpyrocarbonat muss jedoch vor den Folgereaktionen wieder entfernt werden, was auch zu Lasten der Abfallstoffbilanz geht. Zur RNA-Isolation wurde das monophasische peqGOLD RNAPure System (pepLab, Erlangen) bestehend aus Phenol und Guanidinisoithiocyanat verwendet. Das Guanidinisoithiocyanat dient der reversiblen Denaturierung von Proteinen (einschließlich RNasen), das enthaltene Phenol senkt den pH-Wert und die Proteine lösen sich. Obwohl sich dieses Kit kostenintensiver gegenüber einer Standard Phenol-Extraktion darstellte [127], lagen die Vorteile aufgrund des geringeren Lösungsmittelseinsatzes im Umwelt- und Selbstschutz.

Je 100 mg Homogenisat wurde 1 ml peqGOLD RNAPure zu gegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) – zwecks Gewährleistung einer vollständigen Dissoziation der Nukleotidkomplexe – wurden 0,2 ml Chloroform zu je 1 ml peqGOLD RNAPure zugegeben. Das Gefäß wurde anschließend mit Nesco-Film verschlossen, für 15 Sekunden (s) gevortext (REAX 2000, Hettich, Tuttlingen) und 10 Minuten bei RT inkubiert. Durch eine Zentrifugation für 5 Minuten bei RT und $12.000xg$ (Beckmann J2-21 Centrifuge, JS 13.1 Rotor, Fullerton, USA) erfolgte eine Auftrennung des Gemisches in drei Phasen. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Corex-Zentrifugenröhrchen (Corning Inc., New York, USA) überführt und mit 0,5 ml 2-Propanol je eingesetztem mL peqGOLD RNAPure versetzt und wieder für 10 Minuten bei RT inkubiert. Eine erneute zehnmünütige Zentrifugation bei 4 °C und $12.000xg$ (Beckmann J2-21 Centrifuge, JS 13.1 Rotor) brachte ein RNA-Präzipitat hervor. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Präzipitat zweimal mit Ethanol (70 Vol.-%) gewaschen. Das Pellet wurde unter der Sterilbank getrocknet und abschließend in 100 µl *sddH₂O* pro 100 mg anfänglich eingesetzter Probenmasse aufgenommen. Die Lagerung des Gesamt-RNA-Isolats erfolgte bei -20 °C.

2.2.1.2 DNA-Isolation

Die etwas höhere Stabilität der DNA im Vergleich zur RNA ermöglichte es, auf eine Phenolextraktion zu verzichten. Die Reinigung des Homogenisats von Polysacchariden und Proteinen erfolgte mit Hilfe des kationischen Detergenz N,N,N-trimethyl-hexadecan-1-aminium-bromid (CTAB). Durch den Zusatz eines Gemisches von Chloroform und Isoamylalkohol (IAA) fallen CTAB/Polysaccharidkomplexe aus und bilden nach einer Zentrifugation eine Interphase. Die Nukleinsäuren verbleiben in der wässrigen Oberphase und bedürfen nur einer geringen abschließenden Aufarbeitung [126].

Je 500 mg Homogenisat wurden 10 ml CTAB-Puffer und 20 µl 2-Mercaptoethanol zugegeben und für 60 Minuten im Schüttelwasserbad bei 60 °C und 150 rpm inkubiert. Dabei kam es zur Freisetzung der DNA. Nach der Inkubationsphase erfolgte die Zugabe von 10 ml eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (96 : 4 Vol.-%) und eine erneute Inkubation für 20 Minuten bei RT und 150 rpm auf einem Rotationsschütteltisch (Vibrax VXR, IA-Labortechnik, Staufen). Die anschließende Zentrifugation in einem Corex-Zentrifugenröhrchen erfolgte bei $2.000xg$ (Beckmann J2-21, JS 13.1 Rotor) und RT für 20 Minuten. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig mit einer weitlumigen Glaspipette (zur Vermeidung von Scherkräften) entnommen und in ein frisches Corex-Zentrifugenröhrchen überführt, ohne Teile der CTAB- und Polysaccharid-haltigen Interphase mit zu überführen. Durch die Zugabe eines gleichen Volumenteils eisgekühlten 2-Propanols begann die Nukleinsäure-Präzipitation. Während der sich anschließenden Zentrifugation (J2-21,

JS 13.1 Rotor) bei $7.000xg$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 Minuten pelletierte das Nukleinsäure-Präzipitat. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 2 ml Ethanol (70 Vol.-%) gewaschen und getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 5 ml *sdd*H₂O aufgenommen und bei RT und 150 rpm auf einem Schütteltisch bis zur vollständigen Lösung inkubiert. Durch die Zugabe von 0,4 ml einer Natrium-Acetat-Lösung (3 M) und 8 ml Ethanol ($\geq 99,8$ Vol.-%, p.A.) wurde die DNA erneute gefällt. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden mittels einer Pasteurpipette entnommen, kurz in Ethanol (70 Vol.-%) gewaschen und für 5 Minuten bei RT getrocknet bevor das nukleinsäurehaltige Pellet in 250 μl *sdd*H₂O gelöst wurde. Die Lagerung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.1.3 Plasmidextraktion aus Bakterien

Bei kleineren Volumina (≤ 50 ml Bakteriensuspension) empfiehlt sich eine Aufarbeitung mittels handelsüblicher Silika-Matrixsysteme. Für größere Volumina (≥ 50 ml) bietet sich eine Aufarbeitung ohne Säulen an, da diese unter Umständen verstopfen können. Im allgemeinen liefern Silika-Matrixsysteme qualitativ höherwertige Plasmidextrakte. Gemein ist beiden hier eingesetzten Verfahren das grundlegende Prinzip der alkalischen Lyse. Hierbei werden die Bakterien zuerst mit einem EDTA-haltigen Puffer inkubiert, der die Zellwände vermutlich durch Komplexbildung der zweiwertigen Metallkationen [128] destabilisiert [129]. Dieser Puffer kann optional eine RNase A enthalten um die enthaltene einzelsträngige RNA zu spalten. Die Spaltung erfolgt über die Erkennung von Uridin und Cytidin und die Spaltung der Phosphordiesterbindungen an der 5'-Position der Ribose. Die nachfolgende Zugabe einer alkalischen Natriumdodecylsulfat (SDS) Lösung dient der Zellyse. Das anionische Detergenz löst Phospholipide, während das enthaltene NaOH die enthaltenen Proteine im Zellysat denaturiert. Die abschließende pH-Stabilisierung im sauren Bereich durch ein Acetat-Puffersystem bewirkt eine vollständige Fällung der Proteine, die mit den restlichen Zellfragmenten durch Zentrifugation abgetrennt werden können. Im Anschluss daran kann die Plasmid-DNA an einer Silika-Matrix gebunden, gewaschen und eluiert oder ethanolisch präzipitiert werden. Die Plasmid-DNA wurde stets bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

Plasmid-Mini-Präparation Mittels des NucleoSpin Plasmid Systems (Macherey und Nagel, Düren), das die quantitativ und qualitativ besten Ausbeuten lieferte, wurden Plasmide aus Bakterien im Minimaßstab isoliert. Alle im Folgenden beschriebenen Zentrifugationsschritte erfolgten bei RT und $11.000xg$ in einer Labortischzentrifuge (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg).

Zu Beginn wurden 8 ml einer Bakteriensuspension mit einer $\text{OD}_{600} = 1,0 \pm 0,2$ in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß durch Zentrifugation für 30 Sekunden sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 250 μl des RNase A-haltigen Puffers A1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 250 μl des SDS-haltigen Puffers A2 war es erforderlich, das Reak-

tionsgemisch vorsichtig zu durchmischen. Höchstens 5 Minuten später erfolgte die Zugabe von 300 µl des um Guandinhydrochlorid angereicherten Acetat-Puffers A3. Durch eine zehnminütige Zentrifugation wurde die Suspension aus präzipitierten Proteinen, Zelldebris und gelösten Nukleinsäuren getrennt. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine NucleoSpin Plasmid-Säule aufgetragen und durch Zentrifugation für 1 Minute an die Matrix gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen. Der sich anschließende, zweite Waschschriff der Säule mit 600 µl des auf 50 °C vortemperierten AW-Puffers erfolgte ebenfalls durch eine Zentrifugation für 1 Minute. Hieran schloss sich ein Waschschriff mit 600 µl des Puffers A4 an. Die Silika-Matrix wurde durch eine zweiminütige Zentrifugation vollständig von den Resten der ethanolischen Waschpuffer befreit und getrocknet. Anschließend erfolgte die Elution der Plasmid-DNA. Hierzu wurde die Silika-Matrix zweimal mit 25 µl *sdd*H₂O für 1 Minute inkubiert, bevor eine einminütige Zentrifugation erfolgte.

Plasmid-Midi-Präparation Alle folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C in einem Corex-Zentrifugenröhrchen in der Beckmann J2-21 Zentrifuge mit einem JS 13.1 Rotor. Die erforderlichen Lösungen (vgl. Tabelle 2.12) wurden autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Die Bakterien einer 100 ml Bakteriensuspension ($OD_{600} = 1 \pm 0,2$) wurden durch einminütige Zentrifugation bei $7.000xg$ sedimentiert, das Bakterienpellet anschließend in 7 ml der Lösung 1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 14 ml der Lösung 2 wurde die Suspension für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellyse wurde komplettiert durch die abschließende Zugabe von 10 ml der Lösung 3 und eine Inkubation für ebenfalls 5 Minuten bei 4 °C. Mittels einer 30 minütigen Zentrifugation bei $12.000xg$ wurden Zellfragmente

Tabelle 2.12: Lösungen zur Midi-Präparation

	Substanz	Konzentration
Lösung 1	Glucose	50,0 mM
	Tris	25,0 mM
	EDTA	10,0 mM
	pH = $8,0 \pm 0,1$ mit HCl eingestellt	
Lösung 2	SDS	1,0 Vol.-%
	NaOH	0,2 M
Lösung 3	Essigsäure	11,50 Vol.-%
	Kalium-Acetat	3,0 M

und denaturierte Proteine abgetrennt. Der plasmidhaltige Überstand wurde vorsichtig und ohne die Verschleppung der protein- und zellfragmenthaltigen Interphase in ein frisches Corex-Zentrifugenröhrchen überführt und mit dem 2,5 fachen Volumen an Ethanol ($\geq 99,8$ Vol.-%, p.A.) versetzt. Zur ethanolischen Präzipitation wurde die Lösung für 16 Stunden bei -20 °C eingelagert und am darauf folgenden Tag für 30 Minuten bei $15.000xg$ zentrifugiert. Das Plasmid-Sediment wurde getrocknet und in 100 µl *sdd*H₂O aufgenommen.

2.2.2 Nukleinsäureanalytik

2.2.2.1 Photometrische Nukleinsäure-Quantifizierung

Nukleinsäuren zeigen aufgrund der konjugierten Doppelbindungen im N-heterozyklischen Ringsystem ihrer Purin- und Pyrimidinbasen ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ [130]. Der Interaktions-Effekt mit dem Lösungsmittel auf die Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ ist hierbei zu berücksichtigen [131]. Eine photometrische Konzentrationsbestimmung in einem alkalischen Niedersalz-Puffer dient der Sicherung reproduzierbarer Ergebnisse [132]. Hierzu wurden 5 μl des Nukleinsäureisolats in 495 μl eines 2,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer ($\text{pH} = 8,5 \pm 0,1$) aufgenommen, ein Nullabgleich durchgeführt und die Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bzw. $\lambda = 280 \text{ nm}$ im Spektralphotometer (Typ U-1108, Hitachi) gemessen. Diese Messung belegte mögliche Verunreinigungen mit Proteinen. Ein 260/280-Quotient von $1,9 \pm 0,1$ spricht für eine besonders reine Probe. Werte kleiner 1,8 deuten auf Kontaminationen durch beispielsweise Phenol oder Proteine hin. Eine Extinktion von 1 bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ entspricht einer Konzentration von $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ doppelsträngiger DNA und $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ einzelsträngiger RNA [123].

2.2.2.2 Gelelektrophorese

Die Standard Agarose-Gelelektrophoresetechnik ermöglicht es, Nukleinsäuren von 0,1 bis 30 kbp Länge aufzutrennen und mittels eines Kalibrierstandards sowie eines Fluoreszenzfarbstoffes unter UV-Licht zu visualisieren. Neben dem analytischen Zweck, ist auch der präparative Einsatz dieser Methode möglich. Grundlage dieser zonalen und somit homogenen und konvektionseffekt-freien Trennmethode ist die Tatsache, dass Nukleinsäuren in neutralen und alkalischen Lösungen als Poly-Anion vorliegen. Jedes Nukleotid trägt (aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats) eine negative Ladung zur Gesamtladung des DNA-Stückes bei [84]. Bedingt durch ihre Gesamtladung bewegen sich Nukleinsäuren mit einer konstanten Beschleunigung, aber unterschiedlicher Geschwindigkeit, in einem elektrischen Feld. Die Matrix (das Gel) dient zum einen der Feldstabilisierung, vor allem aber als molekulares Sieb.

Tabelle 2.13: Zuwählende Agarosekonzentration abhängig vom Trennbereich

Konzentration Gew.-%	Optimaler Trennbereich linearer doppelsträngiger DNA-Fragmente kbp
0,75	1,0 – 15,0
1,00	0,5 – 10,0
1,50	0,2 – 5,0
2,00	0,05 – 2,0

Agarose-Gele Mittels Agarose, ein aus roten Meeresalgen durch Entfernung des Agaropektins gewonnenes Polysaccharid, war der Grundstoff für Agarose-Gele gefertigt. Somit ist dies kein normiert gefertigtes Produkt, weshalb es Schwankungen in der Qualität unterworfen ist. Durch Aufkochen wird die Agarose gelöst und geliert beim Abkühlen [126]. Je nach Anforderungen an die Trennkapazität wurden

Gele mit Agarose-Konzentrationen von 0,75 – 2,0 Gew.-% angefertigt (vgl. Tabelle 2.13 [127]). Für präparative Gele wurde eine zertifizierte GTQ Agarose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verwendet.

Visualisierung der Nukleinsäuren Mittels des interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoffes 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid (Ethidiumbromid) und UV-Licht erfolgte die Visualisierung der Nukleinsäuren. Das Absorptionsmaximum liegt im Bereich von $\lambda = 254$ bis 366 nm und ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 590$ nm. Ethidiumbromid interkaliert sowohl in einzel- als auch doppelsträngigen Nukleinsäuren. Durch die Nukleinsäure-Bindung resultiert eine Fluoreszenzverstärkung, die eine Differenzierung zwischen ungebundenem und gebundenem Ethidiumbromid ermöglicht und somit Nukleinsäuren auf einem UV-Transilluminator visualisiert werden [130].

Der Anodenkammer wurde vor jeder Elektrophorese 0,5 – 1,0 μ l einer Ethidiumbromidstamm-lösung (1,0 Gew.-%) zugegeben. Aufgrund seiner positiven Eigenladung wandert das Ethidiumbromid zur Kathode und interkaliert in die entgegenlaufenden Nukleinsäuren. Nach Abschalten des elektrischen Feldes wurde das Agarose-Gel auf einem UV-Transilluminator begutachtet und dokumentiert. Aufgrund der hohen Mutagenität des Ethidiumbromids wurden Nitrilhandschuhe zum Selbstschutz getragen und das Gel gesondert entsorgt.

Kalibrierungsstandards Alle Standards wurden stets auf eine Gesamtnukleinsäurekonzentration von 0,1 μ g $\cdot$ μ l eingestellt. Verwendung fanden die 100 bp-DNA-Leiter extended sowie 1kbp DNA-Leiter (Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Der Probenpuffer enthielt neben Tris, EDTA, Glycerol auch die Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden stets 3,5 μ l eines DNA-Kalibrierungsstandards eingesetzt.

Agarose-Gel-Herstellung und Durchführung der Elektrophorese Die zu untersuchende Probenanzahl bestimmte die Wahl des Elektrophorese-Systems und somit das herzustellende Agarose-Gelvolumen (s. Tabelle 2.14). Die einzusetzende Agarose-Menge wurde durch die erwartete Fragmentgröße der Nukleinsäuren bestimmt (s. Tabelle 2.13).

Tabelle 2.14: Spezifikationen der Bio-Rad Gel-Elektrophorese Systeme

	Wide Mini-Sub Cell GT System	Mini-Sub Cell GT System
Gel (Breite $\cdot$ Höhe [cm])	15 $\cdot$ 7	7 $\cdot$ 7
Gelvolumen [ml]	60,0	30,0
Geldicke [cm]	0,75	0,75
Anzahl der Geltaschen	20 bzw. 35	8 bzw. 15

Zur Herstellung eines 0,75 cm dicken Agarose-Gels wurden 30 bzw. 60 ml des 0,5x TBE-Puffers mit einer entsprechenden Menge an Agarose versetzt. Für eine analytische Elektrophorese wurde die peqGOLD Agarose (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) und für präparative Zwecke eine GTQ Agarose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verwendet.

Die Suspension wurde für 5 Minuten in der Mikrowelle (Microchef FM 3510, Mulinex, Radolfzell) aufgekocht. Dabei reduzierte sich das Flüssigkeitsvolumen, was zu einer Aufkonzentrierung der Puffersubstanzen führte, so dass der Verlust mit $sddH_2O$ ausgeglichen wurde. Die Lösung wurde für 10 Minuten auf einem Rotationsschütteltisch (VXR, Vibrax) bei mittlerer Rotationsgeschwindigkeit bis auf 50 °C abgekühlt. Nach dem Gießen des Agarose-Gels wurde der benötigte Probenkamm eingesetzt. Nach 30 Minuten war das Gel ausgehärtet

Tabelle 2.15: Puffer zur Agarose-Gelelektrophorese

0,5x TBE-Puffer		5x Orange-G-Puffer	
Tris	44,5 mM	Glycerol	60,0 Vol.-%
Borat	44,5 mM	Orange G	0,20 Gew.-%
EDTA	2,0 mM	Xylene Cyanol	0,05 Gew.-%
pH = 8,0±0,1		EDTA	60,0 mM

Die Puffer wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

und der Probenkamm konnte wieder entfernt werden. Das Gel wurde in die mit 0,5x TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Vor Beginn der Elektrophorese wurden 0,5 – 1,0 µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (1,0 Gew.-%) in die Anodenkammer pipettiert.

Die Proben wurden mit dem Orange-G-Puffer im Verhältnis 4 : 1 gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Das enthaltene Glycerol bewirkte ein Herabsinken der Probe in die Geltasche. Die Farbstoffe im Puffer ermöglichten die Kontrolle des Fortschritts während der Elektrophorese.

Die erforderliche Spannung von $U = 70 \text{ V}$ (4,7 V pro cm Elektrodenabstand) wurde mittels eines PowerPac 300 Netzgeräts (Biorad, München) bereitgestellt. Mit dem Austreten des Orange G Farbstoffes aus dem Agarose-Gel in die Anodenkammer wurde die Elektrophorese nach einer mittleren Laufdauer von 50 Minuten beendet. Entgegen den Herstellerangaben entsprach der Farbstoff in seinem Laufverhalten nicht einem doppelsträngigen 50 bp DNA-Fragment, sondern eher einer Fragmentlänge von 10 bp. Dies war bei der Laufzeitkalkulation zu berücksichtigen.

Auswertung und Dokumentation der Agarose-Gele Die abschließende Dokumentation erfolgte auf einem UV-Transilluminator (Modell 312 NM 200x200; $\lambda = 300 \text{ nm}$; TF-20-M-Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich) durch ein signalintegrierendes Kamerasystem (CF8/1 FMCC von Kappa, Göttingen), das an einem PC angeschlossen war. Die Daten wurden direkt von der Software WinTV2000 (Hauppauge GmbH, 2000) aufgenommen und auf einem PC gespeichert. Die Gelbilder wurden anschließend an einem Thermodrucker (Video Copy Processor

P67E, Mitsubishi, Japan) ausgedruckt. Die Nachbearbeitung erfolgte mit der Software Photoshop (Adobe, 2010). Hierbei wurden die Bilder invertiert und in Helligkeit, Kontrast und Belichtung ganzheitlich angepasst.

Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen Die Agarose-Gelelektrophorese bot sich auch als Technik zur Aufreinigung von Nukleinsäuren an. Hierzu wurde am Ende einer Elektrophorese auf dem UV-Transilluminator die jeweilige Bande mit einer sterilen Skalpellklinge geschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Hierbei war auf eine möglichst kurze UV-Expositionsdauer zu achten, um die Mutationsgefahr für die DNA (z. B. Thymin-Dimerisierungen) zu minimieren.

In der Gegenwart chaotroper Salze zeigt DNA eine große Bindungsaffinität an Silikaoberflächen. Während eines Waschschruttes mit einem ethanolischen Waschpuffer wurden makromolekulare Komponenten (z. B. Proteine) entfernt und die gereinigte DNA konnte anschließend eluiert werden. Die anschließende Aufarbeitung der einzelnen Nukleinsäurebanden aus dem Agarose-Gel erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract II-Systems (Macherey und Nagel, Düren).

Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Labortischzentrifuge (5415C, Eppendorf Centrifuge) bei RT und 11.000 g . Je 100 mg nukleinsäurehaltigem Gel wurden 200 μ l des NT-Puffers aus dem Kit zugegeben und für 10 Minuten im Wasserbad (GFL1012) bei 50 °C inkubiert. Zur Durchmischung wurde der Ansatz für 15 Sekunden gevortext. Die Lösung wurde auf eine NucleoSpin Säule aufgetragen und die DNA durch Zentrifugation für 1 Minute an die Silikamembran gebunden. Der Durchfluss wurde in einem 2 ml Auffanggefäß gesammelt und verworfen. Die Silikamembran wurde mit 600 μ l des ethanolischen NT3-Puffers gewaschen, bevor die Membran durch eine dreiminütige Zentrifugation getrocknet wurde. Zur Elution der DNA wurde die NucleoSpin Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß eingesetzt und mit 10 μ l *sdd*H₂O für 1 Minute bei RT inkubiert. Die Elution erfolgte dann mittels einer einminütigen Zentrifugation. Dieser letzte Schritt wurde wiederholt um eine maximale Ausbeute zu erhalten. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingelagert.

2.2.2.3 Didesoxy-Sequenzanalyse nach Sanger

Die Sequenzanalyse der erstellten Konstrukte erfolgte durch die Firma GENterprise GENOMICS (Mainz) oder Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

2.2.3 Nukleinsäurereaktionen

Zur Qualitätssicherung wurden stets Negativ- und falls verfügbar Positiv-Kontrollen mit durchgeführt. Auf den Einsatz von HPLC-Wasser konnte verzichtet werden und statt dessen einfaches *sdd*H₂O verwendet werden. Soweit nicht abweichend angegeben wurden alle Enzyme von Thermo Fisher Scientific Inc. bezogen.

2.2.3.1 Reverse Transkriptase-PCR

Für die geplante Amplifikation einer CDS war es notwendig aus der mRNA ein mRNA-cDNA-Hybrid anzufertigen. Hierzu wurde eine aus dem Moloney-Maus-Leukämie- bzw. Avian-Myeloblastosis-Virus isolierte reverse Transkriptase (MMLV- bzw. AMV-RTase) verwendet [126]. Die *in situ* Reaktionsführung (One-Tube/One-Step) bot den Vorteil einer geringeren Kontaminationsgefahr sowie einen geringeren Zeitaufwand. Die Two-Tube/Two-Step Reaktionsführung ermöglichte eine deutlich größere Variation der Versuchsbedingungen zur Optimierung. Aufgrund dieser Variationsmöglichkeit sollte die Two-Tube/Two-Step Reaktionsführung zum Einsatz kommen. Verwendet wurde das quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) taugliche Verso cDNA Kit (ABgene, Epsom).

Tabelle 2.16: RT-PCR-Durchführung

20,0 µl Ansatz		
Komponente	Volumen	
5x cDNA Puffer	4,0 µl	
dNTPs Mix	2,0 µl	
RNA-Primer	1,0 µl	
RT Enhancer	1,0 µl	
RNA [1ng]	1,0 – 5,0 µl	
<i>sdd</i> H ₂ O	10,0 – 5,0 µl	
Verso Enzyme Mix	1,0 µl	
Thermal Cycle Conditions		
Prozess	T[°C]	t[min]
Denaturierung	70	5
Synthese I	42	30
Synthese II	57	30
Inaktivierung	95	2
Kühlung	4	∞

Eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurden gemäß den Angaben in Tabelle 2.16 durchgeführt. Als RNA-Primer wurde ein Gemisch aus randomisierten Hexameren und einem oligo(dT) im Verhältnis 3 : 1 verwendet. Auf eine Verwendung genspezifischer Oligonukleotide wurde verzichtet. Der RT Enhancer diente der Entfernung kontaminierender DNA. Jener Enhancer degradierte doppelsträngige DNA während der Transkription der RNA. Zur Entfernung komplexer RNA-Sekundärstrukturen (wie z. B. Haarnadelstrukturen) wurde die RNA für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und umgehend auf Eis gekühlt. Abhängig vom Grad der Sekundärstrukturausbildung, konnte die Effizienz der Erststrang-Synthese durch einen zweiten Syntheseschritt bei höherer Inkubationstemperatur gesteigert werden.

2.2.3.2 Polymerase Kettenreaktion

Die 1985 durch *Saiki* [133] beschriebene Technik der Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht einen doppelsträngigen DNA-Abschnitt exponentiell zu vervielfältigen. Dies erfolgt durch die alternierende Wiederholung von Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Elongationsschritten eines gepufferten Enzym-Reaktionsgemisches. Dieses besteht aus einer DNA-Polymerase, 2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphaten, einem Primerpaar das die zu amplifizierende Region flankiert, Kofaktoren und einer Matrice, dem sogenannten Template. Die Dauer der Elongation ist im Gegensatz zur Denaturierung und Hybridisierung (auch als Annealing bezeichnet) von der Länge des zu amplifizierenden Sequenzbereichs und der Prozessivität der verwendeten DNA-Polymerase abhängig. Die Prozessivität in Verbindung mit dem Template beeinflusst die Effektivität und somit die Ausbeute, die üblicherweise zwischen $1,6^n$ und $2,0^n$ liegt. Der Ansatz und die Durchführung sind in Tabelle 2.17 gegeben. Spezialprotokolle sind an *Müller* [134] angelehnt.

Tabelle 2.17: PCR-Ansatz und Durchführung

	50,0 µl Ansatz			25,0 µl Ansatz		
	GoTaq Flexi	Phusion High-Fidelity		Power SYBR Green PCR	Master Mix	
Puffer	10,0 µl		10,0 µl		12,5 µl	
MgCl ₂ [25,0 mM]	6,0 µl		-		-	
dNTPs [2,5 mM]	4,0 µl		4,0 µl		-	
Primer 1	0,5 µl		0,25 µl		0,025 µl	
Primer 2	0,5 µl		0,25 µl		0,025 µl	
DNA-Polymerase	0,25 µl		0,50 µl		-	
<i>sdd</i> H ₂ O	23,75 µl		30,0 µl		8,0 µl	
DNA	5,0 µl [1,0 ng/µl]		5,0 µl [1,0 ng/µl]		5,0 µl [5,0 ng/µl]	

Thermal Cycle Conditions									
Prozess	T[°C]	t[s]	[n]	T[°C]	t[s]	[n]	T[°C]	t[s]	[n]
Initialdenaturierung	95	120*	1	98	30	1	95	600	1
Denaturierung	95	45		98	7		95	15	40
Annealing [†]	x	45	25-35	x+3	20	25-35	60	60	
Elongation [‡]	72	60/kbp		72	30/kbp		-	-	
Finale Elongation	72	300	1	72	300	1	-	-	-
Kühlung	4	∞	1	4	∞	1	-	-	-

* Für eine sogenannte Kolonie-PCR [134] wurde die Initialdenaturierungszeit auf 600 Sekunden verlängert.

[†] Die Annealing Temperatur x ergibt sich aus den Schmelzpunkten der verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 2.18). Hierbei war der Primer mit der niedrigeren T_M maßgebend. Im Falle der Phusion DNA-Polymerase wurde Annealing Temperatur um 3 °C erhöht.

[‡] Die Dauer der Elongation wurde durch die Länge des zu amplifizierenden Bereichs bestimmt.

2.2.3.3 Quantitative Real-Time-PCR

Die auf dem Prinzip der PCR basierende Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren bietet zusätzlich die Möglichkeit einer Quantifizierung der synthetisierten DNA. Hierfür ist ein spezieller Thermocycler sowie ein modifizierter Reaktionsansatz notwendig. Der Reaktionsansatz enthält den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff (z. B. SYBR Green I), dessen Fluoreszenz proportional zur gebundenen Menge an doppelsträngiger DNA ist. Die Fluoreszenz des asymmetrischen Cyanin-Farbstoffs SYBR Green I wird von der optischen Einheit des Thermocyclers (Applied Biosystems 7300 RT PCR System) detektiert und gespeichert. Die Analyse erfolgt nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, unter Berücksichtigung der Schmelzkurvenanalyse sowie Effizienz [72, 135, 136]. Ein Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.17 gegeben. Zur Erhebung statistisch valider Messwerte wurde stets eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Auch wurden nur relative Quantifizierungen durchgeführt.

2.2.3.4 Oligonukleotid-Primer

Für jedwede PCR sind neben der Nukleinsäure-Matrize (z.B. genomische DNA, cDNA) die Oligonukleotid-Primer essentiell. Sie binden in einem Hybridisierungsschritt an die komplementäre Sequenz der einzelsträngigen Nukleinsäure, so dass die Enzyme an Ihnen anbinden und die PCR beginnen kann. Hierbei ist die Schmelztemperatur von größter Bedeutung für den Erfolg einer Reaktion. Grundlage ihrer Berechnung ist folgende Formel:

$$T_M[^\circ\text{C}] = 69,3 + 41 \cdot \left(\frac{n_G + n_C}{n} \right) - \frac{650}{n}; n \geq 15 \quad (2.1)$$

$T_M[^\circ\text{C}]$: Schmelztemperatur; n_G : Anzahl an Guanidin; n_C : Anzahl an Cytosin; n : Gesamtnukleotidanzahl; Quelle: Eurofins MWG Operon, Ebersberg

Die Schmelztemperatur $T_M[^\circ\text{C}]$ kennzeichnet die Temperatur, bei der 50% der eingesetzten Oligonukleotid-Primer mit der komplementären DNA-Sequenz hybridisiert sind. Die Temperatur wurde experimentell mittels einer Temperaturgradienten-PCR verifiziert. Als Optimum wurde die stärkste Soll-Signalausprägung bei minimalen Hintergrund- und Nebensignalen definiert. Für das Primerdesign wurden folgende Parameter beachtet und wenn möglich eingehalten.

- $T_M [^\circ\text{C}]$: [50; 67]
- Länge [n]: [18; 35]
- GC-[%]: [40; 60], in Ausnahmefällen nur 30 bis 40% Gesamtanteil, dann aber am 3' Ende des Primers einen GC-Anteil von größer 50%.

- Repetitive Sequenzabschnitte (mehr als 6 gleiche Basen nacheinander) im Primerbereich vermeiden, um Falschpaarungen zu reduzieren.
- Keine internen Sekundärstrukturenbildung (sog. Haarnadelstrukturen).
- Keine Eigen- oder Kreuzdimerisierungen, daher eine möglichst geringe Komplementarität, ggf. "stille" Nukleotidsubstitutionen.

Das Primerdesign erfolgte mittels der Software-Pakete Primer Premier 5, Primer 7 und Serial Cloner 2.1 (Tabelle 2.35). Zur Minimierung der Sekundärstrukturenbildung wurden Nukleotide gegebenenfalls substituiert. Alle in Tabelle 2.18 aufgelisteten Oligonukleotid-Primer wurden anhand der von *Schröder et al.* [42] aufgeklärten γ -Tubulin mRNA-Sequenz von *N. tabacum* entworfen.

Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotid-Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) üblicherweise im 0,01 μmol Maßstab synthetisiert, *High Purity Salt Free* purifiziert und lyophilisiert geliefert. Unter sterilen Bedingungen wurden sie gelöst und auf eine Konzentration von 100 μM eingestellt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

Tabelle 2.18: Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T_M	Verwendungszweck
gTub_fwd_NdeI_ecoli	CAGTAAAAACATATGCGGAGAGA	54,3	Amplifikation der γ-Tubulin-cDNA-Volllängensequenz aus <i>N. tabacum</i> zur Klonierung in die MCS des pET-44a(+)-Vektors und anschließenden Expression in <i>E. coli</i> .
gTub_rev_SalI_ecoli	AGTAAGCTGTGCAC ^{NdeI} TAAAGATAAAC	50,6	
gTub_fwd_NcoI_ecoli	CCATGGCGAGAGAAAATTATAACACTGCAAG	63,7	Amplifikation der γ-Tubulin-cDNA-Volllängensequenz aus <i>N. tabacum</i> zur Klonierung in die MCS der pETMM-Vektoren und anschließenden Expression in <i>E. coli</i> mit C-terminalem Hexahistidin-Tag.
gTub_rev_His6_ecoli	GTCGAC ^{NcoI} TTA GTGGTGTTGGTGCTCGACTAAAGAT <i>SalI Stop Hexahistidin - CDS</i>	75,3	
gTub_fwd_SalI_yeast	GTCGAC CTGAG AAAAGAAATGCCGAGAGAAAATTATAACACTGCAAG <i>SalI XhoI Keo-Site</i>	65,7	Amplifikation der γ-Tubulin-cDNA-Volllängensequenz aus <i>N. tabacum</i> zur Klonierung in die MCS des pKLAC1 Vektors und anschließenden Expression in <i>K. lactis</i> mit C-terminalem Hexahistidin-Tag.
gTub_rev_SalI_yeast	GTCGAC TTA GTGGTGTTGGTGCTCGACTAAAGAT <i>SalI Stop Hexahistidin - CDS</i>	75,3	
LAC4mt_fwd	GCGGATAACAAGTCAAC	53,8	Amplifikation und Sequenzierung der MCS des pKLAC1-Vektors sowie zur Feststellung der Integration einer einzelnen oder mehrerer Tandemkopien der pKLAC1-Expressionskassette in das <i>K. lactis</i> Chromosom.
pKLAC1_rev	TTATCGCACAAAGACAATC	49,3	
Integration_1	TACCGACGTATATCAAAGCCCA	59,4	
Integration_2	ATCATCCTTGTCGCGAAAGC	59,4	
Integration_3	CAGTGATACATGCATATTGT	53,3	
gTub_fwd_129bp	ATGTCATGAGAAAGCTCC	53,8	
gTub_rev_129bp	CCTGAGTGGGATCAACTT	53,8	Amplifikation einer γ-Tubulin-cDNA-Teillängensequenz zur Kolonie-PCR mit <i>E. coli</i> .
gTub_fwd_358bp	ATGCGAAATTCACACTACGTTACCACAG	56,1	
gTub_rev_358bp	ATGCGTCGACCCCGAGTCAATAAA	51,2	
pJET_fwd_1.2	CGACTCACTATAGGGAGCGGC	55,0	
pJET_rev_1.2	AAGAACATCGATTTCATGGCAG	55,0	
T7_fwd	TAATACGACTCACTATAGGG	54,3	Amplifikation sowie Sequenzierung generischer Vektor-MCS.
Colidown_rev	TTCACTTCTGAGTTGGCATG	54,3	
M13_fwd	TGTAAACGACGGGCCAGT	53,5	
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGACC	53,5	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.18 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T _M	Verwendungszweck	
gTub_fwd_Sall	TACTCAGTCGAC AAA ATGGCGAGAGAAAATTATAACACTGCAAAGTTGGAC	64,3	Amplifikation der γ-Tubulin-cDNA-Voll- und Teillängensequenz aus <i>N. tabacum</i> zur Klonierung in die MCS des <i>pMDC7</i> -Vektors und anschließenden Expression in Pflanzen mit C terminalem Hexahistidin-Tag.	
gTub_fwd_GST	TACTCAGTCGAC ^{Sall} AAA ATGGCCCCCTATACTAGGTTATTGGA	50,9		
gTub_rev_PacI/SpeI	GTACTATTAAITTA ^{Sall} ^{Kozak} ACTAGT TTA GTGGTGCTGGTGGTCTCGAC... ...TAAAGATAAActTTGGG ^{PacI} ^{SpeI} ^{Stop} ^{Hexahistidin-CDS} GTACTATTAAITTA ^{PacI} ^{SpeI} ^{Stop} ^{Hexahistidin-CDS} ACTAGT TTA GTGGTGCTGGTGGTCTCGAC...	68,4		
gTub_rev_GST	...AGTGAGTGGAGTATACCCGGTCATAAGAAAAATGGCATCTTGGTG ^{PacI} ^{SpeI} ^{Stop} ^{Hexahistidin-CDS} GTACTATTAAITTA ^{PacI} ^{SpeI} ^{Stop} ^{Hexahistidin-CDS} ACTAGT TTA GTGGTGCTGGTGGTCTCGAC... ...GGGCCCTGAAAAATAAAGATTCTCGCTCAT	72,4 69,0		
pMDC7_fwd_MCS	TAAGATTAGATATGGATATGTATATGGAT	60,5		Amplifikation sowie Sequenzierung der pMDC7- bzw. pPZPnt-MCS.
pMDC7_rev_MCS	TTTATTAACTCTTATCCATCCATTTCG	60,7		
pPZPnt_fwd_MCS	TGATAGTGACCTTAGCGCACTTTTG	64,1		
pPZPnt_rev_MCS	CGAACGGATAAACCTTTTTCACGC	62,9		
1	TTGACAACCTATAGGAATCATCCAAC	58,1	quantitative Real-Time-PCR	
2	CTCAATAGAATTTGCTGTGGAACG	58,9		
a	GTGGTGGTGGTGGTGGTG	60,5		
b	TAACCTGGGATCAACTGTCCGA	58,4		
Ref_Actin_fwd	AAC TGATGAAGATACTCACAGAAAG	58,1		
Ref_Actin_rev	AAC TTCTGGCAGCGGAATC	59,4		
Ref_Histone3_fwd	ATGGCTCGTACGAAGCAAACT	59,4		
Ref_Histone3_rev	TGGCAATTCTCGATCAACAGC	60,3		
GFP_fwd_XhoI	ATGATCCTCGAG ^{XhoI} ^{Kozak} AAA ATGGGTAAAGGAGAAAGAACTTTT	57,5		Amplifikation einer GFP-CDS zur Klonierung in die MCS des <i>pMDC7</i> -Vektors und anschließenden Expression in Pflanzen.
GFP_rev_SpeI	ATGATCCTAGT ^{SpeI} ^{Stop} TTATTTGTATAGTTTCATCCATGCCATGT	62,8		

2.2.3.5 Restriktion

Neu entwickelte Typ-II-Restriktionsenzyme der Firma Fermentas boten den Vorteil neben der Erhöhten von thermischer Inaktivierung am Ende der Reaktion, bedingungsloser Kombinierbarkeit in einem Puffer mit einem geringen chemischen Potential sowie minimierter unspezifischer Aktivitäten. Zur Restriktion wurden ausschließlich Fermentas Restriktionsenzyme eingesetzt. Die zur γ -Tubulin-cDNA-Volllängenamplifikation verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden durch minimale Nukleotidsubstitutionen um je eine Schnittstelle erweitert. Die unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende des Amplifikats sollten eine gerichtete Insertion in die Expressionsvektoren sicherstellen. Eine einfache Differenzierung zwischen geschnittenen, teilgeschnittenen und ungeschnittenen Amplifikaten war elektrophoretisch nicht möglich. Deshalb wurden die um zwei Schnittstellen erweiterten Amplifikate in den Subklonierungsvektor *pJET1.2/blunt* ligiert, bevor das Konstrukt einem Doppelverdau unterzogen wurde, was die Differenzierung und Aufarbeitung mittels Agarose-Gelelektrophorese ermöglichte. Die Expressionsvektoren mussten vor der Ligation ebenfalls einem Doppelverdau unterzogen werden, da sie noch zirkulär vorlagen. Die beiden geschnittenen Sequenzen (Amplikat und der jeweilige Expressionsvektor) wurden dann ligiert. Die Restriktion eines Konstrukts mit anschließender gelelektrophoretischer Analyse konnte Informationen über das Insert und seine Orientierung im Vektor liefern.

Tabelle 2.19: Restriktion

20,0 µl Ansatz		
Komponente	Volumen	
10x FastDigest Puffer	2,0 µl	
DNA [1 µg]	1,0 – 5,0 µl	
<i>sdd</i> H ₂ O	15,0 – 11,0 µl	
FastDigest Enzym 1	1,0 µl	
FastDigest Enzym 2	1,0 µl	
Thermal Cycle Conditions		
Prozess	T[°C]	t[min]
Inkubation	37,0	5 – 60
Inaktivierung	80,0	2
Kühlung	4,0	∞

Die Reaktionsansätze (Tabelle 2.19) wurden gevortext und anzentrifugiert, bevor sie entsprechend im Thermocycler (Primus 25, MWG) inkubiert wurden. Die Inkubationsdauer war abhängig von der weiteren Verwendung. Für eine geplante Kontrolle eines Konstrukts reichten 5 Minuten Inkubation aus. Bei einer geplanten Klonierung wurde die Zeit entgegen der Herstellerangaben auf 60 Minuten für 1 μ g DNA verlängert, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Das einzusetzende *sddH₂O*-Volumen variierte aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen der DNA. Ein abschließender Inaktivierungsschritt bei 80 °C sollte eine weitere Aktivität der Restriktionsenzyme unter-

binden. Für eine anschließende Klonierung wurden die Reaktionsansätze mittels des NucleoSpin Extract II Kits aufgereinigt. Da die Restriktionsenzyme anderer Hersteller eine übermäßige Stabilität zeigten und nur bedingt miteinander in einem Reaktionsansatz kombinierbar waren, wurde auf eine Verwendung dieser Enzyme verzichtet.

2.2.3.6 Ligation

Zur Verknüpfung zweier DNA-Fragmente wurde eine T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet, unabhängig ob es sich um eine Blunt-End- oder Sticky-End-Ligation handelte.

Blunt-End-Ligation Bei der Blunt-End-Ligation erfolgte ein ungerichteter Einbau der zu integrierenden DNA-Sequenz in den Vektor, so dass diese Technik nur bei einer Subklonierung Verwendung fand. Der linearisierte Subklonierungsvektor *pJET1.2/blunt* bedurfte im Gegensatz zum *pGEM-T* Vektor keiner Amplifikate mit einem 3'-Adenin-Überhang, so dass auch Amplifikate einer Proofreading-DNA-Polymerase direkt ligiert werden konnten. Ferner mussten Taq-Amplifikate vor der Ligation einer blunting-Reaktion unterzogen werden. Ein weiterer Unterschied liegt in der Selektion. Diese erfolgte mittels eines Lethal-Gens und stellte keine weiteren Anforderungen an den zu transformierenden Bakterienstamm.

Der erste Teil der Reaktionsmischung (Tabelle 2.20) wurde zusammengegeben und für 5 Minuten bei 70 °C im Wasserbad (GFL 1012) inkubiert. Nach der Blunting-Reaktion erfolgte eine dreiminütige Inkubation auf Eis. Dem Blunting-Reaktionsansatz wurden dann noch Vektor und Ligase zugegeben, bevor die Mischung – abweichend von der Herstellerangaben – für 60 Minuten bei RT inkubiert wurde. Amplifikate einer Proofreading-DNA-Polymerase bedurften keiner Behandlung mit einem Blunting Enzym.

Tabelle 2.20: Blunt-End-Ligation

20,0 µl Ansatz	
Komponente	Volumen
2x Reaktions-Puffer	10,0 µl
Amplifikat	2,0 µl
<i>sddH₂O</i>	5,0 µl
DNA Blunting Enzym	1,0 µl
pJET1.2/blunt Vektor	1,0 µl
T4 DNA Ligase [5 U·l ⁻¹]	1,0 µl

Sticky-End-Ligation Eine Sticky-End-Ligation bot den Vorteil, dass die Insert Integration in den Vektor aufgrund der Überhänge weitgehend gerichtet erfolgte. Zur Klonierung einer, nur C-terminal um einen His₆-Tag erweiterten, γ -Tubulin-CDS war die Verwendung einiger Schnittstellen nicht möglich, da sie bereits innerhalb der γ -Tubulin-CDS auftraten und nur bestimmte Restriktionsschnittstellen in der MCS der Vektoren zur Verfügung standen. Zur Lösung des Problems wurden Restriktionsenzyme genutzt, die eine Kompatibilität der Schnittstellenüberhänge (wie z. B. XhoI und SalI) gewährleisten, um die γ -Tubulin-CDS in den Vektor einzubringen. Die Reaktionsmischung (Tabelle 2.21) wurde zusammengegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Alternativ konnte der Ansatz auch für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert werden.

Tabelle 2.21: Sticky-End-Ligation

20,0 µl Ansatz	
Komponente	Volumen
2x Reaktions-Puffer	10,0 µl
Amplifikat	2,0 µl
<i>sddH₂O</i>	6,0 µl
Vektor [50 ng]	1,0 µl
T4 DNA Ligase [5 U·l ⁻¹]	1,0 µl

2.3 Proteinbiochemie

2.3.1 Induktion einer heterologen Expression

Die Anzucht transgener Organismen mit induzierbaren Promotoren erfolgte in doppelt gereinigten Gefäßen. Dies diente zur Sicherstellung, dass sich zu Versuchsbeginn keine Inducer-Rückstände in den Gefäßen befanden.

2.3.1.1 IPTG vermittelte Aktivierung

Die verwendeten pET-Expressionsvektoren verfügten über einen starken T7/*lacO*-Promotor. Plasmide mit einem T7/*lacO*-Promotor verfügen über eine zusätzliche, downstream gelegene *lac* Operator-Sequenz sowie eine upstream gelegene *lacI*-CDS, die dauerhaft transkribiert und translatiert wird (Abbildung 2.8). Der Vorteil des T7/*lacO*- gegenüber einem einfachen T7-Promotor bestand in der reduzierten Basalexpression. Zwecks der beabsichtigten heterologen Proteinexpression ist ein Bakterienstamm nötig der über eine kontrollierte T7-RNA-Polymerase-Aktivität verfügt, wie der BL21(DE3)-Stamm. Die Expression der T7-RNA-Polymerase in den Bakterien

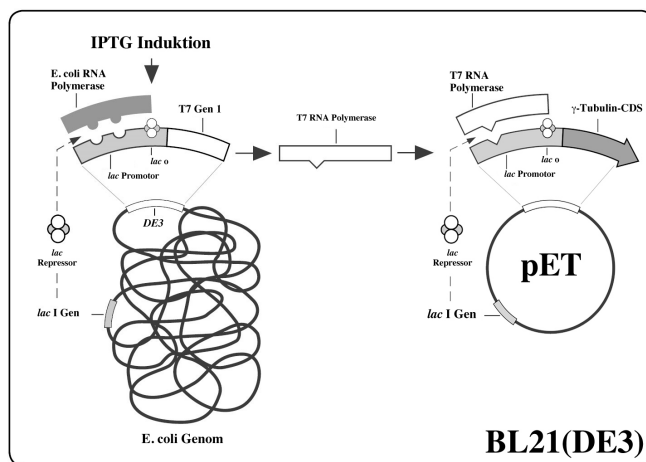


Abbildung 2.8: Induktionsschema der Proteinexpression durch IPTG-Zugabe [8, 77]

unterliegt der Kontrolle eines *lac*-Operators und wird durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) aktiviert. IPTG ist im Gegensatz zu Lactose und Allolactose nicht durch die Bakterien metabolisierbar, somit gilt $\frac{dc(IPTG)[M]}{dt[Stunden]}=0$. Aufgrund einer Mutation im *lac*-Operon ist es möglich die Bakterien in einem mit Glucose angereicherten Nährmedium anzuziehen, was zu gesteigerten Wachstumsleistungen der Bakterien und somit einer gesteigerten Proteinausbeute führt [77].

Eine pET-Vektor tragende BL21(DE3) Dauerkultur wurde in LB-Amp-Medium für 16 Stunden bei 37 °C und 150 rpm angezogen. Nach der Zugabe von 2 ml der Starterkultur in 200 ml frisches LB-Amp-Medium, das 50 mM Glucose enthielt, folgte eine Inkubation für ca. 3 Stunden bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer $OD_{600} = 1,0 \pm 0,05$. Durch die Zugabe 200 μ l einer 1 M IPTG-Lösung wurde die Proteinexpression induziert. Nach einer Inkubation für 3 Stunden bei 37 °C und 150 rpm wurden die Bakterien aus der Suspension isoliert zur Proteinextraktion.

2.3.1.2 17β -Estradiol vermittelte Aktivierung

Der verwendete pMDC7-Vektor verfügt über ein sogenanntes chimäres Transkriptions-Aktivator-System, kurz XVE, das von *Zuo et al.* [81] erstmalig beschrieben wurde. Das XVE-Fusionsprotein steht unter Kontrolle eines starken, konstitutiven P_{G10-90} Promotors [137]. XVE besteht aus der DNA-Bindedomäne des bakteriellen Repressors *LexA*, einer Transaktivierungsdomäne *VP16* [138] sowie der regulatorischen Region des menschlichen Östrogen-Rezeptors *hER* (Abbildung 2.9). Die Transkriptions-Aktivator Aktivität ist durch Östrogene reguliert.

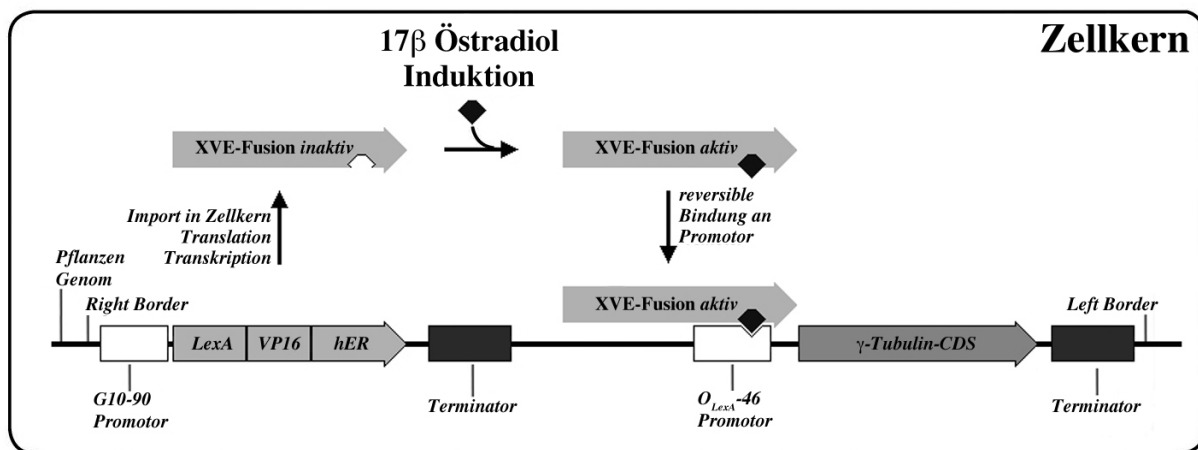


Abbildung 2.9: Induktion der Proteinexpression in Pflanzenzellen durch 17β -Estradiol

Gezeigt ist hier nur die Region zwischen der Right und Left Border, ausgenommen des Hyg^R *Zuo et al.* [81].

Erst der Induktor-XVE-Komplex ist in der Lage an den $O_{LexA-46}$ -Promotor zu binden und die Transkription der Zielsequenz einzuleiten. Dieses System zeichnet sich durch eine sehr niedrige Basalexpression, aber schnelle Reaktion auf den Inducer aus. Ferner sind bisher keine pflanzenendogene Inducer sowie toxische oder physiologische Effekte exogener Inducer bekannt [81, 139]. Für dieses System besteht ein sigmoidaler Dosis-Wirkungszusammenhang, auch konnten bisher erste Proteine in dicotylen Pflanzen exprimiert werden. Die Transkriptionen des XVE-Systems liegen deutlich über denen des etablierten 35S-Systems, allesamt wichtige Faktoren, die für eine Verwendung eines solchen Systems sprechen.

Da von der 17β -Estradiol-Stammlösung [50,0 mM in DMSO gelöst] ein erhebliches gesundheitliches Risiko für den Experimentator ausgeht, erfolgte die Induktion durch die Zugabe eines um 17β -Estradiol angereicherten Hoagland-Nährmediums.

Eine Applikation als Aerosol – welche weitgehend verbreitet ist – wurde aus den oben genannten Gründen strikt abgelehnt.

2.3.2 Proteinisolation

2.3.2.1 Denaturierende Proteinisolation

Tabelle 2.22: Denaturierungspuffer

Komponente	Konzentration
Tris	62,50 mM
SDS	2,0 Vol.-%
β -ME	5,0 Vol.-%
pH = 6,8 $\pm$ 0,05	

Die Extraktion des Pflanzenmaterials unterschied sich von der des Bakterienmaterials durch einen zusätzlichen Aufarbeitungsschritt mit Aceton. Das homogenisierte Probenmaterial wurde zur weiteren Aufarbeitung in einem Tris/SDS-haltigen Denaturierungspuffer (verändert nach *Lämmli* [140]) nachfolgender Zusammensetzung aufgenommen, aufgeköcht und durch Zentrifugation von dem verbliebenen Zellrückstand befreit. Die Proteinextrakte wurden bei 4 °C gelagert.

Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial Zuerst wurde das Pflanzenmaterial homogenisiert. 200 mg des Probenmaterials wurden in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff homogenisiert und anschließend in 1,0 ml Aceton aufgenommen. Nach einer zwanzigminütigen Fällung auf Eis wurde die Probe bei 4 °C und 4.000 xg für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Wasch- und Fällungsschritt wiederholt. Das erhaltene proteinhaltige Pellet wurde getrocknet und in 200 μ l Denaturierungspuffer resuspendiert. Die Probe wurde dann für 5 Minuten bei 95 – 100 °C aufgeköcht. Durch abschließende Zentrifugation (Biofuge A, Heraeus) bei RT für 30 Minuten und 13.000 xg sollten alle Zellrückstände entfernt werden. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und eingelagert.

Proteinextraktion aus Bakterien Die Extraktion erfolgte analog der aus Pflanzenmaterial. 200 mg der im Mörser homogenisierten Probe wurden in 300 μ l des Denaturierungspuffers aufgenommen und für 5 Minuten bei 95 bis 100 °C aufgeköcht. Die Sedimentation der Zelldebris erfolgte durch Zentrifugation bei RT für 30 Minuten und 13.000 xg . Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und eingelagert.

2.3.2.2 Native Proteinisolation aus *E. coli*

Um einen möglichst schonenden Aufschluss zu gewährleisten boten sich zwei Techniken an. Zum Einen eine Behandlung mit Lysozym und zum Anderen eine Ultraschallbehandlung. Gegen eine Behandlung mit Lysozym sprachen der zu verwendende detergenzienfreie Puffer sowie die Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C. Ein detergenzienfreier Puffer hätte negative Einflüsse auf Proteinqualität haben können und die Inkubation begünstigte potentiell enthaltene Proteasen. Eine Ultraschallbehandlung erfolgte auf Eis und stellte keine Anforderungen an den Puffer.

Zum Zellaufschluss wurden die Bakterien nach der Inkubation durch eine zehminütige Zentrifugation bei 4 °C und 7.000xg pelletiert, bevor sie im Aufschlusspuffer resuspendiert und einer Ultraschallbehandlung auf Eis unterzogen wurden. Der Ultraschallhomogenisator (Sonopuls HD 2200 mit TT13 Titanteller) wurde mit 50% Leistung für 7 Minuten (0,2 Sekunden Pulsintervall) betrieben. Die Suspension wurde für 60 Minuten bei 4 °C und 13.000xg zentrifugiert (Beckmann J2-21, JA 14 Rotor) zur Entfernung etwaiger verbliebener Zellen sowie Zelldebris. Gegebenenfalls wurde der Überstand noch mit einem Spritzenvorsatzfilter (Carl Roth, 0,22 µm, PVDF) filtriert.

Tabelle 2.23: Aufschlusspuffer

Komponente	Konzentration
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	50,0 mM
KCl	500,0 mM
MgCl ₂	1,0 µM
GTP	1,0 µM
1-Thioglycerol	10,0 mM
Complete EDTA-free Protease Inhibitor pH = 8,0±0,05	1 Tablette/50,0 ml

2.3.2.3 Native Proteinextraktion aus pflanzlichen Geweben

Die Extraktion nativer, aktiver Proteine stellte besondere Anforderungen an die Aufarbeitung des Probenmaterials. Zur Reduktion der Proteasenaktivität wurden die Proben in einer Kühlkammer bei 4 °C Umgebungstemperatur mit einem Mörser in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das Homogenisat wurde in Aufschlusspuffer (Tabelle 2.23) suspendiert und zusätzlich auf Eis mit einem Potter-Elvehjem-Gewebehomogenisator mit Teflon-Pistil weiter homogenisiert. Die Suspension wurde für 60 Minuten bei 4 °C und 13.000xg zentrifugiert (Beckmann J2-21, JA 14 Rotor) zur Entfernung etwaiger verbliebener Zellen sowie Zelldebris. Gegebenenfalls wurde der Überstand noch mit einem Spritzenvorsatzfilter (Carl Roth, 0,22 µm, PVDF) filtriert.

2.3.3 Proteincharakterisierung und -nachweis

2.3.3.1 Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Versuchsergebnisse erforderten den Einsatz zweier Proteinbestimmungsmethoden. Der Proteingehalt der Extrakte wurde stets mit der von *Bradford* [141] vorgestellten Methode quantifiziert. Die Eluate der immobilisierten Metall-Affinitätschromatographie wurden durch die von *Warburg* [142] etablierte Methode auf ihren Proteingehalt hin untersucht.

Bestimmung nach Bradford Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Zuhilfenahme des Farbstoffes Coomassie-Brillantblau G250 (auch häufig als Acid Blue 90 bezeichnet). Aufgrund der Wechselwirkungen des Triarylmethan-Farbstoffes mit den Proteinen unter sauren Reaktionsbedingungen wird der Farbstoff in seiner anionischen Sulfatform stabilisiert. Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von $\lambda = 470$ nm zu $\lambda = 595$ nm.

Da die Komplexbildungsreaktion näherungsweise quantitativ verläuft, ist es möglich Aussagen über die Proteinkonzentration der gemessenen Lösung zu treffen (in Korrelation zu einer Rinder-serumalbumin (BSA)-Eichlösung). Dies ist auch der Schwachpunkt der Messmethode. Für jedes Protein(extrakt) wäre eine eigene Eichlösung erforderlich, dennoch sind die BSA-Referenz-Werte ausreichend valide [143]. Die Bradford-Methode eignet sich am besten zur Bestimmung von Proteinmengen im Bereich von 1 – 10 mg, wobei die Nachweisgrenze bei 0,05 - 0,5 mg · ml⁻¹ liegt [84]. Das zu untersuchende Proteinextrakt wurde mit *sdd*H₂O um den Faktor 1.000 verdünnt. Dies war erforderlich, da das verwendete Protein Assay (Bio-Rad, Richmond, USA) sehr sensitiv auf SDS (≥ 0,1 Gew.-%) und β-ME (≥ 1,0 M) reagiert. Als Referenzwert wurde der Denaturierungspuffer analog verdünnt. Vor der eigentlichen Proteinbestimmung war die Erstellung einer Kalibrierungsgeraden erforderlich. Hierzu wurden BSA-Referenzproben hergestellt und analog der Extraktproben bei λ = 595 nm gemessen. Die Steigung *m* ist essentiell für die Konzentrationsbestimmung und ergab sich aus der 1. Ableitung der Extinktion nach der Konzentration.

Zur Messung wurden 200 µl des Bio-Rad Protein Assay mit 800 µl der Probe in einer Einküvette aus Polystyrol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) zusammengegeben und durchmischt. Nach 5 Minuten wurde die Probe im Spektralphotometer (Typ U-1100, Hitachi) nach einem Nullabgleich vermessen. Zur Validierung wurde die Messung dreifach wiederholt. War die Standardabweichung kleiner 0,03, so wurde aus den Messwerten ein Mittelwert gebildet und für die weiteren Berechnungen verwendet. Die Berechnung des Proteingehalts ergab sich nach folgender Gleichung:

$$c_{Protein}[\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}] = \frac{A_{595} \cdot 1000}{m_{Kalibrierungsgerade} \cdot 800} \quad (2.2)$$

Bestimmung nach Warburg Im Gegensatz zur Kolorimetrie ist diese Methode störunempfindlicher. Auch verfügt Methode nach Warburg über einen größeren Messbereich (20 – 3.000 µg * ml⁻¹) im Vergleich zum Bradford-Assay [126]. Die Nachweismethode beruht auf den einzelnen Absorptionsbeiträgen der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und in geringem Maße Phenylalanin, im Bereich von λ = 260 bzw. λ = 280 nm. Schwachpunkte dieser Methode sind die geringe Sensitivität und dass nur aromatische Aminosäuren nachgewiesen werden. Die heterogene Aminosäurezusammensetzung der Protein gilt es bei der Ergebnisauswertung zu berücksichtigen. Mittels des zweiten Teils des nachfolgenden Terms und der Faktoren wurde dem potentiell vorhandenen Nukleinsäureanteil und dem Lösemittleffekt Rechnung getragen.

$$c_{Protein}[\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}] = 1,55 \cdot OD_{280} - 0,76 \cdot OD_{260} \quad (2.3)$$

Die Quantifizierung der IMAC-Eluate erfolgte mit Hilfe der Warburg-Methode, da Imidazol störend auf den Bradford-Protein-Assay wirkt. Eine photometrische Bestimmung bei $\lambda = 205$ nm, einer von der Proteinzusammensetzung unabhängigen Messmethode, konnte ebenfalls aufgrund des im Elutionspuffer enthaltenen Imidazols nicht durchgeführt werden. Bei $\lambda = 205$ nm zeigt die Peptid-Bindung ein Absorptionsmaximum, ebenso wie Imidazol.

Die Proben wurden im Spektralphotometer (Typ U-1100, Hitachi) in einer Quarzglas-Küvette bei $\lambda = 260$ nm bzw. $\lambda = 280$ nm gemessen. Zum Nullabgleich wurde die jeweilige Elutionslösung verwendet.

2.3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von Proteingemischen erfolgte mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierbei überdeckt das anionische Detergenz SDS die Eigenladung der Proteine effektiv, so dass Micellen mit einer konstanten negativen Ladung pro Masseneinheit des Proteins entstehen [126]. Zur Probenvorbereitung wird das Proteinextrakt in einem SDS- und β -ME-haltigen Puffer aufgenommen und durch 5 minütiges aufkochen denaturiert. Dies ist notwendig, da SDS bei nicht oder zu kurzem Aufkochen nur unzureichend die Proteine maskiert, was zu einem abnormen Laufverhalten führt. Dies ist mit der kinetischen Stabilität der Proteine zu erklären [146]. In einem elektrischen Feld wandert der SDS-Protein-Komplex zur Anode. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf [144]. Durch den Einsatz von Kalibrierungsstandards ist es möglich innerhalb eines bestimmten linearen Bereichs eines Gels quantitative Aussagen über das Molekulargewicht des Polypeptids zu treffen (Abbildung 2.10). Das verwendete diskontinuierliche Tris-Puffersystem aus Sammel- und Trenngel basiert auf einem modifizierten Lämmli-System [140]. Der Vernetzungsgrad und damit die Porenweite ist durch die Konzentration an Acryl-/Bisacrylamid und dem Verhältnis der beiden Vernetzer zueinander determiniert. Die Polymerisation wird durch die Zugabe des Radikalbildners Ammoniumpersulfat (APS) und des Katalysators N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) initiiert.

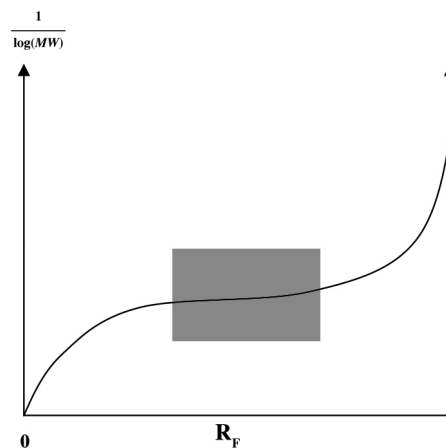


Abbildung 2.10: **Molekulargewicht als Funktion des R_F -Wertes**

Der Bereich in dem näherungsweise ein linearer Zusammenhang gilt ist grau unterlegt. Die Lage dessen ist von der Konzentration an Acrylamid und somit dem Vernetzungsgrad abhängig (vgl. Abbildung 1-2: Laufverhalten von Molekulargewichtsmarkern in SDS-Gelen [144]). R_F : Retentionsfaktor [126, 145].

Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Mini-Protean II Dual Slab Cell-System* (Bio-Rad, Richmond, USA) in Verbindung mit der Multi-Casting Chamber verwendet. Die Gele wurden in der Gießvorrichtung gemäß den Herstellerangaben angefertigt. Das Trenngel ($8,3 \cdot 5,0 \text{ cm} \cdot 0,1 \text{ cm}$) wurde in die Sandwich-Kammer gegossen und dann mit Ethanol (20 Vol.-%) überschichtet. Der Ethanol sollte den bei der Polymerisation inhibierend wirkenden Luftsauerstoff vom Reaktionsgemisch abtrennen. Nach 60 Minuten war von einer vollständigen Polymerisation auszugehen. Die Initiation der Polymerisation des Sammelgels erfolgte mit APS und TEMED, anschließend wurde das Trenngel mit der Sammelgel-Reaktionsmischung überschichtet ($8,3 \cdot 1,0 \text{ cm} \cdot 0,1 \text{ cm}$). In die Sammelgel-Reaktionsmischung wurde noch ein Probenkamm für 10 bzw. 15 Probenaschen eingesetzt, bevor es für ebenfalls 60 Minuten inkubierte.

Tabelle 2.24: SDS-PAGE-Puffer und Gelzusammensetzung für 2 Gele

Puffer	Zusammensetzung		Trenngel 10,0 Vol.-%	Sammelgel 4,0 Vol.-%
T-Puffer	Tris pH = $8,8 \pm 0,05$	1,5 M	2,50 ml	-
S-Puffer	Tris pH = $6,8 \pm 0,05$	0,5 M	-	2,50 ml
Acryl-/Bisacrylamid [†]	Acrylamid Bisacrylamid	29,2 Gew.-% 0,8 Gew.-%	3,33 ml	1,33 ml
SDS Stock	SDS	10,0 Gew.-%	0,10 ml	
APS [‡]	APS	10,0 Gew.-%	60,0 μl	80,0 μl
TEMED [‡]	TEMED	6,63 M	5,0 μl	10,0 μl
<i>sddH</i> ₂ O [†]			4,0 ml	6,0 ml
Probenpuffer	Glycerol	10,0 Vol.-%		
	β -ME	5,0 Vol.-%		
	SDS	2,0 Vol.-%		
	Bromphenolblau	0,012 Vol.-%		
	Tris	62,50 mM		

[†] Abhängig von den zu trennenden Proben wurde die Acryl-/Bisacrylamid-Konzentration angepasst [144].

[‡] Diese Komponenten wurden erst kurz vor Gebrauch zugegeben.

Die APS-Lösung war bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Alle sonstigen zur SDS-PAGE notwendigen Lösungen wurden im Kühlschrank gelagert. Die SDS-Stammlösung musste vor Gebrauch erwärmt werden um das ausgefallene SDS wieder in Lösung zu bringen.

Kalibrierungsstandard für die SDS-PAGE Als Standard wurden ausschließlich der *Roti-Mark Standard* (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und *PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet.

Durchführung einer SDS-PAGE Das verwendete Gelelektrophoresesystem erforderte bauartbedingt stets zwei Polyacrylamidgele zur Abdichtung der Gelelektrophoresekammer, auch wenn nur eines mit Proben beladen wurde. Nach dem Zusammenbau der Kammer wurde diese mit Laufpuffer befüllt und die Probenkämme des Gels entfernt. Die Probenvorbereitung war erforderlich, da zur vollständigen Denaturierung von Protein-Sekundärstrukturen eine einfache Behandlung mit SDS nicht ausreicht [146]. Hierzu wurden im Regelfall 15 µg Gesamtprotein mit 10 µl Probenpuffer in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß zusammen pipettiert. Das notwendige Volumen errechnete sich aus der Proteinbestimmung nach Bradford. Im Falle der mit einer Ni²⁺-Sephrose-Matrix aufgereinigten Proteinproben wurden 10 µl des jeweiligen Eluats mit 10 µl Probenpuffer versetzt und analog den anderen Proben behandelt. Eine Inkubation bei 95 – 100 °C für 5 Minuten in einem Wasserbad sorgte für die vollständige Denaturierung der Proteine. Nun konnten die vorbereiteten Proben in die Geltaschen eingebracht und die Elektrophorese gestartet werden. Das ebenfalls im Probenpuffer enthaltene Glycerol bewirkte, aufgrund seiner höheren Dichte und der bedingungslosen Mischbarkeit mit Wasser beim Pipettieren ein Herabsinken der Probe in die Geltasche. Der Kalibrierungsstandard bedurfte keiner Vorbereitung und so konnten 5,0 µl direkt aufgetragen werden. Die Spannung $U = 200 \text{ V}$ wurde mittels eines PowerPac 3000-Netzteils (Bio-Rad, Richmond, USA) in der Elektrophoresekammer angelegt und für die Dauer von ca. 50 Minuten gehalten. Der im Probenpuffer enthaltene inerte Farbstoff Bromphenolblau verfügt über eine Mobilität (dem Quotienten aus Permeabilität und Viskosität) vergleichbar mit einem 20 kDa Polypeptid in einem Gel der zuvor genannten Zusammensetzung (Tabelle 2.24). War während der Elektrophorese an der unten gelegenen Kathode eine Blasenbildung zu beobachten, wurde die Elektrophorese kurzzeitig unterbrochen und die Blase entfernt. Dies sollte die Ausbildung eines homogenen elektrischen Feldes gewährleisten, das ein homogenes Laufverhalten der Proteine bewirkt. Zur späteren Größeneinschätzung der Proteine war dies essentiell. Ein Gel mit einem unregelmäßigen Laufverhalten der Proteine war hierfür nicht verwendbar. Am Ende der Elektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt und das Trenngel in seiner Orientierung markiert. Je nach Verwendungszweck wurde es zur Gesamtproteinfärbung in eine Fixier- und Färbelösung eingebracht oder für einen sich direkt anschließenden Western-Blot in einen Transferpuffer überführt.

Gesamtproteinfärbung und Konservierung eines Polyacrylamidgels Nach der elektrophoretischen Größentrennung der Proteine wurde das Polyacrylamidgel in eine kombinierte Fixier- und Färbelösung überführt. Grundlage der Fixierung war die Proteinfällung in einer ethanolisch-essigsäuren Lösung. Hierbei fallen die Proteine aufgrund der Schwächung ihrer Hydrathülle aus und bleiben somit in der Polyacrylamid-Matrix fixiert. Die Färbung der Proteine erfolgte mit dem auch bei der Bradford-Bestimmung eingesetzten Coomassie-Brillantblau G250.

Tabelle 2.25: Lösungen zur Proteinfärbung und Konservierung

Lösung	Komponente	Konzentration
Fixier-/Färbelösung	EtOH	30,0 Vol.-%
	Essigsäure	10,0 Vol.-%
	Coomassie-Brilliantblau	0,10 Gew.-%
Trocknerlösung	Methanol	25,0 Vol.-%
	2-Propanol	10,0 Vol.-%
	Glycerol	2,0 Vol.-%

Zur Gesamtproteinfärbung wurde das Polyacrylamidgel direkt nach der Elektrophorese in die Fixier-/Färbelösung (Tabelle 2.25) eingebracht und für 1 Stunde auf einem Rotationsschütteltisch (Reax 3) bei niedriger Drehzahl inkubiert. Alternativ war es möglich das Gel für 16 Stunden im Kühlschrank

mit der Fixier-/Färbelösung zu inkubieren. Zur Entfernung des ungebundenen Coomassie-Brilliantblau-Farbstoffes wurde das Gel in *sdd*H₂O überführt und für 15 Minuten in einer Mikrowelle (MicroChef FM 350, Moulinex) aufgeköcht. Dieser Schritt wurde wiederholt bis distinkte Banden erkennbar wurden.

Zur Konservierung der Gele wurden sie für 30 Minuten auf einem Rotationsschütteltisch (Reax 3) in einer Trocknerlösung inkubiert bevor sie luftblasenfrei in Zellglasfolie (Folia Paper Bringmann, Wedelstein) eingeschlagen werden konnten. Die Zellglasfolie wurde mit Klebestreifen auf einer Glasplatte fixiert und zum Trocknen bei RT ausgelegt. Zur Dokumentation wurden sie mit einem Scanner digitalisiert und ggf. mit dem Programm Adobe Photoshop nachbearbeitet.

Alternativ bot sich noch eine deutlich sensitivere Färbemethode durch kolloidales-Coomassie nach Kang *et al.* [147] und Candiano *et al.* [148] an, vor allem wenn die Proben für weitere proteinbiochemische Analysen verwendet werden sollten. Die Färbung ist bereits nach 3 Stunden weitgehend abgeschlossen ohne nennenswerte Hintergrundfärbung. Die dunkelgrüne

Tabelle 2.26: Lösungen zur kolloidalen Proteinfärbung und Konservierung

Lösung	Komponente	Konzentration
Färbelösung Kolloid	EtOH	10,0 Vol.-%
	ortho-Phosphorsäure	2,0 Vol.-%
	Aluminiumsulfat-(18)-Hydrat	5,0 Gew.-%
	Coomassie-Brilliantblau	0,02 Gew.-%
Entfärber-Lösung	EtOH	10,0 Vol.-%
	ortho-Phosphorsäure 85 Vol.-%	2,3 Vol.-%

Zur Herstellung der Färbelösung gilt es zuerst das Aluminiumsulfat in *sdd*H₂O zu lösen, EtOH zuzugeben, durchmischen und erst dann Coomassie-Brilliantblau und ortho-Phosphorsäure zugeben. Als Entfärber-Lösung kann auch *sdd*H₂O verwendet werden.

mehrfach zu gebrauchen, sollte jedoch bei einer deutlichen Blaufärbung nicht weiter verwendet und entsorgt werden.

Lösung ist streng genommen eine Suspension in der schwimmende kolloidale Coomassie-Partikel vor jedem Gebrauch aufzuschlämmen sind. Die SDS-PAGE-Gele müssen vor der Zugabe der kolloidalen Färbelösung mindestens zweimal mit *sdd*H₂O unter schütteln für je 15 Minuten gewaschen werden. Das enthaltene SDS würde sonst eine sehr starke Hintergrundfärbung verursachen. Die Lösung ist

2.3.3.3 Western Blot

Der Ausdruck Western-Blot umfasst das Proteinblotting auf eine Membran mit anschließender Immunodetektion. Beim Elektrophoretoblotting werden die zuvor mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, in einem orthogonal angelegten elektrischen Feld aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Membran transferiert. Die in der Gelelektrophorese erzielte Auftrennung der Proteine bleibt hierbei erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit kam die von *Kyhse-Andersen* [149] vorgestellte semidry-Technik zum Einsatz. Sie besteht aus Plattenelektroden, zwischen denen das sogenannte Blotsandwich aus Filterpapieren, Membran und Gel eingebracht wird (Abbildung 2.11). Gegenüber der Tankblotting-Technik bietet sie den Vorteil eines geringen Puffervolumens und bedarf keines Kühlsystems [126].

Proteintransfer Die verwendete Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Tranfer Cell (Bio-Rad, Richmond, USA) wurde mit einem PowerPac 200-Netzteil (Bio-Rad, Richmond, USA) betrieben. Vor Beginn des Elektrophoretoblottings wurden die PVDF-Membran (Immobilin P, Millipore, Eschborn) sowie 2 Filterpapierstücke (Schleicher & Schuell Cle-Blotting-Papier, Dassel) in Größe des Trenngels ($8,3 \cdot 5,0$ cm) und 2 etwas größere Filterpapierstücke ($10,0 \cdot 6,0$ cm) zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung für 1 Minute in ein Methanolbad gegeben. Danach wurde das PAGE-Gel aus der Laufapparatur entnommen, das Sammelgel vom Trenngel entfernt und das Trenngel in seiner Orientierung markiert. Anschließend wurde das Trenngel mit allen 4 Filterpapieren und der aktivierten PVDF-Membran in einem Transferpufferbad für 30 Minuten auf einem Rotationsschütteltisch (Reax 3) bei niedriger Drehzahl äquilibriert. Beim Aufbau der Apparatur war darauf zu achten, dass jede einzelne Schicht luftblasenfrei und bündig auf die vorherige aufgebracht wurde. Dies sollte eine homogene Ausbreitung des elektrischen Feldes sicherstellen.

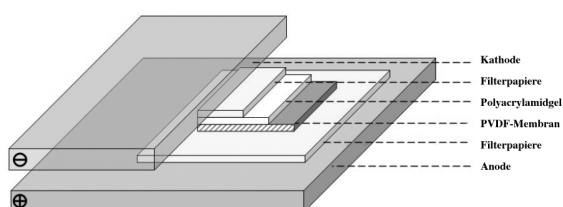


Abbildung 2.11: **Aufbau einer Blot-Apparatur** [8, 126, 149]

Tabelle 2.27: Lösungen zum Elektrophoretoblotting

Lösung	Komponente	Konzentration
Transferpuffer	Methanol	20,0 Vol.-%
	SDS	0,0375 Gew.-%
	Tris	48,0 mM
	Glycerol	39,0 mM
Ponceau-Rot	TCA	3,0 Gew.-%
	Ponceau S	0,40 Gew.-%
TBST-Puffer	Tween20	0,10 Vol.-%
	NaCl	137,0 mM
	Tris	20,0 mM
	pH = 7,6	
TBST-MP-Puffer	TBST-Puffer	
	Milchpulver	5,0 Gew.-%

Die beiden größeren Filterpapiere bedeckten die Platin-Anode. Auf die Filterpapiere wurde die PVDF-Membran, mit der hydrophoben Seite zur Kathode orientiert, aufgebracht. Darüber wurde das Polyacrylamidgel gelegt, das dann mit den zwei kleineren Filterpapieren überschichtet wurde. Nach dem Verriegeln der Elektroblothing-semidry-Apparatur wurde zum Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran für 25 Minuten eine Spannung von $U = 12 \text{ V}$ zwischen den Platinelektroden angelegt.

Am Ende des elektroblothing Vorganges wurde die PVDF-Membran analog des Polyacrylamidgels in ihrer Orientierung markiert und einer Kontrollfärbung unterzogen. Die reversible Färbung der Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte mit dem Azofarbstoff Ponceau Rot S. Hierzu wurde die Membran kurz in ein Farbstoffbad getaucht und danach mehrfach mit TBST-Puffer gewaschen bis distinkte Banden zu erkennen waren. Danach wurde die Membran durch je einen 5 minütigen und einen 10 minütigen Waschschrift in TBST-Puffer vollständig entfärbt.

Zur Vorbereitung des immunochemischen Proteinnachweises wurde die Membran in einen TBST-MP-Puffer überführt und für 16 Stunden bei 4°C zwischengelagert.

Immunochemischer Proteinnachweis Der immunochemische Proteinnachweis erfolgte durch das nicht radioaktive binäre Antikörper-ECL-System. Ein primärer Antikörper bindet an das Zielprotein auf der PVDF-Membran und wird von einem sekundären Antikörper erkannt, der daran bindet. Der sekundäre Antikörper trägt eine HRP, die unter leicht alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) zur 5-Aminophthalsäure katalysiert. Hierbei kommt es zur Freisetzung von Lichtquanten. Das Emissionsspektrum zeigt ein Maximum bei $\lambda = 428 \text{ nm}$, das mit einem Blaulicht sensitiven Film bzw. Kamerasystem detektiert werden kann. Als primärer Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene Antikörper eingesetzt. Der von Schlag [45] dargestellte und gegen die pflanzliche Joshi-Dömäne [37] gerichtete polyklonale γ -Tubulin-Antikörper, wurde stets aus Serum aufgearbeitet. Nach der

nächtlichen Inkubation der PVDF-Membran in einem Milchpulverpuffer wurde die Membran mit TBST-Puffer zweimal kurz und je einmal für 5 und 15 Minuten gewaschen. Die Inkubation im Milchpulverpuffer diente der Blockierung der freien, nicht proteinhaltigen Oberfläche.

Tabelle 2.28: Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Organismus	Lieferant
Anti- γ -Tubulin	1:250	Kaninchen	Covalab
Anti-His ₆	1:3.000	Maus	GE Healthcare
Anti-GFP	1:1.000	Maus	Roche
HRP anti-Rabbit	1:2.500	Schaf	GE Healthcare
HRP anti-Mouse	1:2.500	Schaf	GE Healthcare

Dies war erforderlich, da sonst die unspezifische Antikörper-Membran Bindung ein starkes Hintergrundsignal erzeugt, vor dem eine Differenzierung des Blotergebnisses nicht mehr möglich ist. Die Membran wurde mit 2,0 ml TBST-MP-Puffer überschichtet und ein aus Tabelle 2.28 zu entnehmendes Volumen des Primärantikörpers zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde unter konstantem Schütteln bei RT. Um Verdunstung und damit verbundene Konzentrationsveränderungen zu vermeiden wurde das Inkubationsgefäß mit einem Deckel verschlossen. Am Ende der Inkubation wurde die Membran erneut einer Waschprozedur unterzogen (analog jener zu Beginn).

Zur Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran ebenfalls in 2,0 ml TBST-MP-Puffer aufgenommen und der jeweilige Sekundärantikörper zugesetzt. Die sich anschließende Inkubation und die nachgeschaltete Waschprozedur verlief analog zu den Vorherigen.

Durchführung der ECL-Reaktion Die ECL-Lösungen I und II des ECL Western blotting detection reagents analysis system (Amersham, Braunschweig) wurden zu gleichen Teilen zusammengegeben. Das Gesamtvolumen ergab sich aus der Fläche der PVDF-Membran, folglich wurden 0,125 ml des ECL-Gemisches pro cm² Membran benötigt. Alternativ wurden ECL-Reaktionen mit selbst angesetzten Reagenzien durchgeführt. Der Vorteil lag in einer immensen Kosteneinsparung bei vergleichbarer Signalintensität [150]. Die Komponenten wurden kurz vor der Dokumentation zusammen gegeben (Tabelle 2.29).

Tabelle 2.29: ECL-Ansatz

Substanz	Konzentration	Volumen
Tris pH = 8,5±0,05	100 mM	5,0 ml
p-Cumarsäure	90 mM in DMSO	11,0 µl
Luminol	250 mM in DMSO	25,0 µl
H ₂ O ₂	10,0 Vol.-%	5,0 µl

Analoge ECL-Dokumentation Zu Beginn der Arbeit erfolgte die ECL-Dokumentation mit einem Autoradiographiefilm. Die PVDF-Membran wurde in eine Klarsichtfolientasche eingebracht und die ECL-Lösung hinzugegeben. Nach einminütiger Inkubation wurde die ECL-Lösung entfernt und die Membran luftbalsenfrei eingeschweißt. Die eingeschweißte Membran wurde in einer Filmkassette (Cronex Lightning Plus, DuPont) fixiert.

Die nachfolgenden Arbeiten erfolgten bei gedämpftem Rotlicht. Ein Bogen des Autoradiographiefilms (Cronex 5, Agfa) wurde zugeschnitten, auf die in Folie eingeschweißte Membran aufgelegt und die Filmkassette arretiert. Die Belichtung erfolgte für 2, 4, 8, 16 und 32 Minuten. Die Zeiten ergaben sich aus dem Intensitäts-Zeit-Profil der ECL-Reaktion. Nach der Belichtung wurde der Filmstreifen für 5 Minuten in ein Entwicklerbad eingebracht und durch ein Wasserbad unterbrochen, bevor eine einminütige Fixierung erfolgte.

Digitale ECL-Dokumentation In späteren Phasen der Arbeit wurde ein digitales ECL-Dokumentationssystem etabliert. Das verwendete System war ein 16 bit Deep Sky Imager II-System mit einem ICX429ALL-CCD Sensor von Meade. Bei einer Chipgröße von 5,59 mm · 4,68 mm · 1,27 cm, einer Auflösung von 752 x 582 Pixel und einem Dynamikumfang von 1:7.000 (Full Well Capacity: ca. 70.000; Noise: 10 Elektronen) war der Chip optimal für die ECL-Dokumentation geeignet. Die Kamera wurde via USB an einen Desktop-Computer angeschlossen und mittels der Software Autostar Envisage gesteuert.

Entfernung gebundener Antikörper Eine Überprüfung mit verschiedenen Antikörpern (reprobing) ist nur nacheinander geschaltet möglich. Hierzu ist es erforderlich die Blot-Membran von den Antikörpern zu befreien [124, 150] und dann einen erneuten immunochemischen Nachweis durchzuführen.

Gesamtproteinfärbung und Konservierung einer PVDF-Membran Um die Bindungseffizienz der Proteine an der PVDF-Membran zu überprüfen wurden am Ende einer ECL-Reaktion die auf der Membran fixierten Proteine nach *Sanchez et al.* [151] unspezifisch angefärbt. Dies erfolgte durch den sauren Azofarbstoff Amidoschwarz 10 B. Hierzu wurde die ECL-Lösung entfernt und die Membran kurz in ein Färbebad eingetaucht. Mittels $sddH_2O$ wurde die Membran gewaschen bis distinkte Banden zu erkennen waren. Abschließend erfolgte die Trocknung und digitale Dokumentation der PVDF-Membran.

2.3.3.4 ELISA

Zur Vermeidung eines Radioimmunassays wurden die Entwicklung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) vorangetrieben und durch *Engvall und Perlman* 1971 [152] ein erstes Protokoll hierfür veröffentlicht. ELISA und Radioimmunassays folgen gleichen Prinzipien, nur ist der Amplifikator nicht ein Radioaktiverzerfall sondern eine durch ein Enzym katalysierte Chromogenumwandlung bzw. Chemolumineszenzreaktion. Der Stoffumsatz ist in Abhängigkeit von der Zeit und innerhalb gewisser Grenzen linear, so dass hieraus unter Verwendung eines Kalibrierungsstandards auf die Proteinkonzentration geschlossen werden kann [126]. Der Nachweis erfolgte nach *Bos et al.* [153] nur mit gebundenem Protein und geringfügigen Veränderungen des Protokolls auf 96-Well-Mikrotiterplatten. Zur Auswertung wurde ein Titertek Multiscan Plus MK II Multiplaterereader verwendet, gesteuert durch die Genesis Software (Version 3.03).

Zuerst wurde der Kalibrierungsstandard – purifiziertes γ -Tubulin aus *E. coli* – und die zu untersuchenden Proben in Verdünnungspuffer aufgenommen. Danach wurden 100 μ l der jeweiligen Proteinlösung pro Well einer NUNC Maxisorp 96-Well-Platte zugegeben und für 16 Stunden bei 4 °C und 50 rpm inkubiert. Jeder Ansatz wurde dreifach aufgetragen um statistisch valide Messwerte zu erhalten. Zur Entfernung ungebundenen Proteins wurden die Wells dreimal mit 400 μ l Waschpuffer gespült. Zur Blockierung nicht besetzter Bindestellen wurde die Platte mit 300 μ l je Well Blockierungspuffer für 1 Stunde bei RT und 50 rpm inkubiert. Nach Entfernung des Blockierungspuffers und dreimaligem Waschen unter analogen Bedingungen folgte die Zugabe des ersten Antikörpers. Die Antikörper wurden auf eine Arbeitskonzentration von 1:180 mit PBS-Puffer verdünnt. Die Bindung wurde durch eine Inkubation für 1 Stunde bei RT und 50 rpm vollzogen. Durch dreimaliges Waschen wurde ungebundener Antikörper entfernt bevor 100 μ l je Well des verdünnten, sekundären Antikörpers zugegeben wurden. Nach einer Inkubation für 1 Stunde bei RT und 50 rpm wurde durch dreimaliges Waschen ungebundener Antikörper entfernt. Durch die Zugabe von 100 μ l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Lösung wurde die Reaktion gestartet. Nach 20 Minuten wurde durch Zugabe von 100 μ l einer 1,0 M H₂SO₄-Lösung die Reaktion gestoppt und die Extinktion bestimmt. Gemessen wurde die Extinktion der Proben/Standards bei $\lambda = 450$ nm, korrigiert um die Extinktion bei $\lambda = 570$ nm. Durch die Korrektur wurden optische Fehler und Mängel der Mikrotiterplatten-Platte ausgeglichen.

Tabelle 2.30: ELISA-Puffer

Lösung	Komponente	Konzentration
PBS-Puffer	NaCl	140,0 mM
	NaH ₂ PO ₄	10,0 mM
	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	2,0 mM
	pH = 7,4 $\pm$ 0,05	
Verdünnungspuffer	PBS-Puffer	
	BSA	1,0 Gew.-%
Waschpuffer	PBS-Puffer	
	Tween 20	0,05 Vol.-%
Blockierungspuffer	PBS-Puffer	
	BSA	1,0 Gew.-%
	Saccharose	5,0 Gew.-%
	NaN ₃	0,05 Gew.-%
TMB-Lösung	TMB	0,01 Gew.-%
	DMSO	1,0 Vol.-%
	Natriumacetat	0,1 M
	H ₂ O ₂	0,01 Vol.-%
	pH = 6,0 $\pm$ 0,05	

2.3.4 Proteinpurifikation

2.3.4.1 Affinitäts-Chromatographie

Durch die Klonierung wurde γ -Tubulin um einen C-terminalen His₆-Tag modifiziert. Dieser sollte eine Aufreinigung des exprimierten Proteins ermöglichen. Bei einer IMAC sind metallchelatierende Gruppen an die Säulenmatrix (hochgradig quervernetzte Agarose) kovalent gebunden, die ihrerseits mit Übergangsmetall-Kationen (wie z. B. Ni²⁺) beladen sind [126]. Das in den Proteinen enthaltene Histidin bindet an die freien Übergangsmetall-Koordinationsstellen unter Ausbildung eines Übergangsmetall-Chelat-Komplexes. Die Stabilität und Selektivität dieses Komplexes ist von der Koordinationsgeometrie des verwendeten Übergangsmetallkations und von der Orientierung und der chemischen Umgebung des Histidins abhängig. So kann unter milden Reaktionsbedingungen nur ein terminaler und freizugänglicher His₆-Tag einen nennenswerten Bindungsbeitrag leisten, ein im Innern des Proteins gelegener hingegen nicht. Auch können andere in der äußeren Sphäre histidinhaltige Proteine an die Übergangsmetallkationen anbinden, so dass bei der Elution ein Stufengradient erforderlich sein kann.

Die verwendete Matrix (Ni Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) war bereits mit Ni²⁺ beladen und verfügte über einen mittleren Partikeldurchmesser von 90 μm . Aufgrund der hohen Bindkapazität (40 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Säulenmaterial) und der Möglichkeit der Beladung mit verschiedensten Übergangsmetallkationen (Cu²⁺, etc.) wurde dieses Säulenmaterial verwendet. Als Säulen wurden die Poly-Prep Columns (Bio-Rad, Richmond, USA) mit einem mittleren Porendurchmesser von 20 μm verwendet.

Tabelle 2.31: IMAC-Puffer

Komponente	Bindepuffer	Waschpuffer A	Waschpuffer B	Elutionspuffer
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	50,0 mM	50,0 mM	–	–
K-MES	–	–	50,0 mM	50,0 mM
KCl	500,0 mM	500,0 mM	500,0 mM	500,0 mM
MgCl ₂	1,0 μM	1,0 μM	1,0 μM	1,0 μM
GTP	1,0 μM	1,0 μM	1,0 μM	1,0 μM
1-Thioglycerol	10,0 mM	10,0 mM	10,0 mM	10,0 mM
Glycerol	–	10,0 Vol.-%	10,0 Vol.-%	10,0 Vol.-%
Imidazol	25,0 mM	25,0 mM	25,0 mM	50,0 – 500,0 mM
Complete EDTA-free	–	–	–	–
Protease Inhibitor	1 Tablette/50,0 ml pH = 8,0 $\pm$ 0,05	– pH = 8,0 $\pm$ 0,05	– pH = 6,6 $\pm$ 0,05	– pH = 6,6 $\pm$ 0,05

Vorbereitung der Säulenmatrix Alle Zentrifugationen erfolgten in einer Zentrifuge mit Auschwingrotor (RotiFix II Typ 2900, Hettich) bei RT und 500 xg in einem 10 ml Teflonröhrchen. Zuerst musste das Säulenmaterial mit dem Bindepuffer äquilibriert werden, bevor es mit dem

Gesamtproteinextrakt beladen werden konnte. Hierzu wurde 1 ml des in Ethanol (20 Vol.-%) gelagerten Säulenmaterials aufgeschlämmt und durch eine Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das pelletierte Säulenmaterial in 5 ml *sdd*H₂O resuspendiert und für 3 Minuten bei RT inkubiert. Das Säulenmaterial wurde erneut pelletiert und mit 5 ml des Bindepuffers resuspendiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Abschließend wurde das Säulenmaterial erneut pelletiert und mit einem gleichen Volumenteil des Bindepuffers vereinigt. Zur Vorbereitung der Säule war es erforderlich, diese durch mehrmaliges Waschen mit einem Säulenvolumen Ethanol (20 Vol.-%) und drei Säulenvolumina *sdd*H₂O von Rückständen zu befreien.

Probenvorbereitung Das Säulenmaterial zeigt eine Instabilität gegenüber reduzierenden Reagenzien (wie z.B. β -ME) sowie gegenüber gewisser Detergenzien (wie SDS $\geq 2,0$) Gew.-%. Deshalb war es erforderlich das Proteinextrakt mit Bindepuffer im Verhältnis 1:40 verdünnt.

Durchführung der Affinitätschromatographie Das vorbereitete Säulenmaterial wurde im mit dem vorbereiteten Probenmaterials zusammen gegeben und für 60 Minuten bei 4 °C auf einem Rotationsschütteltisch (Reax 3, Heidolph, Kehlheim) inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde der Inhalt des Reaktionsschraubgefäßes auf die Säule übertragen und mit der Elution begonnen. Je nach Proteinextrakt wurden das Elutionsprofil angepasst, generell enthielten die Elutionspuffer (Tabelle 2.31) Imidazol im Bereich von 50 – 500 mM.

2.3.4.2 Gelfiltration

Gelfiltration bezeichnet eine Methode, die Moleküle entsprechend ihrer Größe separiert. Hierbei passieren die Moleküle eine Gelmatrix, deren Zusammensetzung und Eigenschaften die Trennleistung bestimmen. Seit der erstmaligen Beschreibung der Trennung von Proteinen durch *Lathe und Ruthven* [154] haben sich die Säulenmaterialien erheblich weiterentwickelt. So erforderte die Mais-Stärke-Matrix noch niedrige Flussraten [155]. Erst durch die von Porath und Flodin entwickelte quervernetzte Dextran-Matrix wurde Gelfiltration bedeutend praktikabler [156, 157]. Die Grundlagen ein Proteintrennung sind Abbildung 2.12 kurz schematisch dargestellt. Verwendung fand eine BioLogic HR FPLC-Einheit von Bio-Rad (München) sowie eine Pharmacia-Einheit (Uppsala, Schweden) bestehend aus folgenden Einzelkomponenten:

- Gradient Programmer GP-250
- Pump P-500 (2 Einheiten)
- Peristaltic Pump P-1
- Valve V7
- Single Path Monitor UV-1 (Control & Optical Unit)
- Fraction Collector Frac-100

Zur Trennung diverser Proteingemische wurden verschiedene Säulenmaterialien verwendet (Tabelle 2.32). Alle Matrices wurden vor Gebrauch mit Gelfiltrationspuffer (Tabelle 2.33) äquilibriert.

Tabelle 2.32: Säulenmatrices zur Gelfiltration

Produkt	Trennkapazität [†] [kDa]	Hersteller
Bio-Gel P-100	5.000 – 100.000	Bio-Rad
Superdex 200 pg	10.000 – 600.000	GE Healthcare
Sephacryl S-300 HR	10.000 – 1.500.000	GE Healthcare

[†] Alle Angaben beziehen sich auf globuläre Proteine.

Tabelle 2.33: Gelfiltrationspuffer

Komponente	Konzentration
K-MES	50,0 mM
KCl	500,0 mM
MgCl ₂	5,0 mM
GTP	10,0 µM
K-EGTA	1,0 mM
DTT	1,0 mM
pH = 6,6±0,05	

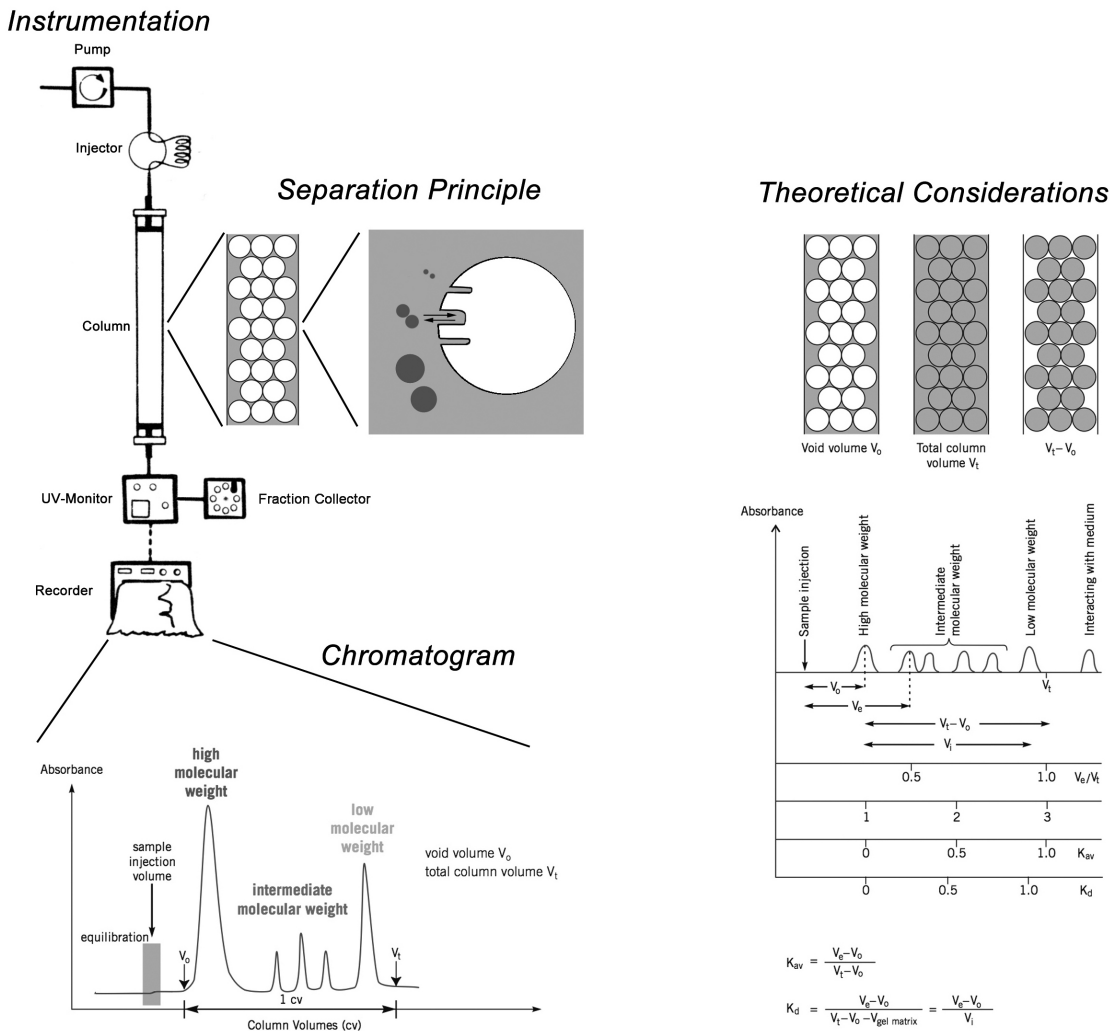


Abbildung 2.12: Grundlagen einer Gelfiltration

Nach Beschickung der Säule erfolgt im Lauf die Trennung der gelösten Proteine. Hierbei zeigen kleinere Proteine eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit. [157, 158]

2.3.4.3 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration ist ein Filtrationsverfahren das sich sowohl für die schnelle Konzentration von Proteinlösungen als auch zum Pufferaustausch eignet. Hierfür wurden asymmetrische Membranen aus Cellulose, Polyethersulfon oder Polyvinylidenfluorid mit verschiedenen Ausschlussgrenzen entwickelt. Die Ultrafiltration wird im Gegensatz zu einer Dialyse nicht durch einen Konzentrationsgradienten angetrieben, sondern durch die Flussrate des Lösemittels durch die Ultrafiltrationsmembran. Dabei werden gelöste Moleküle (Salze, Proteine, etc.), die deutlich unter der Ausschlussgrenze liegen mit dem Wasser durch die Filtermembran gedrückt. Hierbei ist besonders darauf zu achten, dass die Proteine nicht ausfallen und die Filtermembran verstopfen [126].

Als Konzentratoren wurden Vivaspin 15 (MWCO: 5, 10, 30, 50, 100kDa) von Satorius Stedim Biotech (Göttingen) sowie Amicon Ultra - 15 Ultracel (MWCO: 10kDa) von Millipore (Carrigtwohill, Irland) verwendet. Die Proben wurden vor der Ultrafiltration durch eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 15.000 xg von etwaigen Partikeln befreit, die die Membran hätten verstopfen können. Die Ultrafiltration selbst wurde durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 4 °C und 3.000 xg (Beckmann J2-21 Centrifuge, JA14 Rotor, Fullerton, USA) durchgeführt. Die Konzentratoren wurden nach der Probenentnahme mehrfach mit *sdd*H₂O gespült und in Ethanol (20 Vol.-%) eingelagert.

2.3.5 Proteinidentifikation

Die Identifikation von Proteinen erfolgte durch Massenspektrometrie (MS). Hierbei werden die Proteine fragmentiert, die Peptide ionisiert und durch Ionentrennung deren Molekülmasse bestimmt. Durch Datenbankenvergleiche (Mascot, etc.) ist es möglich durch den charakteristischen Peptid-Massen-Fingerabdruck das zugehörige Protein zu identifizieren.

2.3.5.1 Trypsin-Verdau

Bei Trypsin handelt es sich um eine Endopeptidase die zur Gruppe der Serinproteasen gehört. Sie spaltet Proteine spezifisch an der carboxyterminalen-Seite der Aminosäuren Arginin und Lysin [159]. Somit erfolgt eine spezifische Spaltung der Proteine in definierte Peptide, die die Identifizierung über einen Datenbankabgleich via peptide mass fingerprinting ermöglichen. Aufgrund der hohen spezifischen ist es auch möglich auf Grund bekannter Protein- bzw. Gensequenzen Datenbanken zur Analyse zu generieren.

Tryptischer Verdau in Polyacrylamid-Gel immobilisierter Proteine Im Anschluss an eine unter denaturierenden Bedingungen durchgeführte gelelektrophoretische Fraktionierung wurde das Gel in gleichgroße Stücke geschnitten und mit Trypsin verdaut. Auf eine Elution bzw. Blotting der Proteine wurde verzichtet. Die Gelstücke samt denaturiertem Protein wurden dehydriert und in Gegenwart von Trypsin und Ammoniumbicarbonat rehydriert. Nach einer Inkubation wurde der peptidhaltige Überstand abgenommen und zur Analyse verwendet [160].

Zuerst wurde jede zu untersuchende Laufspur des Trenngels in 10 bis 15 gleich große Stücke geschnitten. Laufspuren zu vergleichender Proben wurden auf der gleichen Höhe geschnitten um einer Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Jedes Gelstück wurde gekennzeichnet und im folgenden jeweils einzeln weiter prozessiert. Die Gelstücke wurden weiter zerkleinert für 5 Minuten in 300,0 µl einer 50,0 mM $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ Lösung unter schütteln bei RT inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, die Gelstücke mit 300,0 µl Acetonitril gewaschen und erneut unter schütteln für 5 Minuten bei RT inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gelstücke in einer Savant SpeedVac für 1 Stunde bei 37°C getrocknet. Diese drei Waschschrte wurden dreimal wiederholt, bis die Gelstücke keine Coomassie-Färbung mehr zeigten. Die Entfernung des verbliebenen proteingebundenen Coomassie-Farbstoffes war von größter Wichtigkeit, denn es würde die Flugzeit und somit das *peptide mass fingerprinting* beeinflussen.

Die gewaschenen und getrockneten Gelstücke mit 100,0 µl einer 10,0 mM DTT in 100,0 mM $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ Lösung rehydriert und für 1 Stunde bei 56 °C inkubiert. Dies diente einer Reduktion der enthaltenen Cysteine und somit vollständigen Entfaltung der im Gel vorhandenen Proteine. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Gelstücke in 100,0 µl einer 100,0 mM $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ gepufferten 55 mM 2-Iodacetamid Lösung aufgenommen und für 45 Minuten im Dunkeln inkubiert. Hierbei wurden die SH-Gruppen der Cysteine irreversibel alkyliert und das stabile S-Carboxyamidomethylcystein gebildet, was eine erneute Ausbildung von Disulfidbrücken verhinderte. Die sich dadurch ergebende Massenerhöhung muss bei der späteren Datenbankabfrage vermerkt werden, da sonst das peptide mass fingerprinting zu falschen Ergebnissen führt. Diese beiden Schritte wurden dreimal wiederholt, dass von einer quantitativen Aufhebung von Disulfidbindungen ausgegangen werden konnte.

Zum Verdau wurde der Überstand entfernt und die Gelstücke mit 50,0 µl einer 50,0 mM $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ gepufferten 1,0 Gew.-%igen Trypsin Lösung überschichtet und dann erst für 45 Minuten auf Eis und abschließend für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Alle nun anfallenden Überstände wurden für jede Probe einzeln gesammelt und dann vereinigt, da sich in jenen die Peptidfragamente befanden. Die Gelstücke wurden mit jeweils 40,0 µl der in Tabelle 2.34 gelisteten Lösungen für 20 Minuten bei RT inkubiert.

Die gesammelten und vereinigten Überstände wurden in einer SpeedVac auf ein Volumen von 20 ± 5 μl reduziert bevor 5,0 μl einer 0,4 Vol.-%igen Trifluoressigsäure Lösung zugegeben wurden. Diese Ansäuerung der Probe war für die nachfolgende ZipTip-Purifikation notwendig. Die ZipTip-Purifikation bietet den Vorteil, dass die Proben zugleich entsalzt, aufkonzentriert und

purifiziert werden. Hierbei werden die Proben mehrfach von einer 10 μl Pipettenspitze von, die eine C_{18} Matrix enthält aufgezogen, die Peptide binden daran und können in ein beliebiges Volumen eluiert werden. Zuerst wurde die Matrix durch dreimaliges aufziehen und wieder ausstoßen von 10 μl Acetonitril 100 Vol.-%ig und Trifluoressigsäure 0,1 Vol.-%ig aktiviert. Die Peptide der Probe wurde durch 20 maliges aufziehen und ausstoßen an die Matrix gebunden. Durch dreimaliges waschen den Matrix mit einer 0,1 Vol.-%igen Trifluoressigsäure Lösung wurden potentielle Verunreinigungen die später bei der MS stören könnten entfernt. Die Elution der Peptide erfolgte durch dreimaliges aufziehen und ausstoßen von 5 μl einer wässrigen 60 Vol.-%igen Acetonitril Lösung. Die Matrix wurde durch dreimaliges waschen mit Acetonitril von verbliebenen Peptiden befreit, so dass keine Fragmente verschleppt wurden. Die Proben wurden bis zur Messung bei -80 $^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

Tabelle 2.34: Elutionslösungen zum Gelverdau

Lösung	Substanz	Konzentration
A	$\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$	25,0 mM
B [†]	Ameisensäure	5,0 Vol.-%
	Acetonitril	50,0 Vol.-%
C	Acetonitril	100,0 Vol.-%

[†] Doppelt ausgeführter Waschschrift.

Tryptischer Verdau gelöster Proteine Durch kurzes Aufkochen in Gegenwart von Harnstoff (8,0 M) wurden die Proteine denaturiert. Zum Verdau wurden 100,0 μg der zu untersuchenden Proteinlösung in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt, jedoch nur bis zu einem maximal Volumen von 45,0 μl . Dem wurden 15,0 μl eines 50,0 mM Tris-HCL-Puffers pH 8.0 zugegeben um die Harnstoff Konzentration auf 6,0 M zu verringern, der Tris-Puffer war auch die Grundlage aller nachfolgenden Lösungen. Zur Reduktion der Cystein und somit einer optimalen Entfaltung der Proteine wurden 3,0 μl einer 200,0 mM DTT Lösung zugegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden 12,0 μl einer 200,0 mM 2-Iodacetamid Lösung zugegeben und ebenfalls für 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Die erneute Zugabe von 12,0 μl der 200,0 mM DTT Lösung und Inkubation von 1 Stunde im Dunkeln sollten eine vollständige Entfaltung sicher stellen. Die Zugabe von 505,0 μl einer 1,0 mM CaCl_2 Lösung sollte den späteren Selbstverdau von Trypsin hemmen und die Harnstoff Konzentration auf 0,6 M verringern bevor Trypsin zugegeben wurde. Zum Verdau wurden 8,0 μl einer $0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ konzentrierten Trypsin Lösung zugegeben und für 16 Stunden bei 30°C inkubiert.

Zur Vorbereitung der Sep-Pak-Purifikation wurden die Proben mit 250,0 μ l einer wässrigen 1,0 Vol.-%igen Trifluoressigsäure Lösung versetzt. Die Finisterre C18 SPE Säulen wurden auf einem Vakuum-Block montiert und unter Hilfe eines leichten Vakuums jede Säule mit 1,0 ml Methanol und einer wässrigen Lösung bestehend aus 0,1 Vol.-% Trifluoressigsäure und 80 Vol.-% gespült. Die Säule wurde dann mit durch zweimaliges spülen mit einer 0,1 Vol.-%igen Trifluoressigsäure Lösung äquibriert. Danach wurde die Probe auf die Säule geladen. Zur Entfernung MS störender Substanzen wurde die Säulenmatrix mit zweimal mit 1,0 ml einer 0,1 Vol.-%igen Trifluoressigsäure Lösung gewaschen. Die Elution der Peptide erfolgte durch 800 μ l einer 80 Vol.-%igen Acetonitril und 0,1 Vol.-%igen Trifluoressigsäure Lösung. Das peptidhaltige Eluat wurde in einer SpeedVac getrocknet und bis zur Messung bei -80 °C eingelagert.

2.3.5.2 MALDI-Massenspektrometrie

Die Matrixassistierte Laser Desorption/Ionisation (MALDI)-Massenspektrometrie (MS) wurde in den Laboren der Augen- und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Die MALDI-MS basiert auf der Ionisation der Peptidfragmente, welche in einer geeigneten Laserwellenlänge absorbierenden Matrix eingebettet sind. Geeignet hierfür sind kleinere organische Moleküle, die einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt werden. Die Einkopplung der für die Ionen notwendigen Energie erfolgt bei der Bestrahlung über resonante elektronische Anregung der π -Elektronensysteme der Matrixmoleküle. Als Matrix wurde die übliche α -Cyano-4-hydroxymethylsäure verwendet, die sich besonders für die Messung kleiner Peptide eignet und für Laser mit einer Wellenlänge von 337 und 355 nm geeignet ist. Die Massenanalyse der Ionen erfolgte mit einem Flugzeitmassenspektrometer (auch TOF-Analysator genannt). Bei der MALDI-TOF-Analyse erfolgt die Massenbestimmung im Hochvakuum über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit, die zwischen dem Start der Messung bis zum Eintreffen der Ionen am Detektor vergeht. Durch den Einsatz eines Reflektor-Flugrohrs wurde eine höhere Trennschärfe zwischen den einzelnen Signalen erreicht [126].

Die Probenvorbereitung erforderte den Aufbau der α -Cyano-4-hydroxymethylsäure/peptid-Matrix auf dem Probenträger. Hierzu wurden zuerst die Proben auf der Trägerplatte aufgebracht, bevor die Probenspots mit 2,0 μ l einer 0,2 Gew.-%igen α -Cyano-4-hydroxymethylsäure Lösung (50 Vol.-% Acetonitril und 0,2 Vol.-% Trifluoressigsäure) gemischt wurden. Die Mischung wurde bei 37 °C eingetrocknet. Dann konnte die Platte in ein MALDI LTQ Orbitrap XL Hybrid-Massenspektrometer der Firma Thermo Scientific analysiert. Dieses verfügte über einen Orbitrap-Massenanalysator. Die Kalibrierung erfolgte mittels des Proteo Mass MALDI Calibration Kit für LT QXL und LTQ Hybrids (200 - 4000 Da), der die Berechnung einer Kalibrationsfunktion und somit die Zuordnung der gemessenen Peaks zur Proteinen ermöglichte.

Zur MS-Messung wurde jeder Spot mit 10 Impulsen beschossen und die daraus resultierenden Ionen dem Orbitrap zugeführt. Die Energie pro Impuls betrug 25,0 μ J. Aus den Peakspektren von 800 bis 2000 Da wurden signifikante Signale ausgewählt und der Fragmentierung (MS/MS-Analyse) zu geführt. Die Fragmentierung erfolgte nach dem Collision-induced dissociation-Verfahren. Die Steuerung des Geräts erfolgte mittels der Software Xcalibur.

2.3.5.3 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Die Elektrospray-Ionisation (ESI)-Massenspektrometrie (MS) wurde in den Laboren der Plant Biotechnology der ETH Zürich durchgeführt.

Eine weitere Möglichkeit Proteinfragmente zu Ionisieren und in die Gasphase zu bringen ist die Elektrospray-Ionisation (ESI). Hierzu werden die Peptide nicht in einer verdampfbare Matrix immobilisiert, sondern durch eine Kapillare fein versprüht. Dabei liegt eine im kV-Bereich angesiedelte Potentialdifferenz zwischen der Kapillare und der gegenüberliegenden Elektrode an. Gegen die elektrostatische Kraft wirkt die Oberflächenspannung des Solvens, abhängig vom Gehalt an Wasser. Organische Lösungsmittel bewirken eine dramatische Erniedrigung in der Oberflächenspannung. Hierbei entsteht ein sogenannter Taylor-Kegel, aus dem sich geladene Tröpfchen ablösen die durch Verdunstung des Solvens an Masse und Volumen kontinuierlich verlieren. Ein Stickstoffgasstrom um die Kapillare unterstützt die Verdunstung erheblich. Die Ladung der Tröpfchen kommt durch die gelösten Ionen zustande. Durch die Volumendegression kommt es zum Anstieg der Ladung pro Volumeneinheit. Sobald der Energiebetrag der elektrostatische Abstoßung im Tropfen den Energiebetrag der Oberflächenspannung übersteigt (dem Rayleigh-Limit), kommt es zur sogenannten "Coulomb-Explosion". Die kleineren Tropfen verfügen nun über eine größere Gesamtoberfläche im Vergleich zum vorherigen größeren Tropfen, was sie vorübergehend stabilisiert, bis auch hier die Verdunstung das Oberflächen/Ladungsverhältnis verschiebt. Dieser Prozess wird soweit fortgesetzt, bis nur noch einzelne Ionen sich in der Gasphase befinden. Bei der ESI handelt es sich um die schonendste Ionisierungsmethode, da kaum weitere Fragmentierungen auftreten. Ein Vorteil der ESIs- gegenüber der MALDI-Methode ist die höhere Sensitivität, die jedoch auch mit einer höheren Störanfälligkeit einhergeht. Vom experimentellen Ansatz her sind ESI auch deutlich Aufwendiger (Anforderungen an Trägerlösungen, etc.) als MALDI-Analysen, werden.

Das ESI-MS Setup verfügte über einen Quadrupol-Analysator. Der Name des Analysator ergibt sich aus seinem Aufbau. Er besteht aus 4 Metallstäben die im gleichen Abstand zueinander liegen. An die gegenüberliegenden Partner wird je eine Wechsel- und eine Gleichspannung angelegt. Zu jedem Ion existiert ein Verhältnis von Gleich- zu Wechselspannung, dass dem Ion die Passage durch den Quadrupol erlaubt. Zur Bestimmung eines Massenspektrums werden die Peptide bei distinkten Gleich- zu Wechselspannung Verhältnissen ins den Quadrupol geleitet. Während einer Messung bleibt dieses Verhältnis konstant. Zu jeder Wechselspannung gibt es ein Masse/Ladungsverhältnisse die in einen sogenannten Stabilitätsbereich fallen. Ionen mit einem entsprechenden Masse/Ladungsverhältnis können den Quadrupol passieren und werden dann auch detektiert, andere Ionen deren Masse/Ladungsverhältnisse außerhalb dieses Stabilitätsbereich haben, können den Quadrupol nicht passieren und zum Detektor gelangen [144].

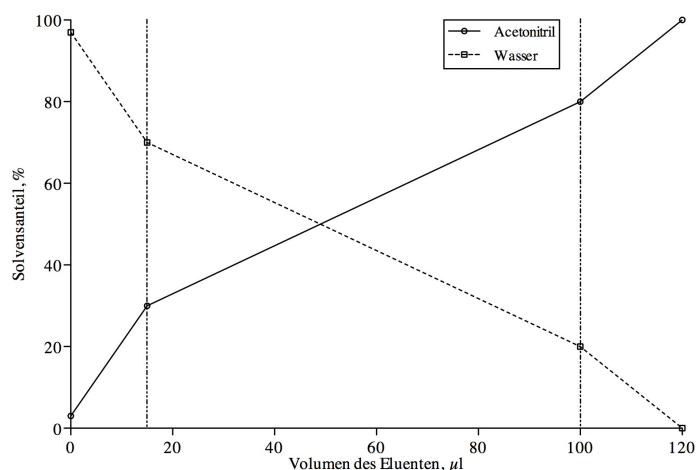


Abbildung 2.13: **Gradient zur ESI-MS**

Der zur Elution angelegt Acetonitril/Wasser-Gradient. Der Bereich zwischen 0 und 15 μl war der Vorlauf und wurde dem Quadrupol-Analysator nicht zugeführt, nur der Bereich zwischen 15 und 100 μl wurde jenem zugeführt. Der Bereich zwischen 100 und 120 μl war ein Waschschrift. Die Flussrate betrug konstant $1 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$.

Die Analyse der Proben erfolgte mittels eines Finnigan LTQ Massenspektrometers, das mit einer 25 μm Kapillare bestückt war. In die Kapillare war eine C18-Matrix integriert, die Peptide bindet und zur Elution einen Gradienten erforderte. Jener Gradient ist in Abbildung 2.13 gegeben. Zur Kalibrierung der Messungen wurde Fetuin verwendet. Die Auswertung erfolgte über die internen Datenbanken der AG Gruissem der ETH Zürich.

2.4 Bioinformatik

Aufgrund der sehr hohen Vielfalt bioinformatischer Methoden und Algorithmen, erfolgt eine kurze Darstellung der verwendeten Methoden im entsprechenden Ergebnisteil.

2.4.1 Software

Eine vollständige Auflistung aller verwendeten Programme ist in Tabelle 2.35 gegeben.

Tabelle 2.35: Auflistung der verwendeten Software gruppiert nach Verwendungszweck

Verwendungszweck	Programm	Version	Entwickler	System
Sequenzanalyse	ApE - A plasmid Editor	1.17	<i>M. Wayne Davis</i>	Mac OS X
	CLUSTAL W/X	2.0.12	<i>Larkin et al. [161]</i>	
	EMBOSS	4.8.2	<i>Rice et al. [162]</i>	
	FigTree	1.3.1	<i>A. Rambaut, UE</i>	
	Geneious Pro	4.8.2	Biomatters Ltd.	
	MacVector	11.0.4	MacVector Inc.	
	ProtTest	3.0	<i>Abascal et al. [163]</i>	
	Serial Cloner	2.1	Serial Basic	
	Seaview	4.2.4	<i>Gouy et al. [164]</i>	
	SimVector	4.50	Premier Biosoft International	
	BioEdit	5.0.6	<i>Tom Hall, N.C.S.U</i>	Windows 7
	VectorNTI Advance	11	Invitrogen	
	Graphical Codon Usage Analyser	2.0	<i>Fuhrmann et al. [165]</i>	Online
Primerdesign	H-BloX	1.47N	<i>Zuegge et al. [166]</i>	
	WebLogo	2.8.2	<i>Crooks et al. [167]</i>	
	Oligo	7.54	Molecular Biology Insights, Inc.	Mac OS X
Statische Datenanalyse	Primer Premier	5.00	Premier Biosoft International	Windows 7
	Prism	5.0c	GraphPad Software Inc.	Mac OS X
	pro Fit	6.1.12	Quantum Soft	
	ImageJ	1.43u	<i>Abramoff et al. [168]</i>	
	Quantity One	4.6.3	Bio-Rad	Windows7
	Excel	2010	Microsoft	
Strukturmodellierung	OriginPro	7	OriginLab	
	APBS	0.5.0	<i>Lerner and Carlson, UoM</i>	Mac OS X
	BALLView	1.3.2	<i>Moll et al. [169]</i>	
	ChemBioDraw Ultra	12	CambridgeSoft	
	Chimera	1.4	<i>Pettersen et al., UCSF [170]</i>	
	MacPymol	1.13 edu	DeLano Scientific LLC	
	Ramachandran Plot Explorer	1.0	Bosco Ho	
	PDB2PQR	1.6	<i>Dolinsky et al. [171]</i>	
	Tachyon Ray Tracing Library	0.98.9	<i>Stone [172]</i>	
	VMD	1.9	<i>Humphrey et al. [173]</i>	
	ICM-Pro	3.5	Molsoft L.L.C.	Windows 7
	MolProbity	3.19	<i>Chen und Davis et al. [174–176]</i>	Online
	PatchDock, SymmDock	1.3	<i>Schneidman-Duhovny et al. [177]</i>	
	Phyre	0.2	<i>Kelly et al. [178]</i>	
	Ramachandran Plot	2.0	<i>Sheik et al. [179]</i>	
Bildbearbeitung	Photoshop	CS4/5	Adobe	Mac OS X
	FITS Liberator	2.2/3.0	ESA/ESO/NASA	

Ergebnisse

3.1.	<i>In silico</i> Berechnungen zur Identifikation potentieller Interaktionsstellen	72
3.1.1.	Strukturmodellierung	73
3.1.1.1.	Homologie-Modellierung	73
3.1.1.2.	Threading-Modellierung	79
3.1.1.3.	Analyse der Ladungsdichteverteilung	81
3.1.2.	Vergleichende Primärstrukturanalyse	84
3.1.3.	Identifikation potentieller pflanzenspezifischer Interaktionsstellen	85
3.2.	Klonierung und Expression von γ -Tubulin	87
3.2.1.	Bakterielles pET-Expressionssystem	87
3.2.1.1.	γ -Tubulin mit C-terminaler Hexahistidin-Sequenz	87
3.2.1.2.	Strategie zur Expression von gelöstem γ -Tubulin in <i>E. coli</i>	90
3.2.1.3.	γ -Tubulin Standard zur Quantifizierung	94
3.2.2.	Hefe pKLAC-Expressionssystem	96
3.2.2.1.	Segregative γ -Tubulin-Volllängen-Expression	96
3.2.3.	Pflanzliche Binäre Vektor Systeme	99
3.2.3.1.	Exon-Intron-Struktur des TUBG1-Gens	99
3.2.3.2.	Ermittlung einer optimalen Kozak-Sequenz	100
3.2.3.3.	Klonierung eines konstitutiven γ -Tubulin-Expressionskonstrukts	100
3.2.3.4.	Klonierung 17 β -Estradiol induzierbarer Expressionskonstrukte	102
3.2.3.5.	<i>In planta</i> Transfektion und Expression	103
3.2.3.6.	Agroinfiltration und transiente Expression	104
3.2.3.7.	Bestimmung der maximalen γ -Tubulin-Expressionsrate	106
3.2.3.8.	Regulation der γ -Tubulin-Expression	110
3.3.	Biochemische Charakterisierung	112
3.3.1.	Native Isolation und Pull-Down	112
3.3.2.	Massenspektrometrische Analyse assoziierter Proteine	113
3.3.2.1.	MALDI-TOF	113
3.3.2.2.	ESI-Massenspektrometrie	113

3.1 *In silico* Berechnungen zur Identifikation potentieller Interaktionsstellen

Zur Überprüfung der Arbeitshypothese, dass das γ -Tubulin der höheren Pflanzen über zusätzliche spezifische Interaktionsstellen verfügt wurden die Ergebnisse verschiedener bioinformatischer Methoden gebündelt und mit bisher bekannten Evidenzen zusammengeführt. Die nachfolgende Abbildung 3.14 zeigt den *in silico* Arbeitsfluss.

Ausgehend von den, durch das *National Center for Biotechnology Information* zur Verfügung gestellten Proteinsequenzen wurden Alignments erstellt und hinsichtlich der Qualität bewertet. Dies erfolgte durch einen sogenannten Similarity-Score. Das als am besten bewertete Alignment war die Grundlage für weitere Kalkulationen. Ausgehend von dem Alignment konnte ein Strukturmodell erstellt werden, das eine Berechnung des elektrostatischen Oberflächenpotentials ermöglichte. Auch wurde dieses Alignment genutzt, um durch die Sequenz Entropie Rückschlüsse auf konservierte Sequenzbereiche zu ziehen. Das Alignment ermöglichte auch die Betrachtung der molekularen Phylogenie, welcher bei einer späteren Betrachtung der Expressionssysteme noch eine wichtige Rolle zukommen soll.

Die Zusammenführung der Ergebnisse aus der Betrachtung der pflanzlichen γ -Tubulin Primär-, Sekundär-, bis hin zur Tertiär-/Quartärstruktur und vergleichenden Analysen dienten der Festigung der Arbeitshypothese. Manche Kalkulationen waren in die vorhandenen Programme nicht zu implementieren, so dass einige Sequenzen einer manuellen Kuration bzw. der Prozessierung durch eigene Skripte bedurften.

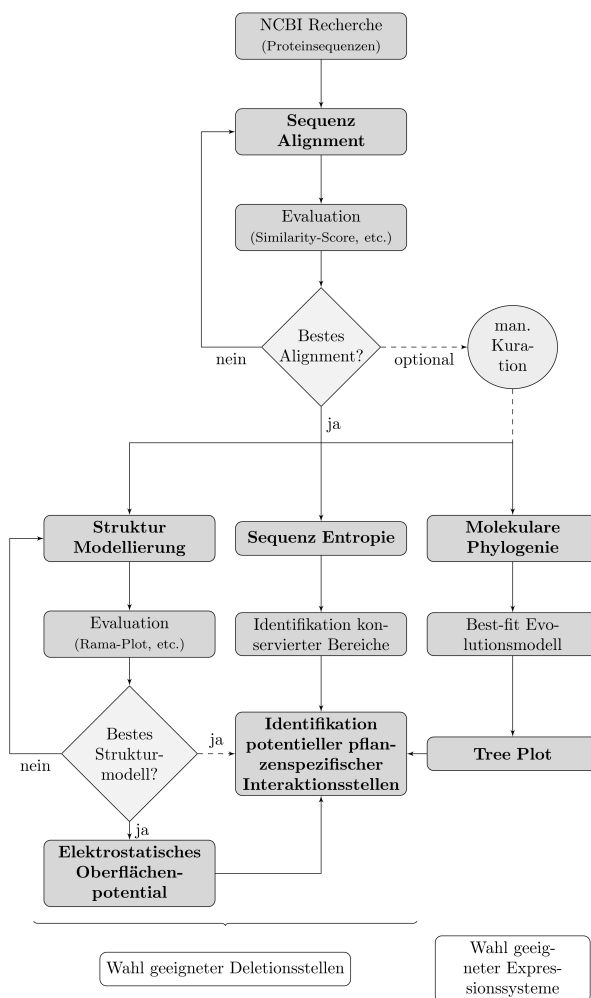


Abbildung 3.14: **Arbeitsfluss der bioinformatischen Datenerhebung**

3.1.1 Strukturmodellierung

Das Verständnis der Struktur ermöglicht Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins. Sowohl die Röntgenstrukturbestimmung von Proteinkristallen als auch die Identifikation von potentiellen pflanzenspezifischen Interaktionsstellen erfordern ein Strukturmodell. Zur Modellierung können *ab initio*-, Homologie- und das Protein Threading (auch als fold-recognition bezeichnetes) Verfahren herangezogen werden. *Ab initio*-Verfahren haben sich in den letzten Jahrzehnten stark weiterentwickelt, scheitern jedoch bei Proteinen die aus mehr als 100 Aminosäuren bestehen [180]. Mittels Homologie- und Threading-Verfahren wurden alle γ -Tubulin-Strukturmodelle erstellt und gegebenenfalls durch thermodynamische (*ab initio*) Kalkulationen verfeinert.

3.1.1.1 Homologie-Modellierung

Zur Homologie-Modellierung bedurfte es einer möglichst homologen Strukturvorlage. Die von *Schröder et al.* aufgeklärte γ -Tubulin Sequenz aus *Nicotiana tabacum* (GenBank: CAC00547.1) wurde für einen globalen Vergleich mit der *NCBI PDB structures* Datenbank eingesetzt. Dieser Vergleich erfolgte mittels des FASTA-Algorithmus (Version 3.6). Optimale globale Alignment Scores konnten mit der BLOSUM62 Substitutionsmatrix [181] und den Standardparametern (Gap open/extension penalties: -7/-1; K_{tup} : 2) erzielt werden. Die Gap open/extension Parameter wurden innerhalb üblicher Grenzen variiert, was jedoch zu keiner signifikanten Verschiebung der Ergebnisse führte (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.36: GGSEARCH-Ergebnisse sortiert nach den optimalen globalen Alignment-Scores

PDB Code	Optimaler globaler Alignment Score	Bit Score	Erwartungswert	Prozentuale Sequenz Identität	Sequenz Ähnlichkeit	Länge des Proteins
3CB2	1708	411,3	$1,9 \cdot 10^{-114}$	72,7	90,7	475
1Z5W	1707	411,0	$2,2 \cdot 10^{-114}$	73,5	91,2	474
3DU7	668	166,5	$8,3 \cdot 10^{-41}$	34,2	71,5	445
1Z2B	667	166,3	$9,8 \cdot 10^{-41}$	34,2	71,2	445
1TUB	666	166,0	$1,1 \cdot 10^{-40}$	34,2	71,2	427
1FFX	666	166,0	$1,2 \cdot 10^{-40}$	33,8	70,1	445
2XRP	666	166,0	$1,2 \cdot 10^{-40}$	34,2	71,2	445
2BTQ	633	158,3	$2,4 \cdot 10^{-38}$	35,3	69,7	426
1Z2B	579	145,6	$1,7 \cdot 10^{-34}$	31,0	64,3	448
3DU7	574	144,4	$3,9 \cdot 10^{-34}$	30,8	64,5	449
3HKB	574	144,4	$3,9 \cdot 10^{-34}$	30,9	64,5	451
1FFX	550	138,7	$1,9 \cdot 10^{-32}$	30,9	64,5	451
1SA0	549	138,5	$2,3 \cdot 10^{-32}$	30,9	64,3	451
1TUB	548	138,3	$2,6 \cdot 10^{-32}$	31,2	65,5	440
1JFF	547	138,0	$3,2 \cdot 10^{-32}$	30,9	64,3	451
2XRP	547	138,0	$3,2 \cdot 10^{-32}$	31,2	65,5	452
2BTO	497	126,2	$1,2 \cdot 10^{-28}$	28,9	67,3	473
3IPW	94	31,5	2,7	24,0	54,1	325
2EAE	95	31,5	7,4	26,4	52,8	898
2NO8	78	28,0	7,9	28,1	65,6	86

Die Datenbankabfrage ergab, dass sich die humanen Modelle 3CB2 und 1Z5W aufgrund der optimalen globalen Alignment Score-Werte (Tabelle 3.36) für eine Modellierung am besten geeignet sind. Die Scoring-Werte wurden nach dem *Needleman-Wunsch-Algorithmus* [182] berechnet (Gleichung 3.4).

$$\text{Raw Score} : S_{\text{raw}} = \sum_{i=1}^m (\text{Identity}, \text{Mismatch}) - \sum_{i=1}^m (\text{Gap open/extension penalties}) \quad (3.4)$$

Die Angabe eines einzelnen Scores für ein Alignment ist problematisch, da die Einheit fehlt. Eine Normierung erfolgt über die Bit Werte (Gleichung 3.5). Sie ergeben sich aus der Summe der einzelnen Scores und werden nach der *Karlin-Altschul Statistik* [183] mit Hilfe der Parameter λ und K berechnet.

$$\text{Bit Score} : S' = \frac{\lambda S_{\text{raw}} - \ln K}{\ln 2} \quad (3.5)$$

Erst durch den Bit Score S' kann man Alignments aus verschiedenen Berechnungen vergleichen [184]. Die Höhe des Bit Scores lässt aber noch keine validen Rückschlüsse über die statische Signifikanz der Alignments zu. Erst eine Anwendung des von *Altschul et al.* [185] entwickelten Algorithmus ermöglicht dies. Hierbei wird auf Grundlage Länge der abgefragten Sequenz m und der Summe der Vergleichssequenzen n ein Erwartungswert ermittelt (Gleichung 3.6).

$$\text{Erwartungswert} : E = mn2^{-S'} \quad (3.6)$$

Strukturmodell Bei den beiden höchst bewerteten Strukturen handelte es sich bei 1Z5W um die von *Aldaz et al.* [33] erstmalig aufgeklärte und bei 3CB2 um die von *Rice et al.* [186] verfeinerte humane γ -Tubulin Struktur. Die Struktur 3CB2 enthielt zwei γ -Tubulin Moleküle in der Elementarzelle, die als A und B bezeichnet wurden. Zur Strukturmodellierung mittels ICM Pro wurde zuerst ein Alignment erstellt (Abbildung 3.15).

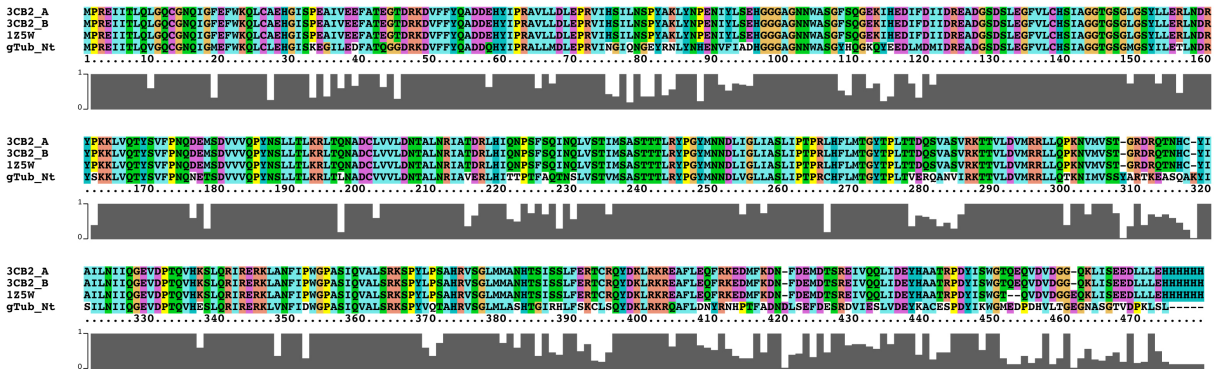


Abbildung 3.15: Alignment zur γ -Tubulin Homologie-Modellierung

Die Farbgebung folgte dem Clustal X Farbschema [187], zusätzlich wurde der Column-Score abgebildet.

Ausgehend von drei humanen Strukturen wurden Strukturmodelle für γ -Tubulin aus *N. tabacum* berechnet. Die verwendeten Intervallbreiten der Fitting-Parameter sind in Tabelle 3.37 gelistet. Aufgrund der Divergenzen am C-Terminus (Abbildung 3.15) wurden 31 bzw.

Tabelle 3.37: Intervalle der Homologie-Fittingparameter

maxLoopLength	maxNter	maxCter	gapExpand	simSChains
[75;90;100;110;125]	[1;3;9]	[1;3;9]	[1;3;9]	[on/off]

25 C-terminale Aminosäuren bei den Modellen ausgehend von 1Z5W bzw. 3CB2 nicht weiter berücksichtigt.

Andere divergente Bereiche wurden einer *Loop-Modellierung* unterzogen. Hierbei werden die sogenannten *template sequences* durch die divergenten *target sequences* ersetzt und der Bereich von Grund neu modelliert. Abschließend wurden die Datensätze (Sequenz, Alignment und Modell) verknüpft und die Sekundärstruktur zugewiesen und das Strukturmodell ausgegeben. Insgesamt wurden 270 Modelle je Strukturvorlage durch systematische Variation der Fitting-Parameter berechnet und ggf. durch Anwendung von Refinementmethoden (JaffiLoop, etc.) modifiziert.



Abbildung 3.16: Darstellung überlagerter γ -Tubulin Tertiärstrukturmodelle

Die hier gezeigten Modelle wurden auf Grundlage folgender Parameter berechnet: maxLoopLength: 100; maxNter: 1; maxCter: 1; gapExpand: 1; simSChains: on. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden die humanen Strukturen (Hs) und Tabak-Modelle (Nt) als *Cartoon* dargestellt, mittels des Pymol *align*-Skripts überlagert.

A Hs_1Z5W (grün) und Nt_1Z5W-Modell (cyan)

B Hs_3CB2_A (gelb), Hs_3CB2_B (magenta) und Nt_3CB2-Modell (orange)

C Nt_1Z5W-Modell (cyan) und Nt_3CB2-Modell (orange)

In Abbildung 3.16 sind zwei Modelle für γ -Tubulin aus *N. tabacum* sowie die humanen Strukturvorlagen exemplarisch gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Modelle mit der jeweiligen Strukturvorlage eine gute Deckung zeigen (Abbildung 3.16.A und .B). Der Vergleich der beiden Modelle unterschiedlicher Strukturvorlagen (Abbildung 3.16.C) offenbarte deutlichere Unterschiede, hauptsächlich in den Loop-Bereichen. Eine genauere Quantifizierung der Unterschiede sollte mittels der nachfolgend beschriebenen Modellevaluation erfolgen.

Modellevaluation Zur Modellevaluation wurden neben der Betrachtung der C_α Atom Geometrie (ϕ und ψ), der C_β -Abweichung (ΔC_β) auch Bindungslängen- und Winkelvergleiche sowie mehrere Scoring-Modelle (RMSD, MolProbity, etc.) herangezogen. Eine Übersicht der relevanten Winkel und Atome ist in Abbildung 3.17 gegeben. Bei der Betrachtung der statistischen Verteilung der C_α -Torsionswinkel ϕ und ψ eines Proteinrückgrads sind strukturbedingt nur gewisse Winkelkombinationen erlaubt bzw. möglich, da es sonst zu stereochemischen Hinderungen (sogenannten *clashes*) kommt. Diese Betrachtungsform wurde bereits 1963 von *Ramachandran et al.* [188] entwickelt und ist ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Qualität einer Struktur oder eines Modells. Bei der Analyse der C_α -Torsionswinkel wurden die von *Lovell et al.* [189] als „erlaubt“ bzw. „favorisierten“ definierten Bereiche verwendet. Die Analyse der C_α -Torsionswinkel der Strukturmodelle ergab, dass die Modelle basierend auf der 3CB2 Struktur eine geringere Anzahl an Überschreitung der erlaubten C_α -Torsionswinkelkombinationen im Vergleich zu den 1Z5W Strukturmodellen aufwiesen. Der $[\phi, \psi]$ Plot der beiden γ -Tubulin Modelle für *N. tabacum* mit den geringsten Überschreitungen sowie der humanen Ausgangsstrukturen sind in Abbildung 3.18 gezeigt. Die erhaltenen Informationen aus den $[\phi, \psi]$ Plots wurden für eine spätere Bewertung der primärsequenzbasierten Sekundärstrukturvorhersage genutzt.

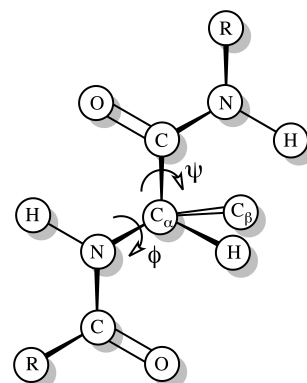


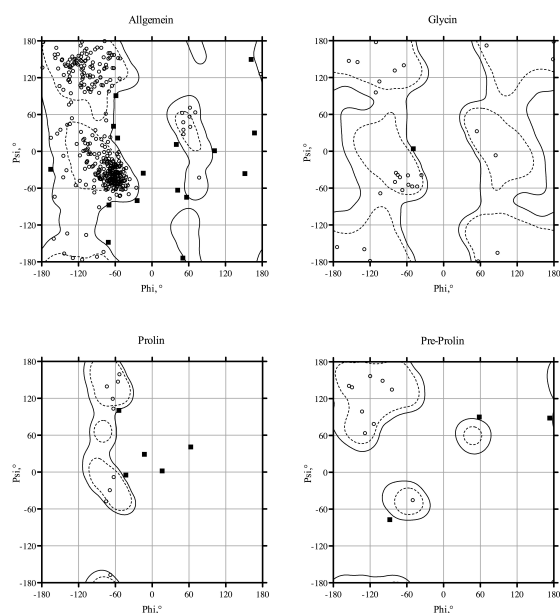
Abbildung 3.17: **Torsionswinkel des Proteinrückgrads**

Die nachfolgende ΔC_β -Analyse war eine dem Ramachandran-Plot nachgeordnete Analyse. Hierbei wurde die Abweichung der C_β -Position von der Ideal-Koordinate nach *Lovell et al.* [189] berechnet. Detaillierte Ergebnisse sind in Tabelle 3.38 gegeben. In Abbildung 3.19 ist die zweidimensionale Verteilung der ΔC_β gegeben. So ergab die C_β -Untersuchung hinsichtlich der Mittelwerte (μ) keine signifikanten Unterschiede, lediglich die Standardabweichung (σ) war bei dem Nt_3CB2 Modell leicht erhöht, was sich durch Abbildung 3.19 erklärt. Auch war die prozentuale Abweichung zwischen dem jeweiligen Modell und Vorlage moderat und vergleichbar. Für das Nt_1Z5W-Modell wurden keine ΔC_β -Werte größer 0,25 Å gefunden. Die Nt_3CB2 Modell lieferte hingegen 2 Werte im Intervall zwischen 0,25 und 0,50 Å.

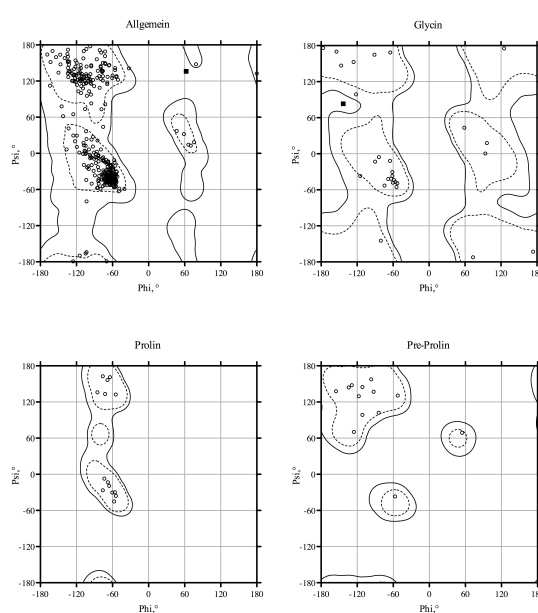
Tabelle 3.38: Statistische Betrachtung der ΔC_β Werte

Struktur(modell)	Hs_1Z5W	Nt_1Z5W	Hs_3CB2	Nt_3CB2
$\mu_{\Delta C_\beta}$, [Å]	0,0500	0,0530	0,0516	0,0547
$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu_{\Delta C_\beta})^2}{n}}$	0,0316	0,0323	0,0364	0,0423
% σ ΔC_β		5,643		5,622
$\Delta C_\beta > 0,25$ Å	0	0	2	2
$\Delta C_\beta > 0,50$ Å	0	0	0	0

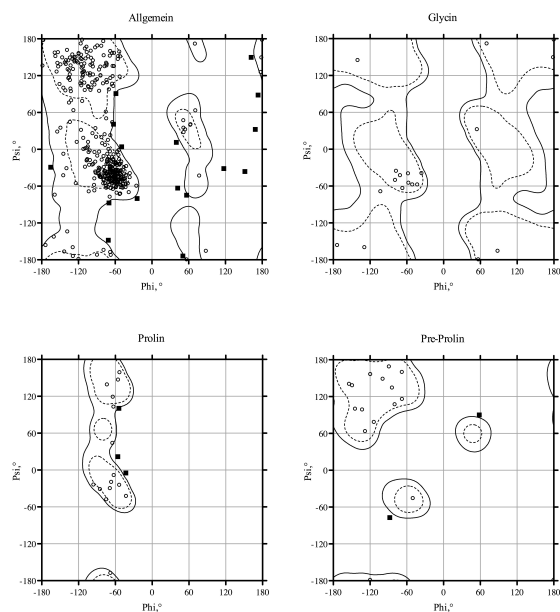
Nt_1Z5W-Modell



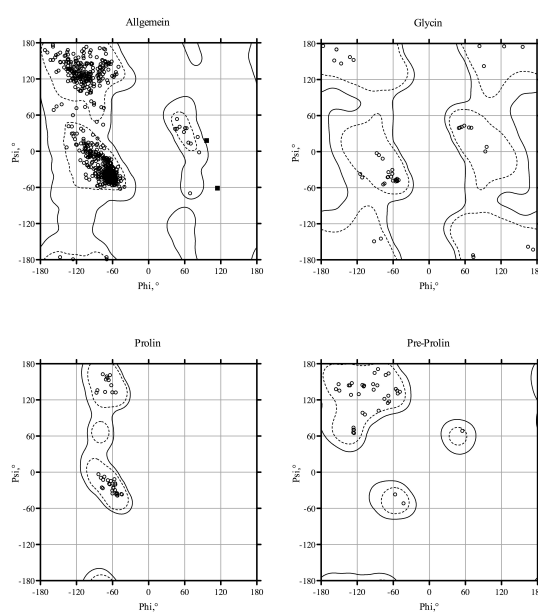
Nt_3CB2-Modell



Hs_1Z5W-Struktur



Hs_3CB2-Struktur

Abbildung 3.18: Ramachandran-Plots der γ -Tubulin Strukturmodelle

Auf der Abszisse der jeweiligen Plots ist ϕ und auf der Ordinate ψ in Grad aufgetragen. Bei dem besten Nt_1Z5W Modell lagen 82,5% (364/441) der Aminosäuren innerhalb der favorisierten Bereiche (Sollwert: 98,0%) und 94,3% (416/441) in erlaubten Bereichen (Sollwert: >99,8%). Bei dem besten Nt_3CB2 Modell lagen 95,7% (427/446) der C_{α} -Torsionswinkelkombinationen innerhalb der erlaubten Bereiche und 99,6% (444/446) innerhalb favorisierter Regionen. Bei der Hs_1Z5W Struktur lagen 82,0% (324/395) der Aminosäuren innerhalb der favorisierten Bereiche (Sollwert: 98,0%) und 94,7% (374/395) in erlaubten Bereichen (Sollwert: >99,8%). Bei der Hs_3CB2 Struktur lagen 98,0% (819/836) der C_{α} -Torsionswinkelkombinationen innerhalb der erlaubten Bereiche und 99,8% (834/836) innerhalb favorisierter Regionen.

Legende: Grenze erlaubter $[\phi, \psi]$ Bereiche (—), Grenze favorisierter $[\phi, \psi]$ Bereiche (---), C_{α} -Torsionswinkelkombination innerhalb erlaubter Bereiche (○), C_{α} -Torsionswinkelkombination außerhalb erlaubter Bereiche (■)

$\Delta C\beta$ kleiner 0,25 Å gelten als unproblematisch. Differenzen größer 0,50 Å gelten als problematisch, da hier der Schwellenwert einer signifikanten Verzerrung drastisch überschritten ist. Jedoch ist eine $C\beta$ -Verzerrung unproblematischer zu bewerten als eine $C\alpha$ -Verzerrung.

Eine Berechnung der Abweichung des quadrierten mittleren Abstandes äquivalenter Atome (RMSD) nach Gleichung 3.7 sollte Aufschluss über die Gesamtheit der räumlichen Abweichung (δ) der $N-C\alpha$ -Atome liefern.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2} \quad (3.7)$$

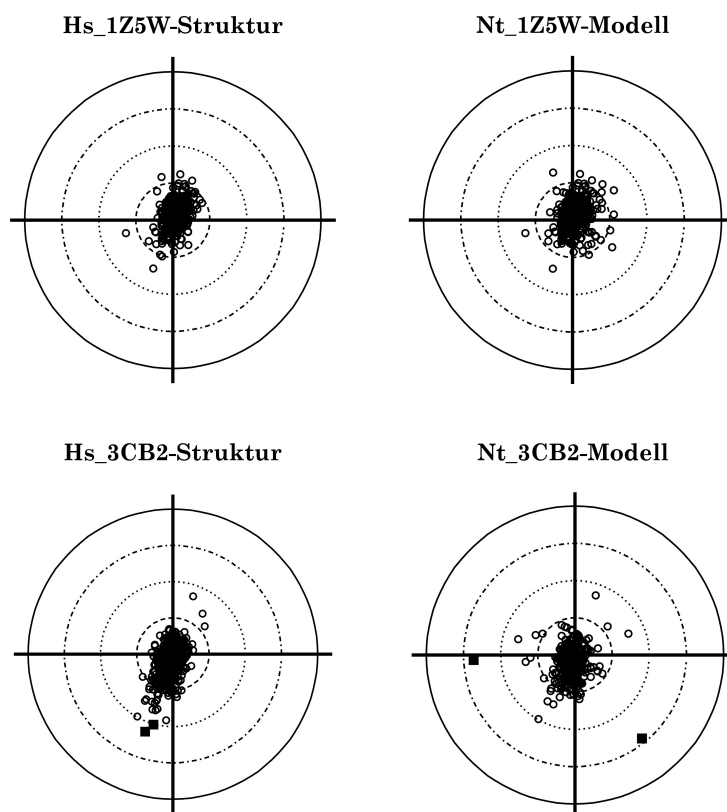


Abbildung 3.19: **Vergleichender $\Delta C\beta$ Plot der γ -Tubulin Strukturen**
Auf der Abszisse ist der x- und auf der Ordinate der y-Anteil an $\Delta C\beta$ für die einzelnen Aminosäuren aufgetragen. Der z-Anteil wird bei der Kalkulation nicht berücksichtigt. Die Kreislinien geben Abstand vom Zentrum in Å an: 0,125 (---), 0,250 (···), 0,375 (-·-·-) und 0,500 (—). $\Delta C\beta < 0,25$ Å (○), $\Delta C\beta > 0,25$ Å (■)

Die Berechnung erfolgte mittels des Pymol *align*-Skripts. Die Daten sind in Tabelle 3.39 gegeben. Beim Nt_1Z5W Modell zeigte sich zur Strukturvorlage keine Abweichung bezüglich der Position der $N-C\alpha$ -Atome. Das Nt_3CB2 Modell wies nur einen geringen Unterschied von 0,001 Å

zur Strukturvorlage Hs_3CB2_A auf und zur Hs_3CB2_B Vorlage betrug der Unterschied 0,343 Å. Zur Modellierung

wurden beide Hs_3CB2

Vorlagen gewichtet in die Kalkulation mit einbezogen. Da das A-Peptid im Bereich des C-Terminus über schlechte Scoring-Werte verfügte, wurde das B-Peptid in diesem Bereich stärker gewichtet.

Tabelle 3.39: RMSD-Vergleich der einzelnen Strukturen und Modelle

	Nt_1Z5W	Hs_3CB2_A	Hs_3CB2_B	Nt_3CB2
Hs_1Z5W	0.000	0.499	0.578	0.501
Nt_1Z5W		0.586	0.499	0.513
Hs_3CB2_A			0.340	0.001
Hs_3CB2_B				0.343

Abschließend wurden die Modelle einem von *Chen et al.* [174] entwickelten Scoring-Verfahren unterzogen, das die oben betrachteten Analysen zusammenführt. Hierbei handelt es sich um den sogenannten *MolProbity Score*, der sich aus dem Beitrag stereochemischer Überlappungen (*Clashscore*), dem Anteil schlechter Rotamere und der Gesamtzahl der favorisierten $[\phi, \psi]$ -Kombinationen errechnet. Die Ergebnisse sind für die beiden besten γ -Tubulin Strukturmodelle in Tabelle 3.40 gegeben. Ein niedriger Clash- und MolProbity Score bzw. hoher Prozentrang sind

Tabelle 3.40: MolProbity-Scoring Ergebnisse der beiden besten Modelle

	Nt_1Z5W Modell	Nt_3CB2 Modell
Clashscore [†]	23,58*	1,68***
	23 ^{te} Perzentil (N=1784)	99 ^{te} Perzentil (N=1784)
Poor Rotamers	5,14%*	3,55%**
$[\phi, \psi]$ Outliers	5,67%*	0,45%**
$[\phi, \psi]$ Favored	82,54%*	95,74%**
MolProbity Score	3,10**	1,63***
	19 ^{te} Perzentil (N=27675)	91 ^{te} Perzentil (N=27675)

[†] Sterische Überlappungen größer 0,4 Å pro 1000 Atome

Qualität des Wertes: * niedrig ** mittel *** sehr gut

Indizien für eine qualitativ gutes Strukturmodell. Auch hierbei bestätigte sich, dass das Nt_3CB2 Modell dem Nt_1Z5W Modell qualitativ überlegen ist. Für das weitere Vorgehen wurde nur das Nt_3CB2 als bestes Homologie-Modell verwendet.

3.1.1.2 Threading-Modellierung

Zur Sicherstellung, dass das beste Modell für die strukturellen Betrachtungen zur Verfügung stand, erfolgte noch eine externe γ -Tubulin Modellierung. Diese sollte dann mit dem höchst bewerteten Homologie-Modell verglichen werden. Hierzu wurde die von *Bennett-Lovsey et al.* [190] etablierte *Protein Homology/analogy Recognition Engine* (Phyre) zur Modellierung genutzt. Der Phyre Server [178] berechnete ein Strukturmodell ebenfalls ausgehend von der γ -Tubulin Proteinsequenz *N. tabacum* (GenBank: CAC00547.1).

Strukturmodell Ausgehend von einer Auswahl optimaler Faltungserkennungsmethoden (Sequenz-Profil, Profil-Profil und Sekundär Struktur Analyse) wurde zuerst eine Vorhersage über mögliche Faltungsbereiche getroffen und paarweise PSI-Blast Alignments berechnet, bevor ein Sequenzmodell ausgehend von einer Datenbank mit dreidimensionalen Strukturen erstellt wurde. Eine Bewertung erfolgte ebenfalls durch eine Similarity-Kalkulation durch den Phyre Server.

Tabelle 3.41: Fold-Recognition Scores der γ -Tubulin Modelle

Rang	SCOP Code	Erwartungswert	Vorraussichtliche Modellgenauigkeit, %	Sequenz Identität, %	Länge des Proteins
1	c1z5wA	$0,0 \cdot 10^0$	100	70	474
2	c1sa0C	$1,6 \cdot 10^{-43}$	100	31	451
3	c2hxbB	$6,6 \cdot 10^{-43}$	100	34	445
4	c2btqB	$3,2 \cdot 10^{-41}$	100	35	426
5	c2btqA	$1,2 \cdot 10^{-40}$	100	26	473
6	d1tubb1	$8,8 \cdot 10^{-27}$	100	40	243
7	d1tuba1	$2,5 \cdot 10^{-26}$	100	38	245
8	d1tuba2	$2,3 \cdot 10^{-16}$	100	24	195
9	d1tubb2	$6,5 \cdot 10^{-16}$	100	27	184
10	c2r6r1	$1,1 \cdot 10^{-4}$	95	12	338

Das Scoring der besten Modelle ist in Tabelle 3.41 gegeben. Das vom Phyre Server als, mit Abstand, am besten bewertete Modell war ein auf Grundlage der humanen 1Z5W Struktur gefaltete Modell. Dieses Ranking wurde nochmals auf Grundlage strukturebiologischer Parameter evaluiert.

Modellevaluation Durch eine, der vorherigen Homologie-Modellierung analogen Evaluation konnte das c1z5wA-Modell als bestes der Phyre Threading-Modelle bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Abschließend sollte durch einen Scoring-Vergleich des Threading-Modells Nt_c1z5wA mit dem besten Homologie-Modell Nt_3CB2 ein optimales Modell gefunden werden, das für weitere Analysen verwendet werden soll. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 3.20 gezeigt. Die Überlagerung der Strukturen zeigte ebenfalls deutliche Ähnlichkeiten zwischen den beiden Modellen (Abbildung 3.20.A). Jedoch bei der Betrachtung der $[\phi, \psi]$ -Winkel zeigten sich bei insgesamt 23 C_α -Atomen verbotene Winkelkombinationen (Abbildung 3.20.B). Der $\Delta C\beta$ -Mittelwert der Gesamtheit lag bei $\mu_{\Delta C\beta} = 0,095$ Å mit einer Standardabweichung von $\sigma = 0,179$ Å. Bei den $\Delta C\beta$ -Werten waren 28 C_β -Atome mit Abweichung größer $0,25$ Å und 11 mit Abweichung größer $0,50$ Å behaftet. Diese hohe Maß an Streuung ist nicht gleichmäßig über alle Quadranten verteilt, sondern zeigt eine deutliche Verschiebung in den 2 Quadranten (Abbildung 3.20.C). Wie aus Tabelle 3.42 ersichtlich ist liegt der Score deutlich über dem des Nt_3CB2 Homologiemodells (Tabelle 3.40).

Tabelle 3.42: MolProbity-Scoring Ergebnisse für das Threading- γ -Tubulin-Modell

Nt_c1z5wA Modell	
Clashscore [†]	56,81*
	2^{te} Perzentil (N=1784)
Poor Rotamers	3,87%**
$[\phi, \psi]$ Outliers	5,23%*
$[\phi, \psi]$ Favored	82,73%*
MolProbity Score	3,37**
	11^{te} Perzentil (N=27675)

[†] Sterische Überlappungen größer $0,4$ Å pro 1000 Atome

Qualität des Wertes: * niedrig ** mittel *** sehr gut

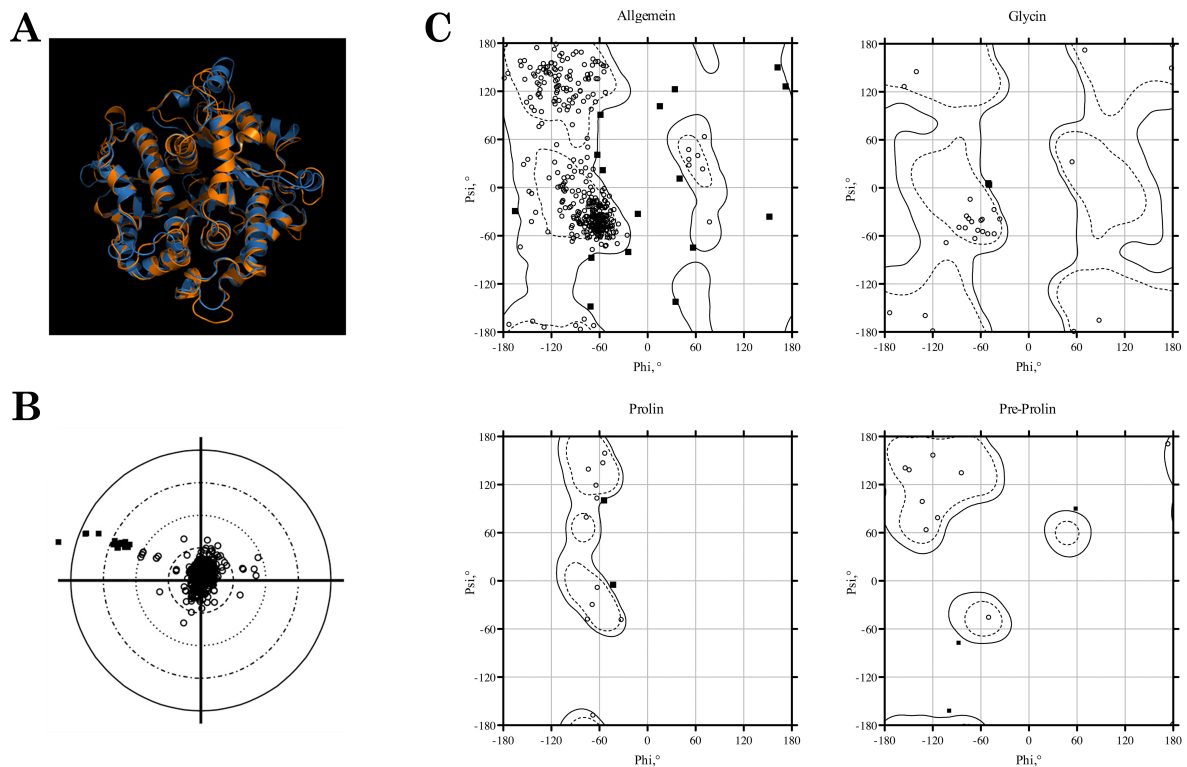


Abbildung 3.20: **Proteinrückgradanalyse des Nt_c1zw5A-Strukturmodells**

A Darstellung der Überlagerung des Nt_3CB2 (orange) Homologie- und Nt_c1z5wA (blau) Threading-Strukturmodells.

B $\Delta C\beta$ -Plot des Nt_c1z5wA Threadingmodells. Auf der Abszisse ist der x- und auf der Ordinate der y-Anteil an $\Delta C\beta$ für die einzelnen Aminosäuren aufgetragen. Der z-Anteil wird bei der Kalkulation nicht berücksichtigt. Die Kreislinien geben den Abstand vom Zentrum in Å an: 0,125 (---), 0,250 (···), 0,375 (----) und 0,500 (—). $\Delta C\beta < 0,25$ Å (○), $\Delta C\beta > 0,25$ Å (■)

C Ramachandran-Plots des Nt_c1z5wA Threadingmodells. Grenze erlaubter $[\phi, \psi]$ Bereiche (—), Grenze favorisierter $[\phi, \psi]$ Bereiche (---), C_α -Torsionswinkelkombination innerhalb erlaubter Bereiche (○), C_α -Torsionswinkelkombination außerhalb erlaubter Bereiche (■).

Aufgrund der vorher genannten Fakten fand das Threading-Modell Nt_c1z5wA keine weitere Verwendung bei strukturb biologischen Betrachtungen.

3.1.1.3 Analyse der Ladungsdichteverteilung

Ausgehend von dem Nt_3CB2 Homologie-Modell wurde die elektrostatische Ladungsdichte berechnet. Dies sollte der Überprüfung einer vermuteten Oberflächenladungspolarisation dienen. Hierzu war die Kenntnis weiterer Kraftfeld relevanter Parameter wie Atomladungen und -radien erforderlich. Auch war das Modell um bisher fehlende Wasserstoffatome zu erweitern, die bisher eine untergeordnete Rolle spielten. Dies erfolgte mit PDB2PQR von *Dolinsky et al.* [171].

Die Berechnung erfolgte mit der APBS Software [191] und des ICM REBEL Algorithmus [192]. Beide Programme konnten linearisierte und nicht linearisierte Poisson-Boltzmann Gleichungen lösen. Ausgehend von der *Laplace-Gleichung* wurde diese gelöst. Das Problem besteht darin, in Annahme eines homogenen Systems, eine skalare, zweifach stetig differenzierbare harmonische Funktion (ϕ) in Form der Gleichung 3.8 zu bestimmen [193].

$$\vec{\nabla}(\vec{\nabla}\phi(\vec{r})) = 0 \quad (3.8)$$

Die Berechnung der Ladungsdichte ($\rho(\vec{r})$) basierte auf der *Poisson Gleichung* (Gouy [194] und Chapman [195]) verändert nach Totrov und Fogolari et al. [192, 196] (Gleichung 3.9).

$$\rho(\vec{r}) = -\epsilon\vec{\nabla}(\vec{r})\nabla\phi(\vec{r}) \quad (3.9)$$

Die raumabhängige Lösung ergibt den finalen Term der *Poisson-Boltzmann Gleichung* (3.10), dieser wurde für alle folgenden Berechnungen (im elektrostatischen CGS-Einheitensystem) verwendet. Dabei wurde die räumlich aufgelöste Potentialdifferenz abhängig von der Konzentration der Ionen in unendlichem Abstand zum Molekül (c_i^∞), der Valenz (z_i), Protonenladung (q), Boltzmannkonstante (k), Temperatur (T) und der räumlichen Zugänglichkeit (λ) am Punkt $\vec{r}$ betrachtet .

$$-4\pi\rho(\vec{r}) = \vec{\nabla}(\epsilon(\vec{r})\nabla\phi(\vec{r})) = -4\pi\rho(\vec{r}) - 4\pi\sum_i c_i^\infty z_i q \exp\frac{-z_i q \phi(\vec{r})}{kT} \lambda(\vec{r}) \quad (3.10)$$

Der ICM REBEL Algorithmus sucht eine Ladungsverteilung auf der dielektrischen Ladungsgrenze, die das elektrische Feld in dem uniformen Medium reproduziert und beschreibt. Nachdem eine solche Verteilung gefunden ist, wird das elektrostatische Potential für jeden Punkt der Oberfläche ausgehend vom *Coulombschen Gesetz* berechnet. Das Ergebnis der ICM REBEL Berechnung ist in Abbildung 3.21 gegeben.

APBS basiert auf einer Kombination von endlichen Differentialen und dem *Bank-Holst Algorithmus* [197], implementiert durch einen *Parallel Multigrid solver*. Die Qualität der Lösung der endlichen Differenz Methode ist antiproportional zur Rechenzeit und wird durch die Auflösung (Gittergröße und Anzahl der Gitterknotenpunkte) bestimmt. Bei 200 byte pro Gitterpunkt waren bis zu maximal 2,4 Gigabyte Daten pro Kalkulation zu verarbeiten. Das Ergebnis dieser Berechnung unterschied sich nur minimal von dem der ICM REBEL Kalkulation und ist im Appendix A.47 gezeigt. Aufgrund dessen ist zu auch verstehen, weshalb die ICM REBEL Lösung im Vergleich zu der APBS eine homogenere Ladungsverteilung ergab.

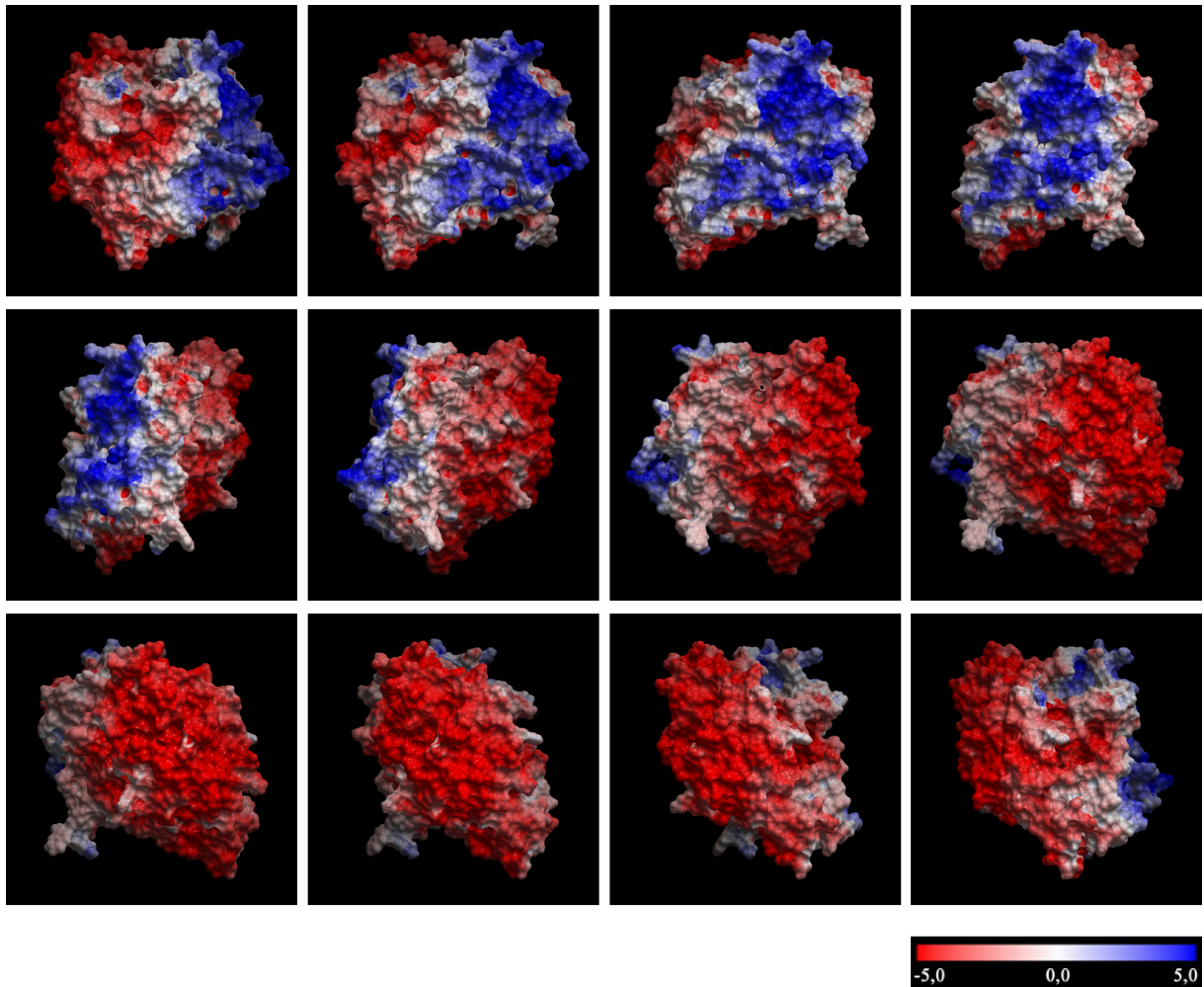


Abbildung 3.21: Plot des elektrostatischen Oberflächenpotentials für Nt_3CB2

Über das Proteinrückgrad wurde ein Netz gelegt, dass entsprechend dem jeweiligen Potential eingefärbt wurde. Ausgehend von der Grundansicht (oben links) erfolgte eine Drehung im Uhrzeigersinn um jeweils 30° um die z-Achse. Die Referenz für das elektrostatische Potential ist in der Joule pro Coulomb gegeben. Umgerechnet in das elektrostatische CGS-Einheitensystem entspricht $1 \text{ Volt} = \frac{1}{300} \frac{\sqrt{\text{cm} \cdot \text{g}}}{\text{s}}$.

Beide Berechnungen ergaben für die Oberfläche des Nt_3CB2 Modells eine deutliche Polarisation mit gegenüberliegenden Bereichen hoher und niedriger Ladungsdichte. Die gefundene Polarisation ermöglichte weitere Vermutungen zum Aufbau und zur Organisation des gTuRC sowie möglicher Interaktionsstellen.

3.1.2 Vergleichende Primärstrukturanalyse

Ausgehend von dem Alignment der γ -Tubulin-Sequenzen 10 repräsentativer Organismen wurden Kalkulationen zur Diversität und Phylogenie durchgeführt. In die Betrachtung der γ -Tubulin Proteinevolution wurde auch das *E. coli* Protein *FtsZ* mit einbezogen, das als prokaryotisches Homolog der eukaryotischen Tubuline gilt [11]. Die Ergebnisse der vergleichenden Primärstrukturanalyse der γ -Tubulin-Volllängensequenz sind in Abbildung 3.22 gezeigt.

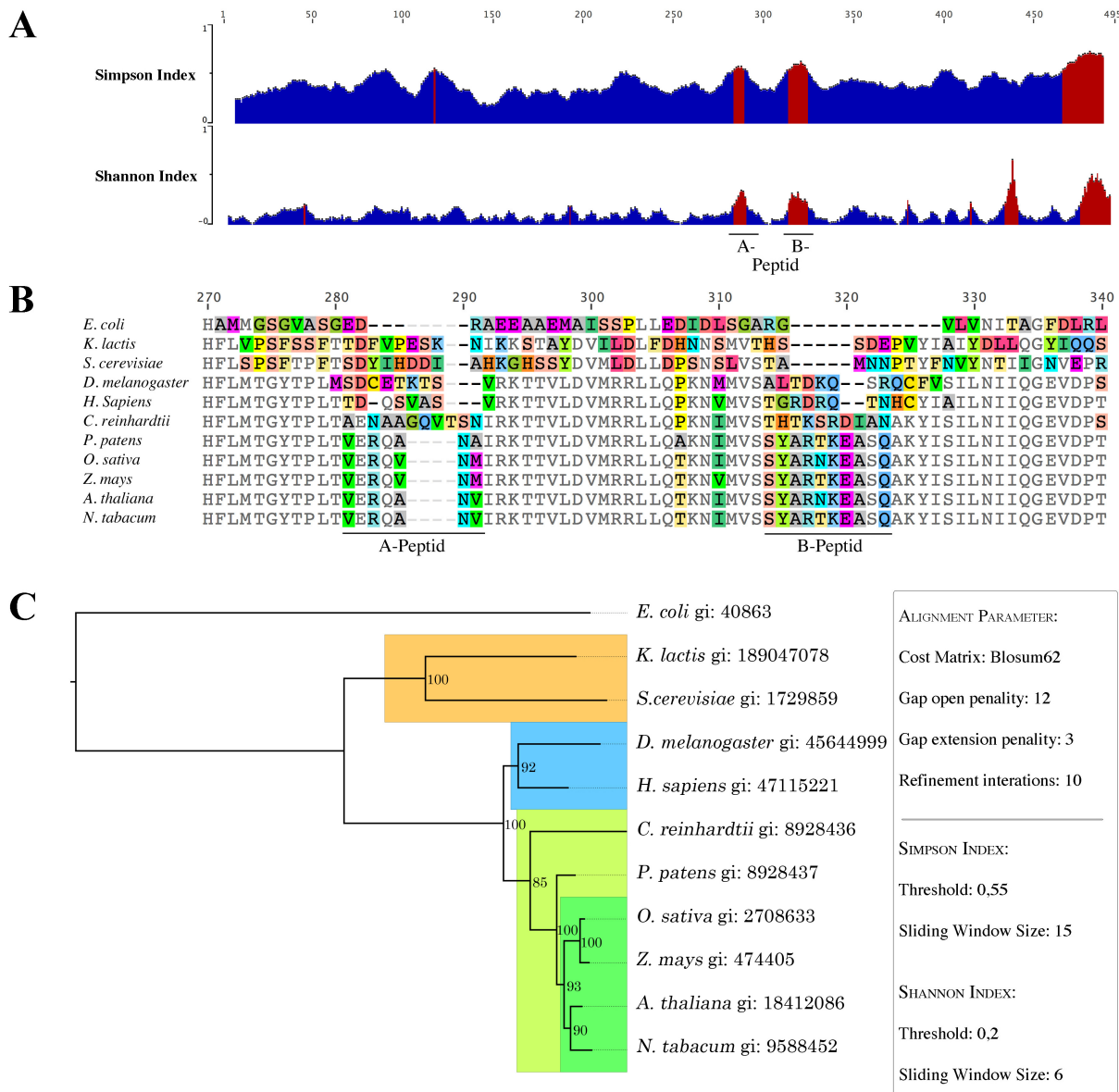


Abbildung 3.22: Vergleichende γ -Tubulin Primärstrukturanalyse

A Plot der Simpson- und Shannon-Diversitätsindices des Alignments aller 10 Modellorganismen. Bereiche erhöhter Diversität sind rot dargestellt.

B Ausschnitt aus dem MUSCLE-Proteinsequenzalignment des γ -A/B-Peptid-Bereichs sowie angrenzender Aminosäuren. Konservierte Aminosäuren sind grau dargestellt, divergente farblich hervorgehoben.

C Phylogenetischer Stammbaum der γ -Tubulin Aminosäuresequenz. An den Knotenpunkten sind die Bootstrap Werte gezeigt. Die NJ-Berechnung erfolgte mit 1000 Bootstrap-Replikaten.

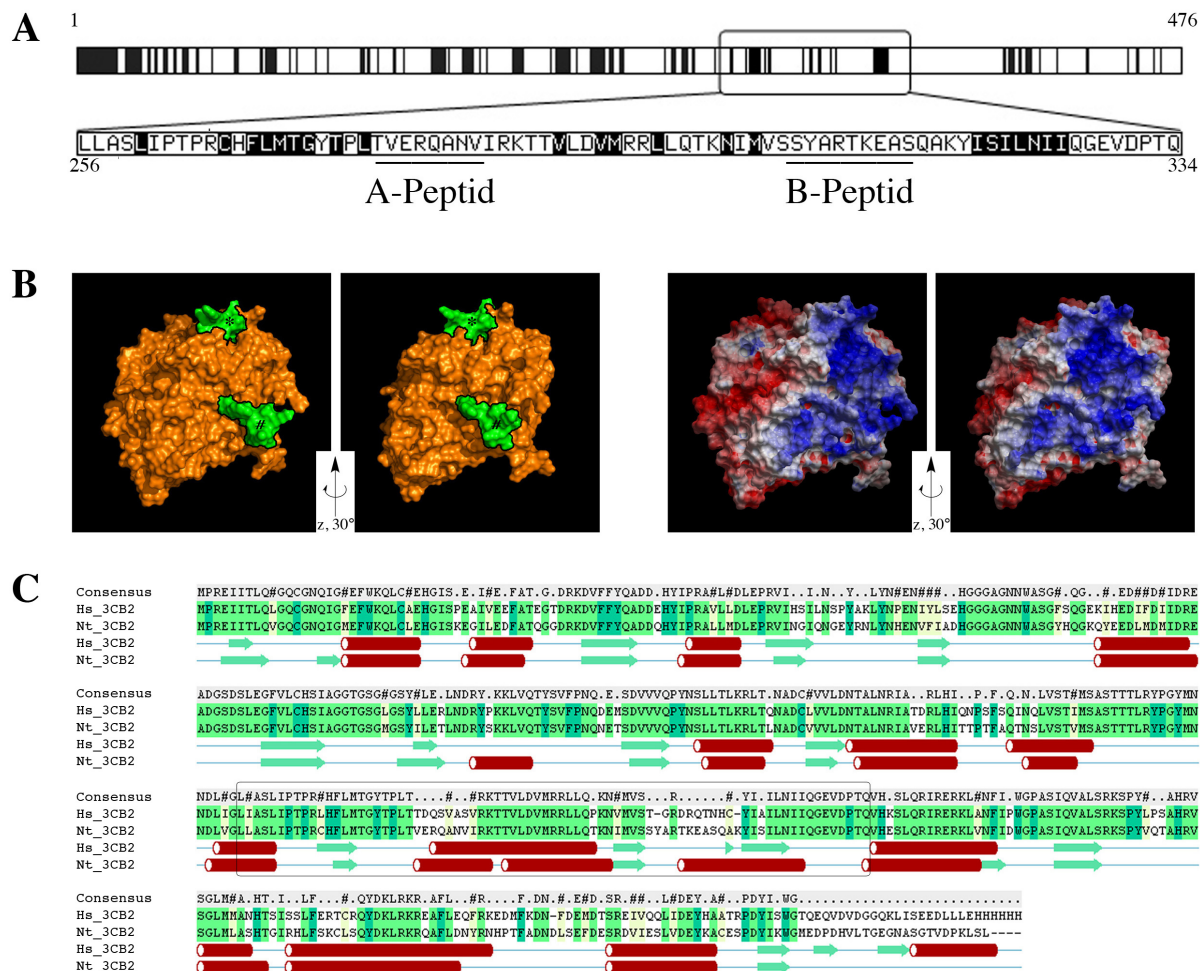
Mit der ProtTest Software wurde das LG+G+F Modell als beste Näherung der Proteinevolution nach dem *Akaike Information Kriterium* identifiziert. Die Berechnung des *Simpson index* [198] sowie des *Shannon Index* [199] für das Aminosäurealignment wurde mit Geneious durchgeführt und sollte Aufschlüsse über den Konservierungsgrad einzelner Sequenzabschnitte geben. Die Berechnung der Indices lieferte vereinzelte Abschnitte und größere zusammenhängende Cluster erhöhter Divergenz verteilt über die gesamte Alignmentlänge. Generell stieg die Diversität zum C-Terminus hin an. In der Schnittmenge des *Simpson* und *Shannon Index* befanden sich drei divergente (3.22.A). Es handelte sich zum Einen um den Bereich des C-Terminus, zum Anderen um das sogenannte γ -A/B-Peptid [43].

Eine detailliertere Sequenzbetrachtung dieser beiden letzten Peptidbereiche ist in Abbildung 3.22.B gegeben. Auch ist deutlich zu erkennen, dass ausgehend von *Physcomitrella patens* bis hin zu *Nicotiana tabacum* ein hoher Konservierungsgrad im γ -A/B-Peptid Bereich vorliegt. Alle anderen Organismen zeigten in diesen beiden Bereichen einen hohen Divergenzgrad, flankiert von konservierten Bereichen (ausgenommen *K. lactis*, *S. cerevisiae* und *E. coli*).

Die phylogenetische Kalkulation zeigte, dass die genetische Distanz für γ -Tubulin ausgehend von *E. coli* über die Gruppe der Hefen, den bilateralsymmetrisch-triploblastischen Gewebetiere, den photosynthetisch aktiven Eukaryoten (Grünalge und Laubmoos) hin zu den höheren Pflanzen ansteigt. Zu der zu exprimierenden γ -Tubulin Zielsequenz aus *N. tabacum* zeigte die γ -Tubulin-Sequenz aus *A. thaliana* den geringsten evolutiven Abstand. Ausgehend von diesen Daten konnte *E. coli* als erster Organismus für eine Expression von γ -Tubulin aus *N. tabacum* bestimmt werden, da hier keine physiologischen Rückkopplungen durch die γ -Tubulin-Überexpression zu erwarten sind. Etwaige Effekte wie organismenspezifische Glykosylierungen, das Vorhandensein von Chaperonen, etc. wurden vorerst bei der Auswahl des Expressionssystems vernachlässigt.

3.1.3 Identifikation potentieller pflanzenspezifischer Interaktionsstellen

Eine nachfolgende Betrachtung der Lokalisation der Aminosäuren und deren Beitrag zur Solvens zugänglichen Proteinoberfläche, im Speziellen der γ -A/B-Peptid-Bereich, Korrelation zur Ladungsdichteverteilung sowie ein Vergleich der zu erwartenden Sekundärstruktur zu der Sekundärstruktur der bekannten humanen sollten die Vermutung eines potentiellen pflanzenspezifischen Interaktionsbereichs überprüfen. Das Ergebnis der Betrachtung des Oberflächenanteils einzelner Aminosäuren sowie der Sekundärstrukturvergleich ist in Abbildung 3.23 gezeigt.

Abbildung 3.23: Vergleichende γ -Tubulin Sequenz- und Strukturanalysen

A Binäre Darstellung des Oberflächenkontakts einzelner Aminosäuren des Nt_3CB2 Modells. Aminosäuren ohne Kontakt zur Oberfläche sind schwarz unterlegt, Aminosäuren die einen Beitrag zur Oberfläche leisten hingegen weiß unterlegt. Der γ -A/B-Peptid-Bereich sowie flankierende Bereiche wurden mit der Aminosäuresequenz vergrößert dargestellt.

B Dreidimensionale Darstellung der Proteinoberfläche des Nt_3CB2 Modells (orange) mit den grün hervorgehobenen und umrandeten γ -Peptid A (*) und B (#) Bereichen. Dem gegenüber ist ein Auszug aus Abbildung 3.21 mit dem elektrostatischen Oberflächenpotential des Nt_3CB2 Modells in analoger Orientierung zum Vergleich gezeigt.

C Korrelierte Betrachtung der Primär- und Sekundärstruktur für ein Alignment der menschlichen (Hs_3CB2) und Tabak (Nt_3CB2) γ -Tubulin-Sequenz. Bereiche hoher Konservierung sind grün, mittlerer Konservierung gelb unterlegt. Divergente Bereiche sind weiß unterlegt. Für die an das Alignment gekoppelte Darstellung der Sekundärstrukturen gilt, dass Pfeile β -Faltblatt- und Zylinder α -Helix-Strukturen repräsentieren. Der grüne Strich symbolisiert das Proteinrückgrad ohne solche spezifischen Sekundärstrukturen. Der γ -A/B-Peptid-Bereich wurde durch einen Rahmen hervorgehoben.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich der Aminosäurenanteil mit Oberflächenkontakt zum C-Terminus hin erhöht. Auch sind beide γ -A/B-Peptid-Bereiche an der Oberfläche exponiert und zusätzlich in Bereichen erhöhter Ladungsdichte lokalisiert (Abbildung 3.23.B). Aus der Betrachtung der bekannten menschlichen Sekundärstruktur mit der zu erwartenden Sekundärstruktur für *N. tabacum* ergab sich nur für den γ -B-Peptid-Bereich eine signifikante Abweichung. So wird ausgehend von der Primärstruktur eine α -Helix vorhergesagt.

3.2 Klonierung und Expression von γ -Tubulin

Eine Vorbedingung für eine Struktur- und Interaktionspartnerbestimmung war es größere Mengen an purifiziertem Protein zur Verfügung zu haben. Hierzu sollten verschiedene pro- und eukaryotische Expressionssysteme verwendet werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Expression von γ -Tubulin aus *N. tabacum* in verschiedenen zellulären Expressionssystemen dargestellt.

3.2.1 Bakteriellles pET-Expressionssystem

Die *in silico* Vorhersagen zur Phylogenie und die erfolgreiche Expression von α - und β -Tubulin mit IPTG-induzierbaren bakteriellen Expressionssystemen [200] sprachen für eine Verwendung des pET-Systems. Alle gezeigten Ergebnisse wurden mit dem T7/*lacO*-Promotor basierten pET-Vektorsystem erzielt. Stets wurden mindestens 3 Klonlinien zur Expression geführt, um die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen zu minimieren. Ein Teil der nachfolgenden Ergebnisse ist bereits in den Diplomarbeiten von Herrn Daniel Weiß [201] und Frau Esther Göbel [202] gezeigt.

3.2.1.1 γ -Tubulin mit C-terminaler Hexahistidin-Sequenz

Zur späteren Purifikation des rekombinanten Proteins wurde die γ -Tubulin Vollständigensequenz durch Klonierung um eine C-terminale Hexahistidin kodierende Sequenz erweitert. Die Entscheidung für einen His₆-Tag erfolgte aufgrund der geringen Größe im Vergleich zu anderen Tags [203], im Allgemeinen vernachlässigbarer struktureller Einflüsse auf das Zielprotein [204] und der kosteneffizienten Purifikationsmatrix [205]. Basierend auf dem Nt_3CB2 Strukturmodell sollte die His₆-Modifikation C-terminal erfolgen, da hier aufgrund der Lokalisation im Vergleich zum N-Terminus ein geringerer sterischer Einfluss für spätere Proteininteraktionsstudien erwartet wurde. Aufgrund der geringen Größe des His₆-Tags wurde auf den Einbau einer Protease-Schnittstelle zur späteren Entfernung des Tags verzichtet.

Amplifikation und Klonierung Ausgehend von einer erstellten cDNA wurde eine um Schnittstellen erweiterte γ -Tubulin-CDS amplifiziert (NdeI_ γ -Tubulin_SalI). Der reverse Primer mit der SalI Schnittstelle enthielt keine His₆- und Stop-Codon-Sequenz, denn es sollte die auf dem pET-44a(+) Vektor enthaltene His₆- und Stop-Codon-Sequenz genutzt werden. Zur Steigerung der Klonierungseffizienz wurde das Amplifikat in den pJET1.2/blunt-Vektor kloniert. Durch die Restriktionsenzyme NdeI und SalI wurde die modifizierte γ -Tubulin-CDS aus dem pJET1.2/blunt_gTub Konstrukt ausgeschnitten und in den pET-44a(+)-Vektor via NdeI und XhoI eingebracht. Da die XhoI-Erkennungssequenz zweimal in der γ -Tubulin-CDS auftritt, wurde die Kompatibilität der SalI/XhoI Überhänge genutzt um die CDS gerichtet in den pET-44a(+)-Vektor zu integrieren. Hierbei traten die in Abbildung 3.24 gezeigten Modifikationen am 3'-Ende auf. Bei der Sequenzierung des Konstrukts pET-44a(+)_gTub wurden keine weiteren primärstrukturverändernde Modifikationen gefunden.

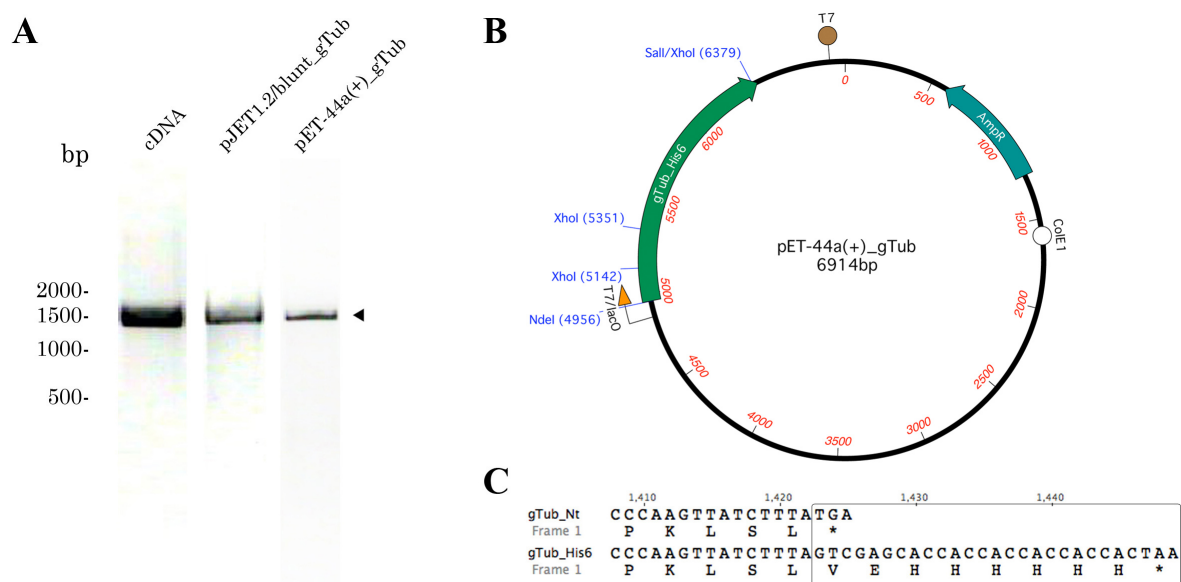


Abbildung 3.24: **Amplifikation und Klonierung der modifizierten γ -Tubulin-CDS in pET-44a(+)**

Ergebnis der Gelelektrophorese der PCR-Produkte (A) der γ -Tubulin-Oligonukleotiden (gTub_fwd_NdeI_ecoli und gTub_rev_SalI_ecoli) mit einer Übersicht des Expressionskonstruktes pET-44a(+)_gTub (B) und durch die Klonierung bedingter Modifikationen der γ -Tubulin-CDS (C). [8]

A Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte mit einer *N. tabacum* cDNA, des Subklonierungskonstrukts pJET1.2/blunt_gTub und des Expressionskonstrukts pET-44a(+)_gTub als Template in einem 1,0 Gew.-% Agarose-Gel. Die zu erwartende Amplifikatgröße lag bei 1448 bp.

B Schematische Darstellung des pET-44a(+) Vektors mit eingefügter γ -Tubulin-CDS unter Kontrolle eines T7/lacO Promotors und T7 Terminators. Weiter sind der Selektionsfaktor Amp^R, der Replikationsursprung ColE1 und die Position der relevanten Restriktionsendonukleaseschnittstellen gezeigt.

C Ausschnitt der nativen *N. tabacum* γ -Tubulin-CDS (gTub_Nt) und der durch die Klonierung modifizierten CDS (gTub_His6). Unter der jeweiligen CDS ist das Ergebnis der Translation samt Stop-Codon (★) gezeigt.

Expression von gelöstem γ -Tubulin Erste Expressionsversuche wurden mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) unternommen. Hierzu wurden kompetente BL21(DE3) Zellen mit dem pET-44a(+)_gTub Konstrukt transformiert, die Transformation mittels PCR verifiziert, die transformierten *E. coli* in LB Medium kultiviert und die γ -Tubulin-Expression mit IPTG induziert. Die Ergebnisse der vergleichenden immunochemischen Untersuchung denaturierter und nativer Proteinisolate sind in Abbildung 3.25.A gezeigt. Für das denaturierte Proteinisolat der induzierten Probe zeigte sich, dass eine dem γ -Tubulin zuzuordnende Bande im Bereich von 55 ± 3 kDa bereits nach 3 Stunden Induktion im Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gel dokumentierbar war. Der immunochemische Nachweis zeigte ein Signal der entsprechenden Größe und bestätigte die Annahme einer erfolgreichen heterologen γ -Tubulin Expression in *E. coli*. Die ECL-Nebensignale mit einem geringeren apparenten Molekulargewicht wurden bereits eingehend untersucht und diskutiert [8].

Die Untersuchung nativer Proteinisolate zuvor induzierter Proben ergab das in Abbildung 3.25.B gezeigte Ergebnis. Ein dem γ -Tubulin zugeordnetes Signal, sowohl auf der Ebene der SDS-PAGE als auch der der immunochemischen ECL-Reaktion, konnte nur im Pellet nachgewiesen werden.

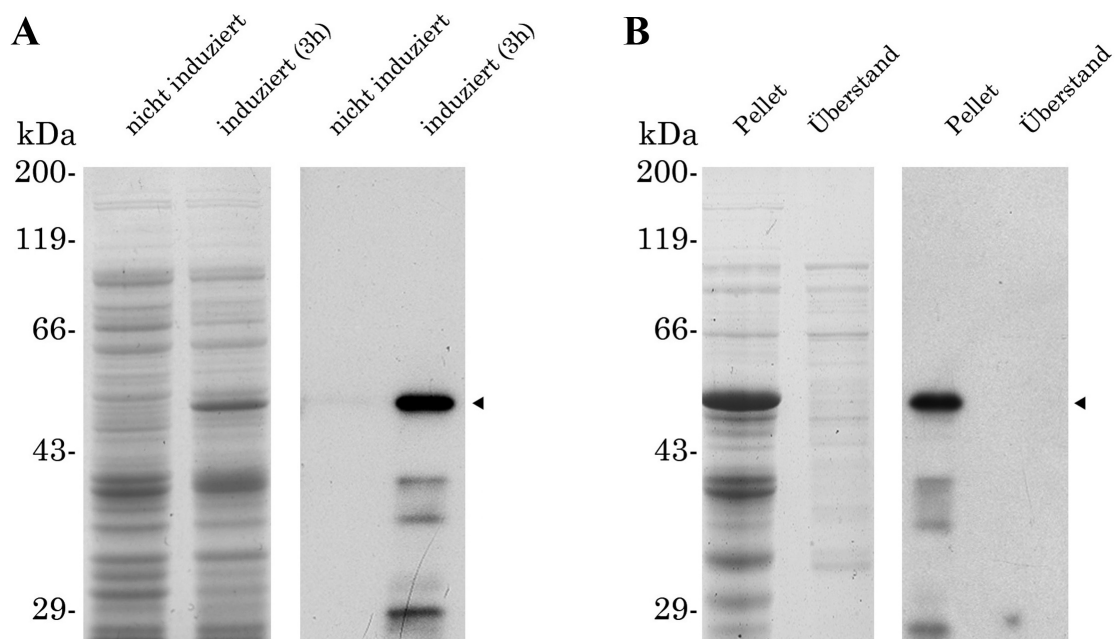


Abbildung 3.25: **Expression von γ -Tubulin in *E. coli***

SDS-PAGE-Gele (jeweils links) wurden mit kolloidalem Coomassie gefärbt, Röntgenfilme (jeweils rechts) für 8 Minuten belichtet. Zum immunochemischen Nachweis wurde der Antikörper Anti- γ -Tubulin AK 746 (Covalab) verwendet. Zur SDS-PAGE wurden 10,0 μ g und zum immunochemischen Nachweis nur 0,02 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Das zu erwartende Molekulargewicht des rekombinanten γ -Tubulins lag bei 54,29 kDa.

A Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung und immunochemischen Nachweises eines denaturierten Gesamtproteinisolats von mit dem Expressionskonstrukt pET-44a(+)_gTub transformierter, nicht induzierter BL21(DE3) und für 3 Stunden mit 1,0 mM IPTG induzierter BL21(DE3).

B Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung und des immunochemischen Nachweises des Pellets und Überstandes eines nativen Proteinisolats einer analog zu (A) induzierten Probe.

3.2.1.2 Strategie zur Expression von gelöstem γ -Tubulin in *E. coli*

Nachdem eine Expression von gelöstem γ -Tubulin in *E. coli* nicht mit einem Standardprotokoll durchführbar war, sollte eine umfangreiche Variation der Expressionsparameter, der Einfluss verschiedener *E. coli*-Stämme und γ -Tubulin-CDS Modifikationen auf die Löslichkeit des zu exprimierenden γ -Tubulins getestet werden. Die verwendete Strategie ist in Abbildung 3.26 gezeigt.

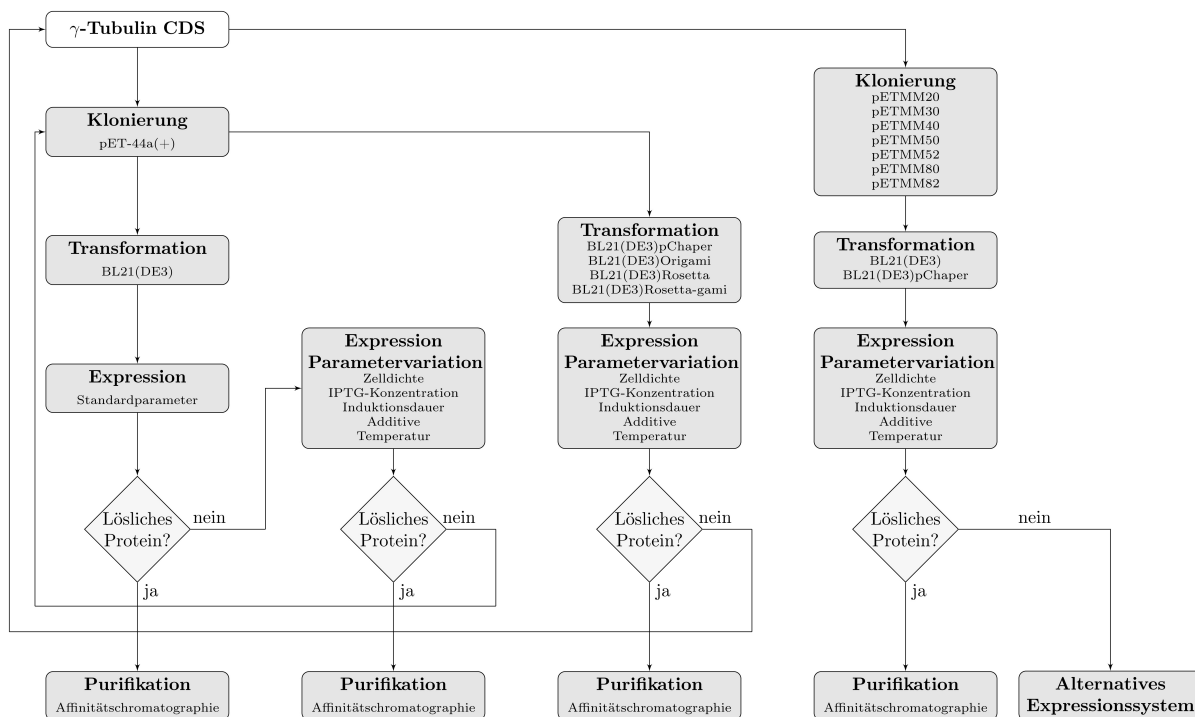


Abbildung 3.26: Strategie zur Expression der γ -Tubulin Vollängensequenz in *E. coli*

Variation der Expressionsparameter Für die mit dem Konstrukt pET-44a(+)_gTub transformierten *E. coli* wurden die für die Expression relevanten Parameter (wie OD₆₀₀ bei Induktion, IPTG-Konzentration, etc.) innerhalb der in Tabelle 3.43 angegebenen Grenzen variiert und die nativen Proteinextrakte hinsichtlich gelöstem γ -Tubulin untersucht.

Tabelle 3.43: Parametervariationen zur Expression von gelöstem γ -Tubulin

Parameter	Intervall
OD ₆₀₀ bei Induktion	[0,4; 0,6; 0,8; 1,0]
IPTG	[0,0; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0] mM
Induktionsdauer	[0,0; 0,25; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 16,0] Stunden
Glukose	[0,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0] mM
Temperatur	[15,0; 17,5; 20,0; 22,5; 25,0; 27,5; 30,0; 32,5; 35,0; 37,5] °C
Ethanolzugabe	[0,0; 1,0; 5,0] Vol.-%
<i>E. coli</i> -Stamm	[BL21(DE3); pChaper; Origami; Rosetta; Rosetta-gami]

Die Variation der Glukose-Konzentration sollte sich zum Einen direkt auf die *E. coli*-Wachstumsrate und zum Anderen auf das chemische Potential des Nährmediums und somit die Proteinlöslichkeit auswirken. Untersucht wurde auch der Einfluss der Anzuchttemperatur, welche auch die Löslichkeit beeinflussen kann [206], ebenso die Ethanolzugabe und eine Coexpression von Chaperonen [207]. Für keine der genannten Parameterkombination war eine Expression von gelöstem γ -Tubulin in BL21(DE3) dokumentierbar. In Abbildung 3.27 sind exemplarische Ergebnisse für die Expression von γ -Tubulin in verschiedenen *E. coli*-Stämmen gezeigt. Die Verwendung verschiedener *E. coli*-Stämme (BL21(DE3), pChaper, Origami, Rosetta, Rosetta-gami) und Chargen brachte ebenfalls keine Fortschritte zur Expression von gelöstem γ -Tubulin. Zum Ausschluss von möglichen Mutationen im regulativen Bereich des Expressionsvektors wurden auch zwei *de novo* reklonierte Expressionskonstrukte hinsichtlich der Expression von gelöstem γ -Tubulin untersucht. Auch hier war kein gelöstes Protein dokumentierbar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bereits die geringsten dokumentierbaren Mengen an γ -Tubulin stets im Pellet vorlagen.

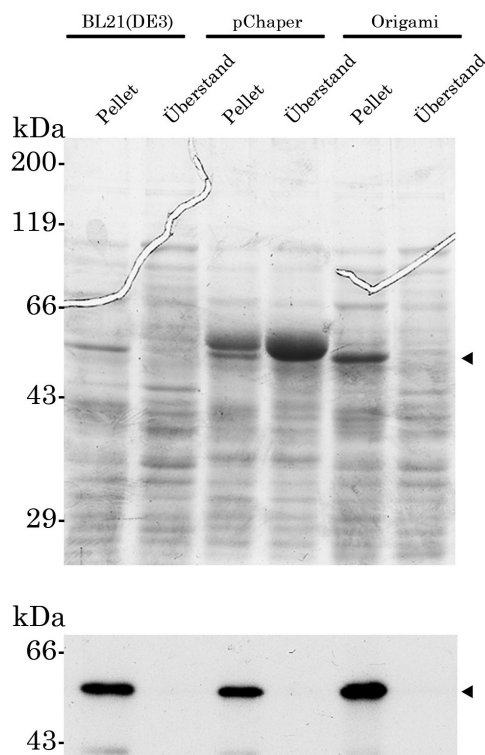


Abbildung 3.27: **Expression von γ -Tubulin in verschiedenen *E. coli* Stämmen**

Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung und immunochemischen Nachweises eines nativen Proteinisolats von mit dem Expressionskonstrukt pET-44a(+)_{gTub} transformierter, für 3 Stunden mit 1,0 mM IPTG induzierter BL21(DE3), BL21(DE3)pChaper und BL21(DE3)Origami.

Das SDS-PAGE-Gel (oben) wurde mit Coomassie gefärbt, der Röntgenfilm (unten) für 8 Minuten belichtet. Zum immunochemischen Nachweis wurde der Antikörper Anti- γ -Tubulin AK 746 (Covalab) verwendet. Zur SDS-PAGE wurden 10,0 μ g und zum immunochemischen Nachweis nur 0,02 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Das zu erwartende Molekulargewicht des rekombinanten, modifizierten γ -Tubulins lag bei 54,29 kDa.

Einsatz alternativer N-terminaler Tags Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurde die Annahme getroffen, dass das heterolog exprimierte γ -Tubulin als *Inclusion bodies* (IBs) aggregierte. Eine Rückfaltung wurde aufgrund strukturebiologischer Überlegungen und Hinweisen zur Komplexität der Proteinfaltung von Tubulinen [208] ausgeschlossen. Zur Expression von gelöstem, funktionellem γ -Tubulin in *E. coli* blieb nur die Möglichkeit der Erweiterung der γ -Tubulin-CDS um potentiell die Löslichkeit erhöhende Tags.

Durch die Integration der γ -Tubulin-His₆-Sequenz in die pETMM-Vektoren erfolgte eine Erweiterung dieser um diverse N-Terminale-Tag-Sequenzen abgegrenzt durch eine TEV-Protease-Schnittstellen-Sequenz. Sowohl die Löslichkeit erhöhende Tag-Sequenzen (wie MBP oder GST [209, 210]) als auch Protein modifizierende Tag-Sequenzen wurden der γ -Tubulin-CDS vorangestellt.

Die Ergebnisse der aufgrund der Primärstruktur zu erwartenden Wahrscheinlichkeit an gelöstem Protein nach *Wilkinson und Harrison* [211] sind in Tabelle 3.44 gegeben. Die Kalkulationen für die diversen N-terminalen Modifikationen lieferten sowohl erhöhte, als auch reduzierte Wahr-

Tabelle 3.44: Primärstruktur bedingte Wahrscheinlichkeit einer Expression von löslichem Protein

Konstrukt	Aminosäuren	Wahrscheinlichkeit löslichen Proteins	CV-CV'-Wert
gTub_His ₆	482	0,472	0,13
TrxA_TEV_gTub_His ₆	615	0,506	0,00
GST_TEV_gTub_His ₆	733	0,461	0,17
MBP_TEV_gTub_His ₆	874	0,428	0,30
DsbA_TEV_gTub_His ₆	714	0,470	0,13
lIDsbA_TEV_gTub_His ₆	697	0,482	0,09
DsbC_TEV_gTub_His ₆	742	0,448	0,22
lIDsbC_TEV_gTub_His ₆	724	0,457	0,18

scheinlichkeitsvorhersagen im Vergleich zu dem N-terminal nativen γ -Tubulin für die Expression an gelöstem Protein. Der Einfluss der durch Tag vermittelten nachgeschalteten Proteinmodifikationen (wie TrxA, etc.) wurde bei dieser Kalkulation nicht berücksichtigt.

zur Klonierung wurde die am 3'-Ende um eine Hexahistidin-CDS erweiterte γ -Tubulin-CDS mit den Oligonukleotiden gTub_fw_NcoI_ecoli und gTub_rev_His₆_ecoli amplifiziert und in den pJET1.2/blunt Vektor subkloniert. Die Substitution der vorherig verwendeten NdeI- durch eine NcoI-Schnittstellensequenz führte zu einer Nukleotidsubstitution, die bei der Expression die zweite Aminosäure Prolin durch Alanin ersetzt (Abbildung 3.28.A). Ziel war stets eine möglichst native γ -Tubulin-CDS Sequenz zu klonieren, doch der strukturelle Einfluss dieser Mutation wurde als vernachlässigbar erachtet. Durch Sanger-Sequenzierung wurde das Subklonierungs-Konstrukt auf weitere Mutationen überprüft. Das Integrat eines mutationsfreien Klons wurde durch einen NcoI/SalI Verdau extrahiert und erneut via NcoI/XhoI in die pETMM-Vektoren integriert (Abbildung 3.28.B).

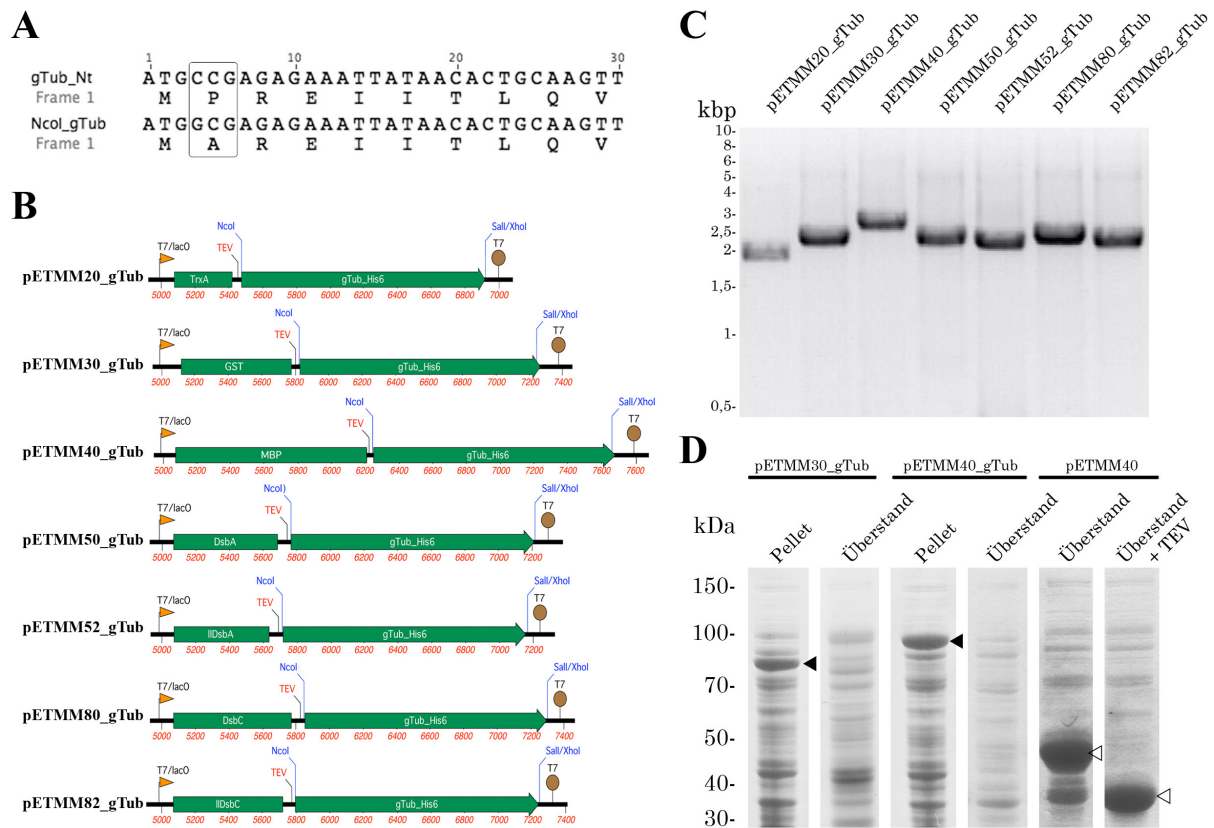


Abbildung 3.28: Klonierung und Expression getaggtter γ -Tubulin-CDS in *E. coli*

A Vergleichende Darstellung der klonierungsbedingten Nukleotidsubstitution und der daraus resultierenden Aminosäuresubstitution am N-Terminus für die γ -Tubulin-CDS aus *N. tabacum* und der via NcoI in die pETMM-Vektoren eingebrachten γ -Tubulin-CDS.

B Übersicht der verschiedenen pETMM- γ -Tubulin-Expressionskonstrukte.

C Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Ansätze mit den verschiedenen pETMM-Expressionskonstrukten in einem 1,0 Vol.-% Agarose-Gel. Zur Amplifikation wurden die Oligonukleotide T7_fwd und gTub_rev_His6_ecoli verwendet. Die zu erwartenden Amplifikatgrößen lagen bei 1942, 2295, 2721, 2247, 2187, 2322 und 2268 bp.

D Ergebnis der SDS-PAGE nativer Proteinisolate transgener *E. coli*. Die mit den Expressionskonstrukten pETMM30_gTub, pETMM40_gTub und pETMM40 transformierten BL21(DE3) wurden für 3 Stunden mit 1,0 mM IPTG induziert. Die MBP_TEV_51AS haltige BL21(DE3) pETMM40-Probe wurde zum Einen unbehandelt und zum Anderen zuvor mit der TEV-Protease für 3 Stunden bei 4°C inkubiert auf des Gel aufgetragen und aufgetrennt. Zur SDS-PAGE wurden je 10,0 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Das SDS-PAGE-Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Das zu erwartende Molekulargewicht des rekombinanten, modifizierten GST_TEV_gTub_His6 ($\blacktriangleleft$, Spur 1) lag bei 83,20 und GST_TEV_gTub_His6 ($\blacktriangleleft$, Spur 3) bei 97,29 kDa. Die unbehandelte pETMM40-Probe ($\triangleleft$, Spur 5) sollte ein Signal bei 48,25 und die mit der TEV-Protease behandelte Probe ($\triangleleft$, Spur 6) ein Signal bei 42,77 kDa zeigen.

Jedes pETMM-Expressionskonstrukt wurde dann via PCR hinsichtlich einer korrekten γ -Tubulin-CDS Integration überprüft (Abbildung 3.28.C) und γ -Tubulin-haltige Konstrukte in BL21(DE3)-Zellen eingebracht. BL21(DE3) Tranformanten wurden via PCR verifiziert, transgene BL21(DE3) kultiviert und die Expression mittels IPTG induziert.

In keinem Überstand nativer Proteinisolate der induzierten Proben konnte ein Signal was dem γ -Tubulin zuzuordnen gewesen wäre, ob N-terminal modifiziert oder nicht, dokumentiert werden. Ein dem γ -Tubulin entsprechenden Signal konnte stets nur im Pellet protokolliert werden. Für das Konstrukt GST_TEV_gTub und MBP_TEV_gTub sind die Ergebnisse in Abbildung 3.28.D exemplarisch gezeigt. Der Versuch der Expression einer MBP-Sequenz (pETMM40-Vektor) lieferte ein deutliches Signal im Überstand eines nativen Proteinisolats. Die MBP-Sequenz kodierte für ein Polypeptid bestehend aus MBP, TEV-Sequenz und einer unspezifischen, 51 Aminosäuren langen Peptidsequenz. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Polypeptid in Lösung vorliegt und von einer TEV-Protease prozessiert werden konnte. Die Expression und Prozessierung des löslichen Polypeptids kann als Beweis für die Funktionalität des pETMM-Systems gewertet werden. Dennoch konnte γ -Tubulin nicht in gelöster, nativer Form mit dem pET-Expressionssystem exprimiert werden.

3.2.1.3 γ -Tubulin Standard zur Quantifizierung

Das, vermutlich als IBs, aggregierte γ -Tubulin sollte unter denaturierenden Bedingungen zum Zwecke quantitativer Studien purifiziert werden. Hierzu wurden BL21(DE3) Zellen die das Expressionskonstrukt pET-44a(+)_gTub trugen induziert und die Proteine unter nativen Bedingungen isoliert. Im Anschluss wurde das γ -Tubulin-haltige Pellet unter denaturierenden Bedingungen aufgearbeitet und mittels einer IMAC purifiziert. Der Puffer des γ -Tubulin-haltigen IMAC-Eluats wurde mittels Ultrafiltration ausgetauscht und die konzentrierte Probe durch eine Gelfiltration abschließend gereinigt.

Die Expression erfolgte nach einem Standardprotokoll, wonach die transformierten BL21(DE3) für 3 Stunden mit 1mM IPTG induziert wurden (Abbildung 3.29.A). Zur IMAC-Purifikation wurde das Pellet des nativen *E. coli* Aufschlusses in Denaturierungspuffer gewaschen, bei 95 °C aufgeköcht und 24 Stunden bei 4 °C mit dem Säulenmaterial inkubiert. Als das effizienteste IMAC-Protokoll wurde das nachfolgend beschriebene eruiert. Zur Elution wurde die Matrix mit 5 Säulenvolumina eines Elutionspuffers mit 50,0 mM Imidazol gewaschen, bevor die Elution spezifischer gebundener Proteine mit einem Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol erfolgte. Das Eluat wurde mittels SDS-PAGE hinsichtlich der Reingungsleistung überprüft (Abbildung 3.29.B). Durch eine Gelfiltration sollte eine höhere Reinheit erzielt werden. Durch eine Ultrafiltration wurde zugleich das Eluatvolumen reduziert und der Puffer gewechselt. Die Gelfiltration der konzentrierten Probe mittels einer 16/60 Superdex 200 Säule ergab das in Abbildung 3.29.C gezeigte Profil. Die Überprüfung der einzelnen Eluate ergab dass γ -Tubulin in den Fraktionen 42 – 62 enthalten war. Zur weiteren Verwendung wurden nur die Eluate 48 – 54 vereinigt und ultrazentrifugiert, da hier der γ -Tubulin Anteil jeweils am höchsten war.

Mittels einer SDS-PAGE und eines immunochemischen Nachweises konnte gezeigt werden, dass γ -Tubulin exprimiert und mit einem hohen Reinheitsgrad purifiziert werden konnte (Abbildung 3.29.D). Durch die Integration der Signalfächen durch die Software ImageJ konnte der γ -Tubulin Anteil in dem gepoolten Eluat der Gelfiltration mit $82,1 \pm 3,6 \%$ beziffert werden.

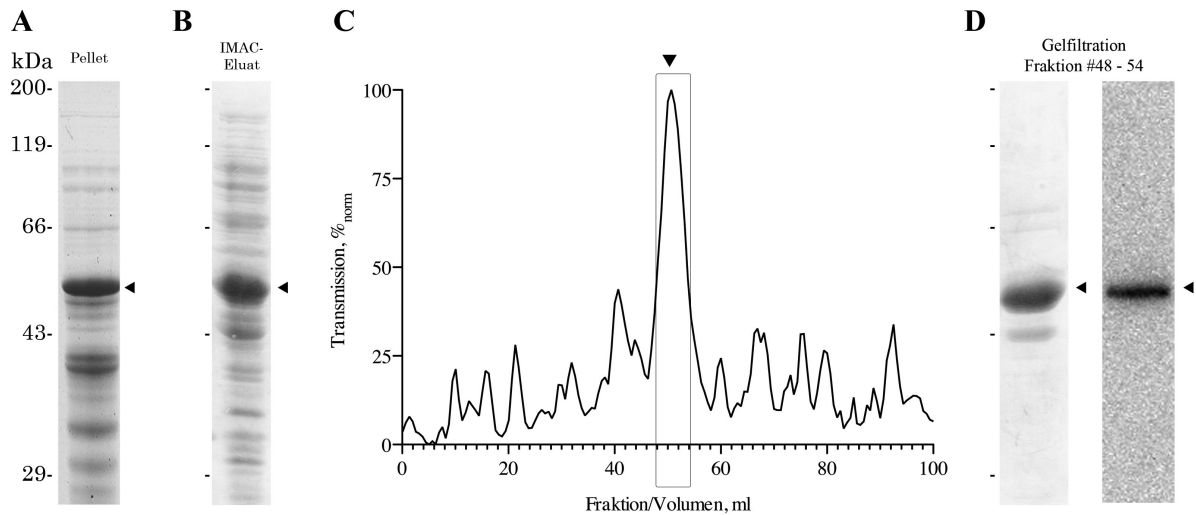


Abbildung 3.29: **Purifikation von rekombinantem γ -Tubulin aus *E. coli***

SDS-PAGE-Gele wurden mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Zum immunochemischen Nachweis wurde der Antikörper Anti- γ -Tubulin AK 746 (Covalab) verwendet und eine Signalintegrationszeit von 8 Minuten gewählt. Zur SDS-PAGE wurden jeweils 10,0 μ g und zum immunochemischen Nachweis nur 0,01 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Das zu erwartende Molekulargewicht des rekombinanten γ -Tubulin lag bei 54,29 kDa.

A Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung des denaturierten Pellets eines nativen Proteinisolats transformierter und induzierter BL21(DE3).

B Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung des 250 mM Imidazol haltigen IMAC Eluats.

C Profil der Gelfiltration des IMAC-Eluats ohne Vor-/Nachlauf mit einer 16/60 Superdex 200 pg Säule. Auf der Ordinate ist die gemessene, normierte Transmission aufgetragen, auf der Abszisse das eluierte Volumen. Das Fraktionsvolumen betrug in 1 ml und die abgeleitete Spannung am Schreiber betrug 10 mV. Die einzelnen Fraktionen sind als Teilstriche auf der Abszisse gekennzeichnet. Der relevante Fraktionsbereich ist durch einen Kasten unterlegt.

D Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung (links) und immunochemischen Nachweises (rechts) der gepoolten und aufkonzentrierten Fraktionen 48 – 54. Das zu erwartende Molekulargewicht des rekombinanten γ -Tubulin lag bei 54,29 kDa.

Das unter denaturierenden Bedingungen purifizierte γ -Tubulin konnte weder zur Strukturbestimmung noch zur Interaktionspartner-Analyse verwendet werden. Jedoch konnte es als Standard für ELISA-Studien verwendet werden.

3.2.2 Hefe pKLAC-Expressionssystem

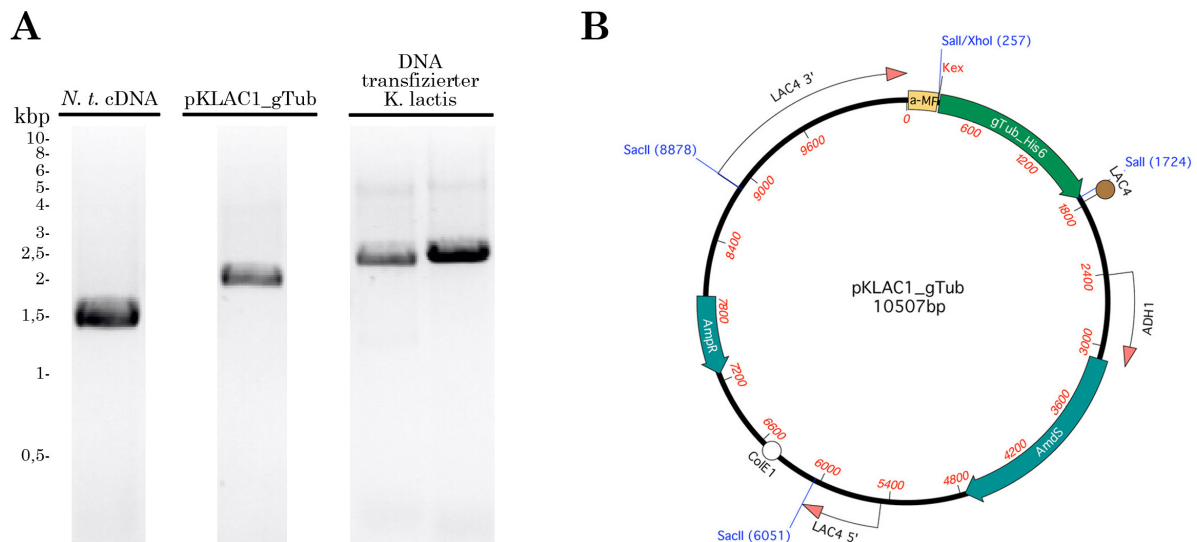
Bei dem Versuch der Expression von gelöstem γ -Tubulin sollte aufgrund von bereits umfangreich dokumentierter Proteinexpressionen ein *K. lactis* LAC4-Expressionssystem [51, 54, 55, 57] verwendet werden. Das verwendete *K. lactis*-System stammte von New England Biolabs und bot die Möglichkeit einer segregativen Expression von Proteinen mit nativem und nicht-nativem N-Terminus unter Kontrolle eines LAC4-Promoters [56]. Durch die segregative Expression sollte zum Einen der im Vergleich zu *E. coli* deutlich aufwendigere Zellaufschluss und zum Anderen die Problematik der limitierten, intrazellulären Proteinlöslichkeit umgangen werden. Dieses eukaryotische Expressionssystem verfügte auch über eine umfangreichere Chaperonausstattung und bot den Vorteil einer beliebigen Skalierbarkeit was für die Ausbeute eine wichtige Rolle spielt.

3.2.2.1 Segregative γ -Tubulin-Volllängen-Expression

Die segregative γ -Tubulin-Volllängen-Expression mit C-terminalem His₆-Tag sollte mit einem nativen N-Terminus erfolgen. Hierzu wurde die γ -Tubulin-CDS aus *N. tabacum* via der Schnittstellen XhoI und SalI in den pKLAC1-Vektor integriert. Die Integration an dieser Position führte zu einer N-terminalen Erweiterung der CDS, die bei der Translation für einen, durch die endogene Kex-Protease, abspaltbaren α -Matingfaktor codiert.

Amplifikation und Klonierung Ausgehend von einer *N. tabacum* cDNA wurde durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden gTub_fwd_SalI_yeast und gTub_rev_SalI_yeast (Abbildung 3.30.A) die γ -Tubulin-CDS neben einer CDS für eine Kex-Proteaseerkennungsstelle am 5'- noch um eine His₆-CDS am 3' Ende erweitert. Die Integration der modifizierten γ -Tubulin-CDS in den pKLAC1-Vektor erfolgte über die der Vektor endogenen Schnittstellen XhoI und SalI. Die Integration der γ -Tubulin-CDS wurde durch eine PCR verifiziert (Abbildung 3.30.A). Durch eine Sequenzierung wurden etwaige Nukleotidsubstitutionen, die zu einer Veränderung der Primärstruktur führen könnten, ausgeschlossen. Durch die Integration mittels der genannten Vektorschnittstellen wurde die modifizierte γ -Tubulin-CDS um eine α -MF CDS am 5' Ende erweitert (Abbildung 3.30.B).

Mittels des SacII-Restriktionsexzyms wurde der Vektor geschnitten, das Vektorrückgrad von der Expressionskassette gelelektrophoretisch getrennt und die Expressionskassette purifiziert. Kompetente *K. lactis*-Zellen wurden mit der Expressionskassette transfiziert und auf einem Acetamid-Selektionsmedium kultiviert. Die DNA der auf dem Selektionsmedium gewachsenen *K. lactis*-Zellen wurde isoliert und mit einer PCR hinsichtlich einer erfolgreichen Integration der Expressionskassette überprüft.



A Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte mit einer *N. tabacum* cDNA als Template und den γ -Tubulin spezifischen Oligonukleotiden gTub_fwd_SalI_yeast und gTub_rev_SalI_yeast (Sollgröße: 1473 bp), dem pKLAC1_gTub Hefeexpressionskonstrukt als Template mit den Oligonukleotiden LAC4mt_fwd und pKLAC1_rev (Sollgröße: 1968 bp) und einer genomischen DNA transfizierter *K. lactis*-Zellen mit den Oligonukleotiden Integration_1 und Integration_2 (Sollgröße: 2,3 kbp) sowie Integration_3 und Integration_2 (Sollgröße: 2,4 kbp). Die jeweiligen Kontrollansätze zeigten keine Signale vergleichbarer Größe.

B Schematische Darstellung des pKLAC1_ γ -Tubulin Konstrukts unter Kontrolle eines LAC4-Promotors und Terminators. Weiter sind der bakterielle Selektionsfaktor Amp^R und eukaryotische Selektionsfaktor Amd^S, der bakterielle Replikationsursprung ColE1, die Position der relevanten Restriktionsendonukleaseschnittstellen, die Kex-Proteaseerkennungsstelle sowie der α -Matingfaktor (α -MF) gezeigt.

Eine Sequenzierung bestätigte die korrekte Integration einer modifizierten γ -Tubulin-CDS, die über keine Nukleotidsubstitutionen verfügte die bei der Translation zu einer Aminosäuremutation geführt hätten.

Expression Da die γ -Tubulin-CDS bei diesem System unter der Kontrolle eines konstitutiven LAC4-Promotors stand, war eine Induktion nicht notwendig. Zur Kontrolle des Expressionssystems wurden kompetente *K. lactis* mit der Expressionskassette des pKLAC1-*malE* transfiziert und transgene Zellen zur Expression kultiviert. Das Ergebnis der vergleichenden immunochemischen Untersuchung denaturierter Proben ist in Abbildung 3.31 gegeben.

Im YPD-Medium der mit der Expressionskassette des pKLAC1- γ Tub transfizierten *K. lactis*, war bei der SDS-PAGE kein Signal dokumentierbar. Im YPD-Medium des mit pKLAC1-*malE* transfizierten *K. lactis* konnte nur ein Signal dokumentiert werden, das aufgrund seiner Laufweite dem MBP zugeordnet werden konnte (Abbildung 3.31.A). Beim Vergleich der transfizierten und nicht transfizierten *K. lactis* ergaben sich keine dokumentierbaren Unterschiede im Bandenmuster, die auf eine Expression von γ -Tubulin hingedeutet hätten. Beim immunochemischen Nachweis zeigte die BY-2-Probe ein Signal das nativem γ -Tubulin entsprach. Bei den Proben der transfizierten

als auch nicht transfizierten *K. lactis* konnte kein Signal bestimmt werden, das dem mit α -MF getaggttem oder dem ungetaggttem γ -Tubulin entsprach. In beiden Proben konnte nur ein Signal dokumentiert werden, welches ein geringeres Molekulargewicht zeigte als das native γ -Tubulin aus BY-2. Ein dem rekombinanten γ -Tubulin zugeordnetes Signal, sowohl für die SDS-PAGE, als auch für die immunochemische ECL-Reaktion, konnte in keiner Probe nachgewiesen werden, obwohl molekulargenetische Befunde auf ein Vorhandensein der Expressionskassette hindeuteten.

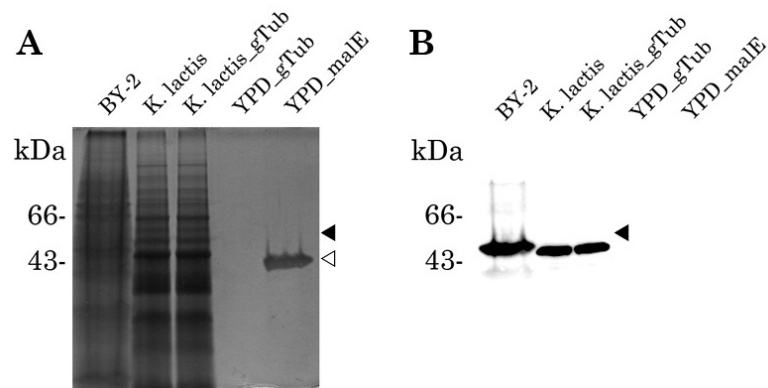


Abbildung 3.31: Segregative Expression von γ -Tubulin in *K. lactis*

Das SDS-PAGE-Gel (A) wurden mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Zum immunochemischen Nachweis (B) wurde der Antikörper Anti- γ -Tubulin AK 746 (Covalab) verwendet. Zur SDS-PAGE und zum immunochemischen Nachweis wurden 10,0 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Das zu erwartende Molekulargewicht des rekombinanten, modifizierten und segregierten γ -Tubulins ($\blacktriangleleft$) lag bei 54,29 kDa, dass des nativen γ -Tubulins aus BY-2 als Positivkontrolle bei 53,24 kDa. Das zu erwartende Molekulargewicht für das MBP ($\triangleleft$) lag bei 40,64 kDa.

A Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung eines denaturierten Gesamtproteinisolats einer nativen BY-2 Zellkultur als positiv Kontrolle, nicht transfizierter *K. lactis*, mit der Expressionskassette transfizierter *K. lactis* und des mit TCA präzipitierten YPD-Mediums jener transgenen *K. lactis*. Ebenfalls wurde des YPD-Medium mit einer *malE*-Expressionskassette transfizierten *K. lactis* aufgetragen, die MBP exprimieren und in jenes segregieren.

B Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung und des immunochemischen Nachweises der o. g. Proben.

3.2.3 Pflanzliche Binäre Vektor Systeme

Da eine Expression von gelöstem γ -Tubulin bisher nicht möglich war, sollte eine Expression in höheren Organismen versucht werden. Basierend auf den vorherigen Erfahrungen sollten Expressionssysteme mit einer ausreichenden Chaperonausstattung und einer hohen phylogenetischen Nähe zu *N. tabacum* gewählt werden. Aufgrund der zu erwartenden unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationsmuster bei Expressionssystemen aus der Gruppe der Bilateria wurden nur pflanzliche Expressionssysteme weiter verwendet. Aufgrund der hohen Sequenzidentität bzw. -ähnlichkeit zwischen den dikotylen Modellorganismen *A. thaliana*, *N. benthamiana* und *N. tabacum* [8], sollten zur diese zur homologen Expression verwendet werden. Faktoren wie die Kozak-Sequenz, Exon-Intron-Strukturen, die Wahl des Vektor-/Promotorsystems, Transfektionstechnik sowie Posttranskriptional Gene Silencing wurden zuvor analysiert, deren zu erwartende Effekte gewichtet und dann ggf. angepasst. Ein Teil der nachfolgenden Ergebnisse ist bereits in der Diplomarbeit von Frau Alexandra Fischer [212] gezeigt.

3.2.3.1 Exon-Intron-Struktur des TUBG1-Gens

Die Verwendung höherer Organismen bot auch die Möglichkeit, statt wie bisher nur die γ -Tubulin-CDS, alternativ die genomische DNA-Sequenz zu Expressionsversuchen einzusetzen. Die enthaltenen Introns können Einfluss auf die Expressionsraten nehmen, daher galt es die genomische γ -Tubulin DNA-Sequenz von *N. tabacum* mit der von *A. thaliana* hinsichtlich möglicher Unterschiede zu vergleichen und dann deren Einsatz abzuwägen.

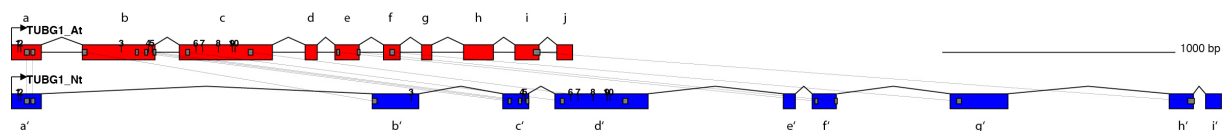


Abbildung 3.32: Darstellung der γ -Tubulin Exon-Intron Struktur

Exons ($\square$, rot bzw. blau) sind mit lateinischen Buchstaben benannt und zum Teil durch identische, 12 bis 30 bp lange Sequenzbereiche – sogenannte Ankerpunkte ($\square$, grau) – verbunden. Introns ($\wedge$) sind nicht näher gekennzeichnet. Die Position der Nukleotidtriplets die für Aminosäuren der GTP-Bindestelle kodieren sind durch arabische Ziffern gekennzeichnet. Die genomischen Tabak-Sequenz TUBG1_Nt stammt aus Ostertag [8] und Wolf [213]. Die TUBG1_At Sequenz wurde von NCBI/TAIR bezogen (Ref.: NM_116030).

Es zeigte sich, dass die Exon-Intron-Struktur der γ -Tubulin DNA-Sequenz aus *N. tabacum* gegenüber der von *A. thaliana* weitgehende Unterschiede aufwies. So waren die TUBG1-Introns in *N. tabacum* allgemeinen nicht nur auffallend größer, so verfügte die TUBG1-Sequenz von *N. tabacum* im Vergleich zu *A. thaliana* im Bereich der Exons f – h über zwei Introns weniger und im Bereich des Exons b' – c' über ein zusätzliches Intron (Abbildung 3.32). Die TUBG1-Exon-Intron-Struktur von *A. thaliana* entsprach einem üblichen Aufbau bzgl. Anzahl und Größe der Introns [214, 215]. Die TUBG1-Struktur von *N. tabacum* wich jedoch erheblich von diesem ab.

Aufgrund dieser Unterschiede und der gegenwärtig noch unklaren Effekte der Exon-Intron-Strukturen [216] wurde auf die Verwendung der genomischen γ -Tubulin Vollängensequenz verzichtet und die CDS für weitere Experimente verwendet.

3.2.3.2 Ermittlung einer optimalen Kozak-Sequenz

Im Gegensatz zu den prokaryotischen sowie den Hefe-Expressionssystemen, musste bei der Planung der pflanzlichen Expressionskonstrukte einige Anforderungen an die Sequenz berücksichtigt werden. So sollte die um den Translationsstart gelegene Kozak-Sequenz berücksichtigt werden. Vergleiche zwischen *A. thaliana*, *O. sativa* und *H. sapiens* sowie *M. musculus* zeigten, dass die Kozak-Sequenz in beiden Reichen differenziert auftritt [217]. Aufgrund vorhandener Divergenzen der verfügbaren Datensätze und zu geringem Datenumfang [218–221], sollte der Datensatz für dikotyle Pflanzen von *Joshi et al.* [222] erweitert, auf Nukleotid-Häufigkeiten in Abhängigkeit zur Position analysiert und als Sequence-Logo dargestellt werden (Abbildung 3.33). Im Bereich von -3 bis -1 zeigte sich ein verstärkt auftreten von Adenosin, an Position +4 ist Guanosen dominant.

Informationen zum TRBO System [223, 224] waren inkongruent bzgl. des nicht translatierten 5'-Bereichs. Es wurde sowohl eine AAAAUG- als auch eine AACAUG-Sequenz verwendet. Für diese Sequenzvariationen konnten bisher keine Unterschiede in der Expressionsrate dokumentiert werden (John Lindbo, schriftliche Mitteilung). Auf dieser Datengrundlage wurde AAAAUGG als optimale Kozak-Sequenz festgelegt. Diese Kozak-Sequenz wird auch getragen durch Studien zur Proteinaktivität [225].

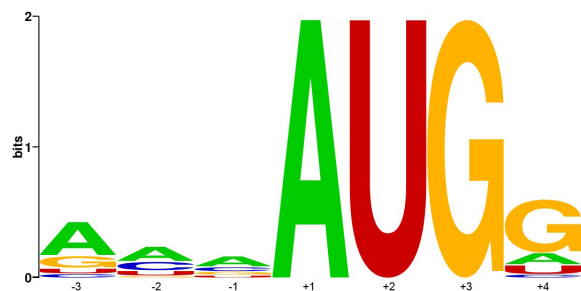


Abbildung 3.33: **Sequence-Logo der Kozak-Sequenz für dikotyle Pflanzen**

Ausgehend vom Startcodon erfolgte die Nummerierung der Nukleotide analog der gängigen Konvention. Die Abszisse ist logarithmisch in bit skaliert.

3.2.3.3 Klonierung eines konstitutiven γ -Tubulin-Expressionskonstrukts

Für erste Machbarkeitsstudien zur Expression von γ -Tubulin in pflanzlichen Systemen wurde ein pPZPnpt_ γ -Tubulin und für Kontrollexperimente ein pPZPnpt_GFP Konstrukt erstellt. Beide CDS standen unter der Kontrolle eines konstitutiven d35S-Promotors. Ausgehend von einer *N. tabacum* cDNA wurde eine modifizierte γ -Tubulin-CDS mit den Oligonukleotiden gTub_fwd_NcoI_ecoli und gTub_rev_PacI/SpeI amplifiziert. Der vorwärtsgerichtete Primer

erweiterte die γ -Tubulin-CDS, analog zu den *E. coli*-Konstrukten, am 5'-Ende um eine NcoI-Schnittstelle und der reverse Primer modifizierte die γ -Tubulin-Sequenz am 3'-Ende um eine His₆-CDS samt Stop-Codon sowie SpeI-Schnittstelle. Das Amplifikat wurde zur Steigerung der Klonierungseffizienz in den pJET1.2/blunt-Vektor subkloniert. Bevor die γ -Tubulin-CDS in den pPZPnpt-Vektor eingebracht werden konnte musste die CDS noch um eine d35S-Promotor-Sequenz erweitert werden, da der Expressionsvektor über keine die MCS flankierenden Promotor/Terminator verfügte. Hierzu wurde die modifizierte γ -Tubulin-CDS aus dem pJET1.2/blunt_gTub Konstrukt mittels NcoI und SpeI ausgeschnitten und die CDS in den pCATgfp-Vektor eingebracht. Zuvor wurde die Vektor endogene GFP-CDS durch Restriktion entfernt. Die Genkassette d35S:: γ -Tubulin_His₆::35S-pA wurde mittels SbfI aus dem pCAT_gTub-Vektor ausgeschnitten und in die MCS des pPZPnpt-Vektors eingebracht. Für spätere Kontrollexperimente wurde die Genkassette des pCATgfp-Vektors (d35S::GFP::35S-pA) ebenfalls mit SbfI ausgeschnitten und in einen pPZPnpt-Vektor eingebracht. Die Überprüfung der Integration erfolgte mittels einer PCR. Die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte sind in Abbildung 3.34 gezeigt.

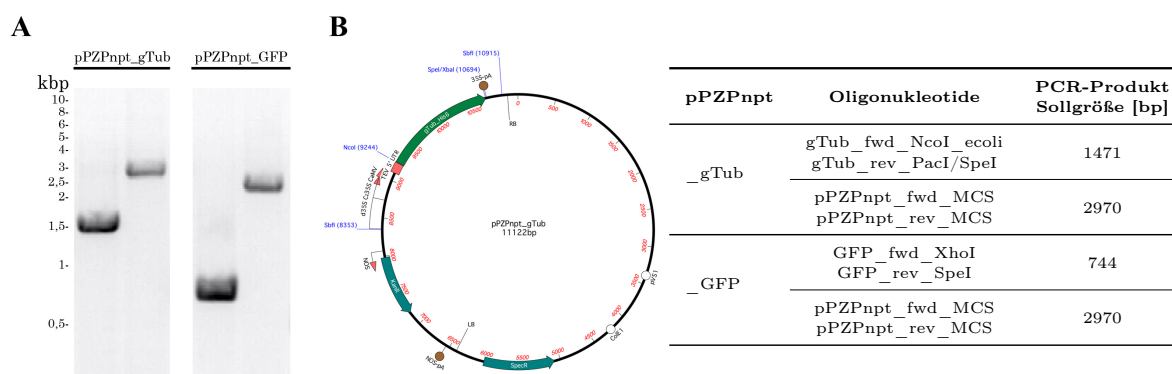


Abbildung 3.34: **Klonierung konstitutiver Expressionskonstrukte**

A Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte mit dem pPZPnpt_gTub und pPZPnpt_GFP-Vektor Vektor als Template.

B Schematische Darstellung des pPZPnpt_gTub Vektors mit eingefügter γ -Tubulin-CDS unter Kontrolle eines konstitutiven d35S Promotors und 35S Terminators. Weiter sind der Selektionsfaktor Kan^R sowie Spc^R, der Replikationsursprung ColE1 und pVS1 sowie die Position der relevanten Restriktionsendonukleaseschnittstellen gezeigt.

Die in Abbildung 3.34.A dokumentierbaren Signale ließen auf eine erfolgreiche Integration je einer γ -Tubulin- bzw. GFP-CDS bzw. Genkassette in die pPZPnpt-MCS schließen. Sequenzierungsreaktionen zeigten, dass keine Mutationen in den jeweiligen CDS enthalten waren.

3.2.3.4 Klonierung 17 β -Estradiol induzierbarer Expressionskonstrukte

Für spätere Vergleichsstudien wurde die γ -Tubulin Vollängen-CDS sowie eine γ -Tubulin Teilsequenz in die MCS des induzierbaren pMDC7-Expressionsvektors kloniert. Die Länge der Teil-längensequenz wurde auf Grundlage der bioinformatischen Ergebnisse mit 277 Aminosäuren bestimmt (Abbildung 3.23) und durch Deletion des γ -A/B-Peptid-Bereichs erstellt.

Ausgehend von einer *N. tabacum* cDNA sowie dem GST_TEV_gTub-Konstrukt wurden modifizierte γ -Tubulin-CDS amplifiziert und direkt in MCS je eines pMDC7-Vektors kloniert. Für potentielle Kontrollexperimente wurde zusätzlich eine GFP-CDS in eine pMDC7-MCS integriert.

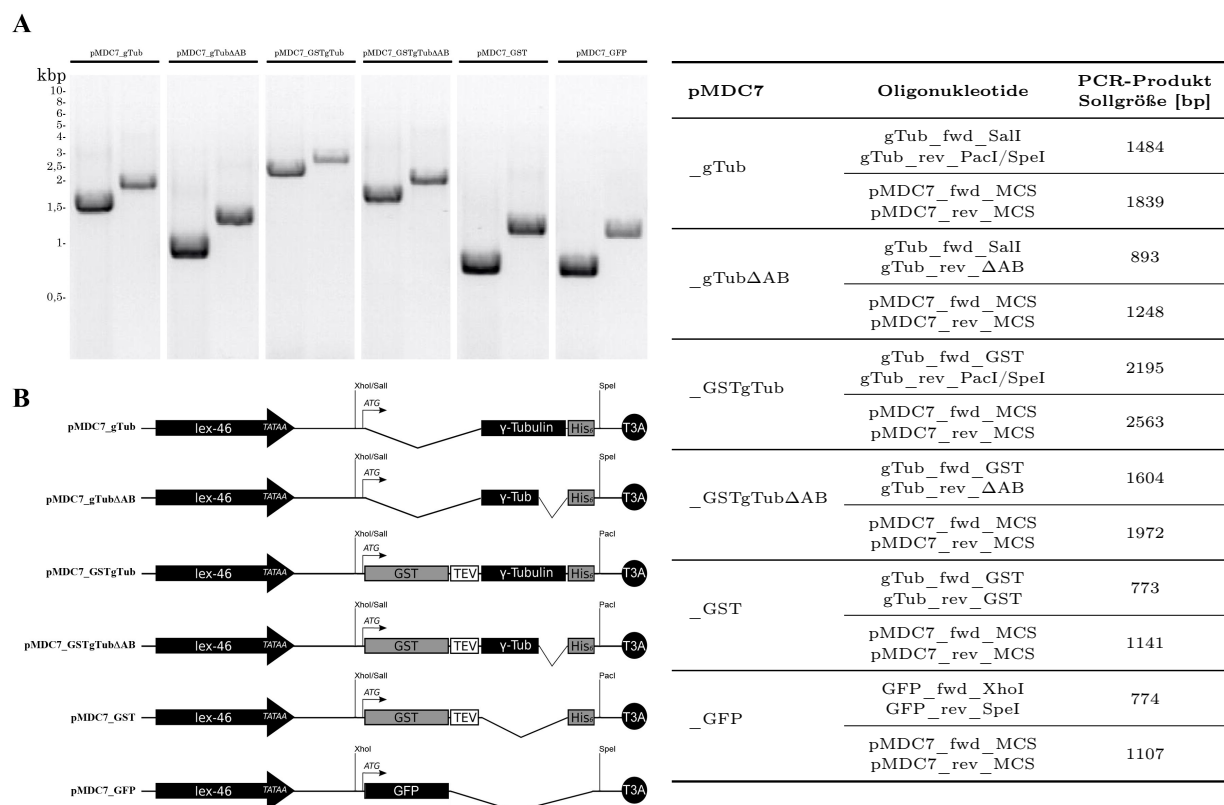


Abbildung 3.35: Klonierung verschiedener 17 β -Estradiol induzierbarer Expressionskonstrukte

A Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte Gen- und MCS-spezifischer Oligonukleotide. Die zu erwartenden Sollgrößen der PCR-Produkte sind nebenstehender Tabelle zu entnehmen.

B Schematische Darstellung des MCS-Bereichs der pMDC7-Expressionskonstrukte mit den integrierten CDS unter Kontrolle eines lex-46 Promotors und T3A Terminators. Weiter sind die Position der relevanten Restriktionsendonukleaseschnittstellen, sowie der Translationsstartpunkt (*) gezeigt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die CDS-Elemente in der MCS ausgerichtet und Aussparungen (V) zwischen diesen gekennzeichnet.

Die dokumentierbaren Signale ließen auf eine erfolgreiche Integration je einer CDS in die pMDC7-MCS schließen (Abbildung 3.35). Sequenzierungsreaktionen der PCR-Produkte ergaben, dass nur zielgerichtete Nukleotidmodifikationen in den jeweiligen CDS vorlagen.

3.2.3.5 *In planta* Transfektion und Expression

Bei der Transfektion von *A. thaliana* nach *Clough* und *Bent* mit konstitutiven und induzierbaren γ -Tubulin-Expressionskonstrukten konnte kein transgener Keimling identifiziert werden. Es wurden sowohl verschiedene *A. tumefaciens*-Stämme, als auch die *A. thaliana*-Ecotypes *columbia* und *enkeim* zur Transfektion verwendet. Die Experimente wurden dreimal mit einem Probenumfang von weit mehr als 2000 Pflanzen wiederholt.

Zur Kontrolle wurden 40 *A. thaliana columbia* Pflanzen mit einem pMDC7_GFP-Konstrukt tragenden GV3101(pMP90)-Stamm transfiziert. Hieraus konnten 4 transgene Keimlinge identifiziert und bis in die F2-Generation vermehrt werden. Die GFP-Expression eines solchen Klons ist in Abbildung 3.37 gezeigt.

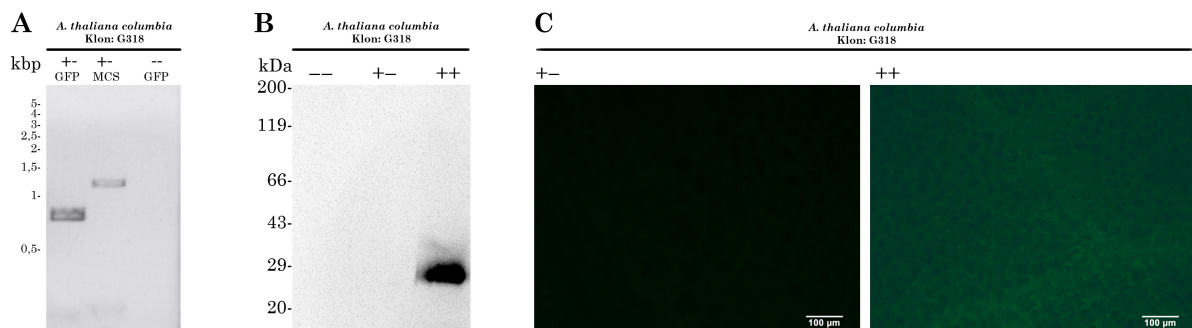


Abbildung 3.36: *In planta* GFP-Expression in *A. thaliana*

Untersucht wurden sowohl native, nicht genetisch modifizierte (--), als auch mit dem pMDC7_GFP-Konstrukt durch GV3101(pMP90) transfizierte (+-) sowie für 96 Stunden mit 17β -Estradiol induzierte (++) *A. thaliana columbia* Pflanzen.

A Ergebnis der gelelektrophoretischen Trennung der PCR-Produkte mit der DNA transfizierter und auf Hyg^R-Selektionsmedium angewachsener *A. thaliana columbia* als Template. Es wurden die Oligonukleotide GFP_fwd_XhoI und GFP_rev_SpeI (Sollgröße: 744 bp) sowie pMDC7_fwd_MCS und pMDC7_rev_MCS (Sollgröße: 1107 bp) verwendet.

B Zum immunochemischen Nachweis wurde der Antikörper Anti-GFP verwendet. Es wurden 10,0 μ g Gesamtprotein aufgetragen und aufgetrennt. Das zu erwartende Molekulargewicht des rekombinanten GFP lag bei 26,77 kDa.

C Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Blattunterseite transgener *A. thaliana columbia*.

Aufgrund der dokumentierbaren Signale der PCR-Produkte war die Annahme einer erfolgreichen Transfektion gerechtfertigt (Abbildung 3.37.A). Das Signal des immunochemischen GFP-Nachweises und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine erfolgreiche GFP-Expression (Abbildung 3.37.B und C). Die Floral-Dip Methode wurde korrekt angewandt und führte zu stabilen Klonen mit einer – mittels immunochemischer Methoden – nicht nachweisbaren GFP-Basalexpression.

Die Transfektion von BY-2 nach *Eichler* [226] mit induzierbaren γ -Tubulin-Expressionskonstrukten war ebenfalls nicht erfolgreich.

3.2.3.6 Agroinfiltration und transiente Expression

Zur Proteinexpression wurde eine randomisierte Auswahl junger wie älterer Blätter zur Agroinfiltration sowie konstitutive, als auch induzierbare Expressionskonstrukte verwendet.

Induzierbare Expression in *N. benthamiana* Erst 4 bis 5 Tage nach der Agroinfiltration zeigten die Blätter erste lokale nekrotische Veränderungen unabhängig vom verwendeten Konstrukt (Abbildung 3.37.A) oder der 17β -Estradiol-Konzentration. Eine γ -Tubulin-Expression war ab dem ersten Tag nach Zugabe des Induktors dokumentierbar um am vierten Tag nach Induktion im untersuchten Zeitraster maximal (Abbildung 3.37.B).

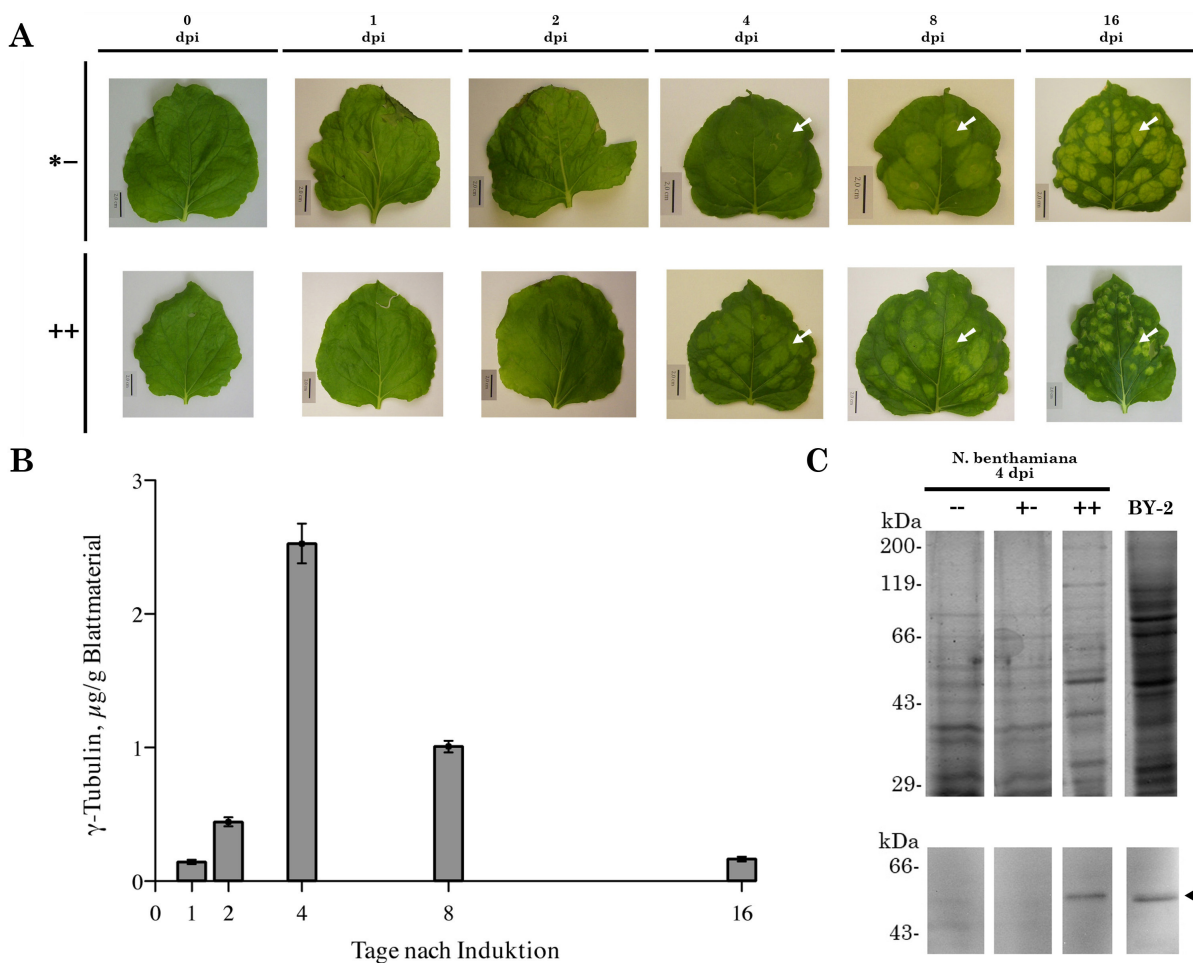


Abbildung 3.37: **Transiente γ -Tubulin-Expression in *N. benthamiana*-Blättern**

Untersucht wurden sowohl nicht infiltrierte (--), mit einem pMDC7-Vektor tranfizierte (*-) als auch mit einem pMDC7_gTub-Konstrukt tranfizierte (++) und für 96 Stunden mit $5,0 \mu\text{M}$ 17β -Estradiol induzierte ($++$) *N. benthamiana* Blätter 6 Wochen alter Pflanzen. Zur Transfektion wurde C58C1-rif(pTiC58) verwendet. **A** Morphologie agroinfiltrierter *N. benthamiana* Blätter. Die Transfektion erfolgte mit einem pMDC7_gTub-Konstrukt und einem einfachen pMDC7-Vektor. Nekrotische Läsionen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B Graphische Darstellung der γ -Tubulin-Konzentration in Abhängigkeit der Induktionszeit mit Mittelwerten und Standardabweichung. Die Bestimmung der γ -Tubulin-Konzentrationen erfolgte via ELISA.

C Zum immunochemischen γ -Tubulin-Nachweis wurde der Antikörper AK 746 verwendet. Das zu erwartende Molekulargewicht des rekombinanten γ -Tubulin lag bei $54,26 \text{ kDa}$ und das des nativen aus BY-2 bei $53,24 \text{ kDa}$.

Zur Gewährleistung einer konstanten 17β -Estradiol-Konzentration erfolgte im 2 Tage Intervall ein vollständiger Wechsel des mit $5,0 \mu\text{M}$ 17β -Estradiol angereicherten Hoagland-Mediums. Der spezifische γ -Tubulin-Nachweis ist in Abbildung 3.37.C gezeigt und hieraus ist auch ersichtlich, dass das dem rekombinanten γ -Tubulin zugeordneten Signal ein geringfügig höheres Molekulargewicht gegenüber dem nativen γ -Tubulin-Signal aus BY-2 aufweist. Diese Verschiebung ist durch die Erweiterung der γ -Tubulin-CDS um eine His₆-CDS zu erklären und lässt die Annahme einer vollständigen γ -Tubulin-Expression gerechtfertigt erscheinen. Auch waren mittels immunochemischer Nachweise keine Basalexpression im untersuchten Zeitraum dokumentierbar. Bei den N-Terminal um einen GST-Tag modifizierten pMDC7_gTub-Konstrukten war keine Expression dokumentierbar.

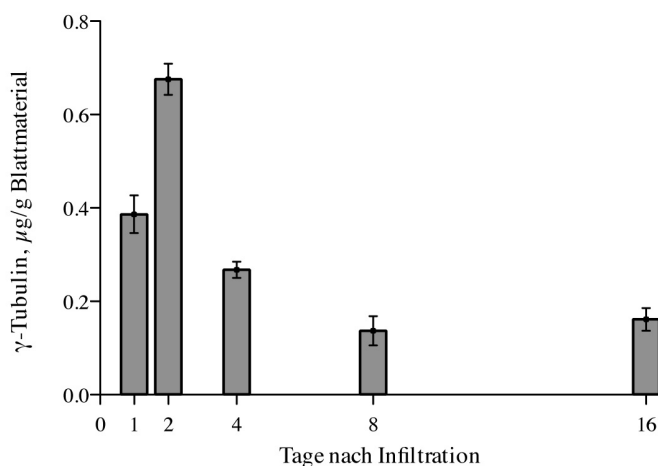


Abbildung 3.38: **Konstitutive γ -Tubulin-Expression in *N. benthamiana*-Blättern**

Graphische Darstellung der γ -Tubulin-Konzentration in Abhängigkeit der Zeit mit Mittelwerten und Standardabweichung. Die Bestimmung der γ -Tubulin-Konzentrationen erfolgte via ELISA. Untersucht wurden mit einem pPZPnpt_gTub-Konstrukt transfizierte *N. benthamiana* Blätter 6 Wochen alter Pflanzen. Zur Transfektion wurde C58C1-rif(pTiC58) verwendet.

Konstitutive γ -Tubulin-Expression

in *N. benthamiana* Die Agrobioinfiltration erfolgte unter vergleichbaren Bedingungen zu dem induzierbaren XVE-System und führte ebenfalls zu nekrotischen Läsionen 4 bis 5 Tage nach Infiltration. Bei dieser Systemkombination waren Signale dokumentierbar, die auf eine γ -Tubulin-Expression schließen ließen. Ein Expressionsmaximum zeichnete sich zwei Tage nach Induktion im untersuchten Zeitraster ab (Abbildung 3.38). Im Vergleich zum XVE-System war die γ -Tubulin-Expressionsrate beim d35S-System um einen Faktor $3,74 \pm 0,17$ niedriger.

Konstitutive und induzierbare Expression in *Arabidopsis thaliana* Die Blätter zeigten bereits 2 Tage nach der Infiltration erste lokale nekrotische Veränderungen, die sich bei fortschreitender Zeit stärker ausprägten. Eine γ -Tubulin-Expression war bei keinem der verwendeten Konstrukte dokumentierbar. Eine GFP-Expression war jedoch mit beiden Vektorsystemen (pPZPnpt_GFP und pMDC7_GFP) erfolgreich.

3.2.3.7 Bestimmung der maximalen γ -Tubulin-Expressionsrate

Zur Strukturbestimmung als auch Interaktionspartneranalyse waren größere Proteinmengen notwendig als die bisher erreichten Expressionsraten. Zur Steigerung der γ -Tubulin-Expressionsrate sollte unter Anderem die Infiltrationstechnik, Inducerkonzentration, verschiedene *A. tumefaciens*-Stämme sowie der Einfluss eines Suppressorproteins näher untersucht werden.

Optimierung der Infiltrationstechnik Neben der bisher erprobten Agroinfiltrationstechnik sollte in Anlehnung an *Gleba et al.* [227] eine Vakuuminfiltrationstechnik erprobt werden. Aus praktischen Gründen wurde zum Vergleich der Techniken das induzierbare pMDC7_GFP-Konstrukt verwendet. Exemplarische Ergebnisse sind in Abbildung 3.39 gezeigt.

Mit der Vakuuminfiltrationstechnik konnten nur vereinzelte fluoreszierende Stellen gefunden werden. Im Mittel fanden sich 29 ± 9 solcher Spots pro Blatt unabhängig vom Blattalter. Auch wenn das Blatt vor der Vakuumbehandlung in 5 mm breite Streifen geschnitten wurde, trug dies nur zu einer unwesentlichen Erhöhung der Transfektionseffizienz und somit der Expressionsrate bei. Dennoch waren die Expressionsraten weit unter denen der Agroinfiltration. Versuche mit einem konstitutiven GFP-Expressionskonstrukt (pPZPnpt_GFP) lieferten niedrigere, aber im Verhältnis vergleichbare Expressionsraten für beide Techniken. Auch eine Variationen der Agroinfiltrationstechnik (wie Blattabnahme nach Infiltration und Inkubation in Feuchtkammer) oder

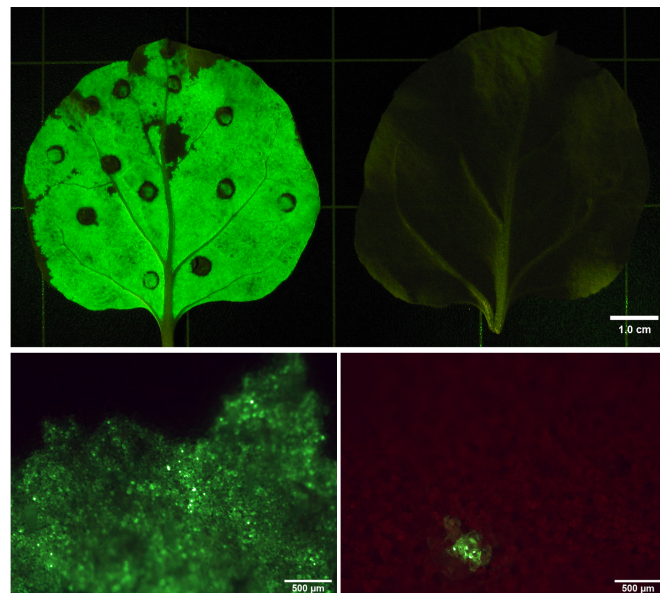


Abbildung 3.39: **Vergleichende Betrachtung der Infiltrationstechnik**

GFP-Fluoreszenz makro/mikroskopische Aufnahmen agro- (links) und vakuuminfiltrierter (rechts) *N. benthamiana* Blätter 6 Wochen alter Pflanzen. Diese wurden mit einem pMDC7_GFP-Konstrukt mit C58C1-rif(pTiC58) transfiziert. Die Induktion erfolgte mit 5,0 μ M 17 β -Estradiol für 96 Stunden.

Variation der Lichtverhältnisse führte zu keiner Steigerung der Expressionsrate. Abschließend lässt sich sagen, dass die bisher verwendete Agroinfiltrationstechnik die höchsten Expressionsraten lieferte.

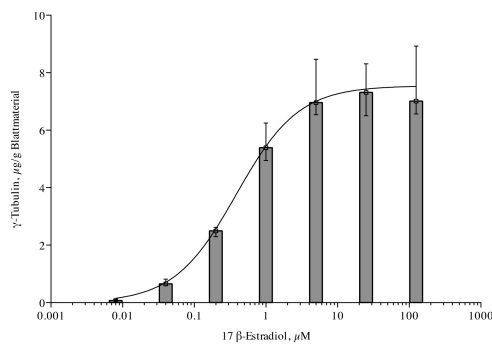


Abbildung 3.40: Einfluss der 17 β -Estradiol-Konzentration auf die γ -Tubulin-Expressionsrate
 Graphische Darstellung der γ -Tubulin-Konzentration in Abhängigkeit von der 17 β -Estradiol-Konzentration mit Median und Fehler. Die Bestimmung der γ -Tubulin-Konzentrationen erfolgte via ELISA. Untersucht wurden mit einem pMDC7_gTub-Konstrukt transfizierte *N. benthamiana* Blätter 6 Wochen alter Pflanzen. Zur Transfektion wurde C58C1-rif(pTiC58) verwendet.

Optimierung der Inducerkonzentration Für das pMDC7-System zur Agroinfiltration in *N. benthamiana* zeigte sich in vorherigen Versuchen, dass nach 96 Stunden Inkubation ein lokales Expressionsmaximum vorlag. Somit wurde jener Wert beibehalten und nur die Inducerkonzentration variiert. Ausgehend von der bisher verwendeten 17 β -Estradiol Konzentration wurde diese jeweils um den Faktor 5 erhöht bzw. reduziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.40 gezeigt. Die γ -Tubulin-Expressionsrate zeigte eine Abhängigkeit zur 17 β -Estradiol-Konzentration und die Ausgleichsfunktion einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Ab einer 17 β -Estradiol-Konzentration von circa 5,0 μM zeichnete sich ein Sättigungsbereich im Kurvenverlauf ab, was den Einsatz höherer 17 β -Estradiol-Konzentrationen zur γ -Tubulin-Expression nicht rechtfertigte. Somit wurde

5,0 μM als einzusetzende 17 β -Estradiol-Konzentration für alle weiteren Versuche gewählt.

Einfluss des *A. tumefaciens*-Stammes und Vektorsystems auf die Expressionsrate

Auf Grundlage von Literaturhinweisen bezüglich der Abhängigkeit der Expressionsrate vom *A. tumefaciens*-Stamm und Vektorsystem [119, 122], sollten die Expressionsraten der vorliegenden Systeme untersucht werden. Zur Überprüfung eines möglichen Einflusses des *A. tumefaciens*-Stammes auf die transiente γ -Tubulin-Expressionsrate wurden Kombinationen mit den d35S- und XVE-Promotorsystemen gewählt und untersucht. Das Ergebnis dieser ELISA-Studien ist in Abbildung 3.41 gegeben. Beide Vektorsysteme zeigten unabhängig vom verwendeten *A. tumefaciens*-Stamm ein vergleichbares γ -Tubulin-Expressionsprofil, mit jedoch unterschiedlichen Expressionsraten. So lag die γ -Tubulin-Expressionsrate des pPZPnpt- und pMDC7-Vektorsystems im C58C1-rif(pTiC58)-Stamm um einen Faktor $2,78 \pm 0,05$ über denen im GV3101(pMP90)-Stamm. Größere Unterschiede ergaben sich zwischen den Vektorsystemen. Das pMDC7-System lieferte um einen Faktor $3,89 \pm 0,07$ größere γ -Tubulin-Mengen als das pPZPnpt-System. Die Expressionsprofile unterschieden sich auch bzgl. ihrer Maxima. So lag das γ -Tubulin-Expressionsmaximum beim pPZPnpt-System im Bereich um Tag 2 und beim pMDC7-System im Bereich um Tag 4. Die γ -Tubulin-Expressionsrate von LBA4404 vermittelten Transfektionen war um einen Faktor $1,64 \pm 0,21$ kleiner als der niedrigste in Abbildung 3.41 gezeigte Wert. Somit wurde der LBA4404-Stamm für keine weiteren Transfektionsversuche verwendet.

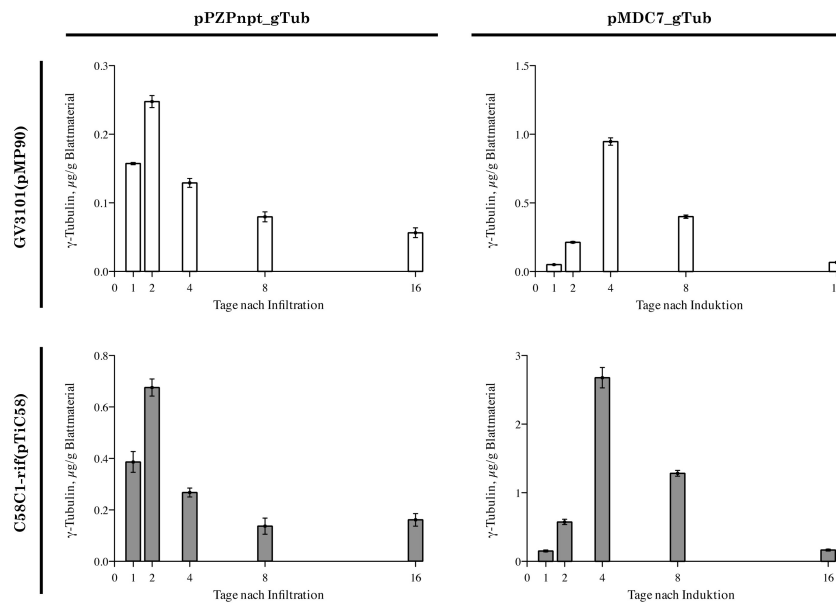


Abbildung 3.41: **Abhängigkeit der Expressionsrate vom *A. tumefaciens*-Stamm und Promotor**

Graphische Darstellung der γ -Tubulin-Konzentration in Abhängigkeit des *A. tumefaciens*-Stammes und Promotorsystems mit Mittelwert und Standardabweichung. Die Bestimmung der γ -Tubulin-Konzentrationen erfolgte via ELISA.

PTGS-Suppression Zur Steigerung der γ -Tubulin-Expressionsrate sollte der Einsatz eines PTGS-Suppressorproteins unternommen werden. Obwohl divergente Literaturhinweise bezüglich der Effektivität des PTGS-Suppressorproteins *p19* vorlagen [64, 70], sollte eine Co-Expression mit jenem unternommen werden. Hierzu wurde die *p19*-CDS in die MCS des pflanzlichen Expressionsvektors pBIN unter Kontrolle eines 35S-Promotors kloniert. Das pBIN_*p19* Konstrukt wurde in verschiedene *A. tumefaciens*-Stämme eingebracht und via PCR und Sequenzierung verifiziert (Daten nicht gezeigt). Je eine pBIN_*p19* tragende *A. tumefaciens*-Kultur wurden in Co-Kultur mit den γ -Tubulin-Konstrukt tragenden *A. tumefaciens*-Kulturen gegeben und zur Agrobioinfiltration verwendet. Die Analyse der γ -Tubulin-Expressionsraten erfolgte via ELISA, deren Ergebnisse in Abbildung 3.42 gezeigt sind.

Der Einsatz der *p19*-Konstrukt tragenden *A. tumefaciens*-Stämme in Co-Kultur veränderte nicht die γ -Tubulin-Expressionsprofile (Abbildung 3.41), erhöhte jedoch erheblich die Expressionsraten. Die Steigerung der jeweiligen maximalen γ -Tubulin-Expressionsrate lag im Intervall von 1,92 bis 3,70. Obwohl für das induzierbare pMDC7_gTub-Konstrukt in Co-Kultur mit pBIN_*p19* tragenden C58C1-rif(pTiC58) eine Steigerungsrate von nur 2,56 erzielt wurde, lieferte diese Kombination die höchste Gesamt- γ -Tubulin-Ausbeute pro Gramm Blattmaterial. Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollte zur weiteren γ -Tubulin-Expression das pMDC7_gTub Konstrukt in C58C1-rif(pTiC58) in Co-Kultur mit pBIN_*p19* zur Agrobioinfiltration und zur Induktion sollten infiltrierte Pflanzen mit für 4 Tage inkubiert mit 5,0 μ M 17 β -Estradiol verwendet werden.

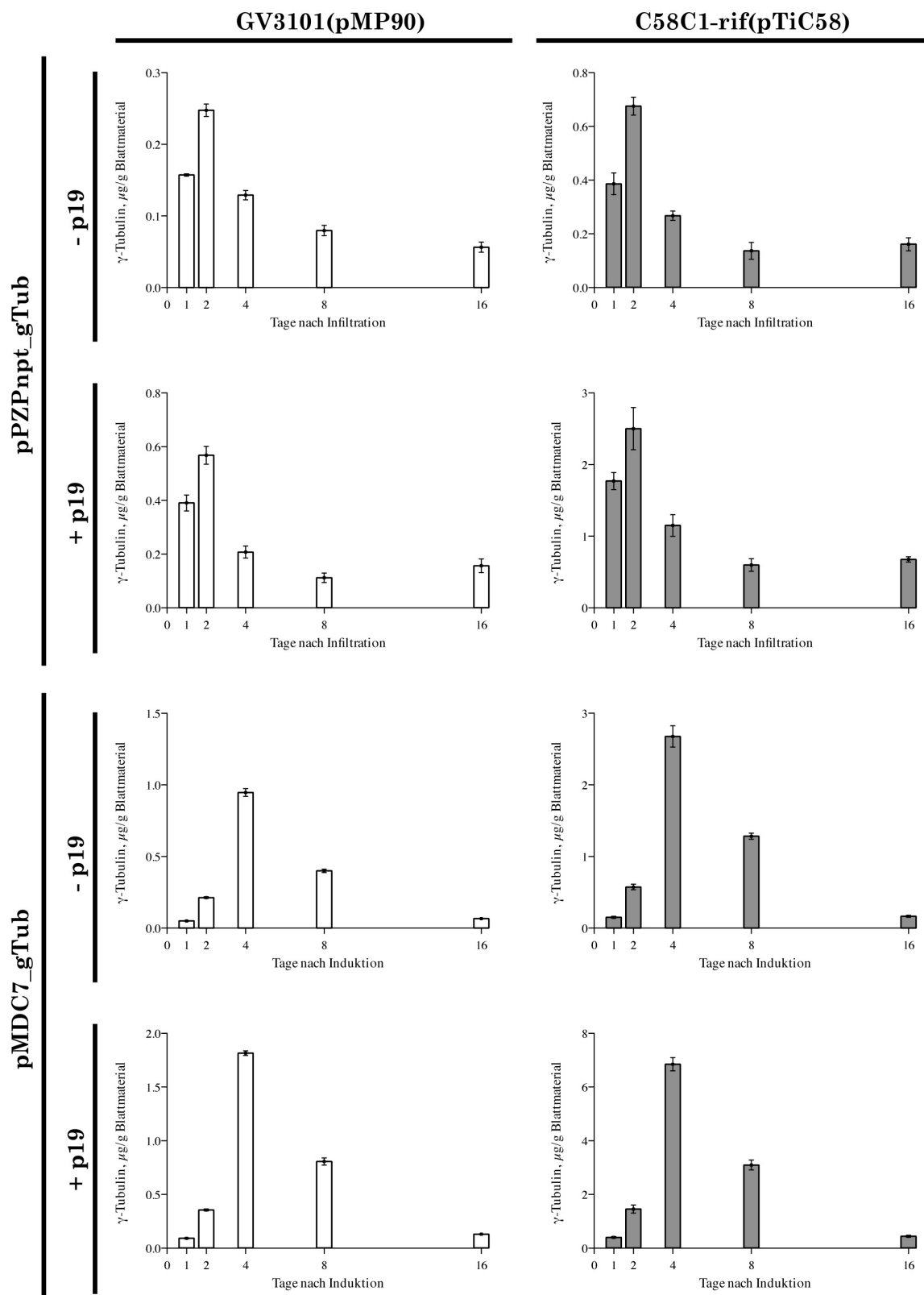


Abbildung 3.42: γ -Tubulin-Expressionsrate in Abhängigkeit des PTGS-Suppressors *p19*

Graphische Darstellung der γ -Tubulin-Konzentration in Abhängigkeit des PTGS-Suppressors *p19* mit Mittelwert und Standardabweichung. Die Bestimmung der γ -Tubulin-Konzentrationen erfolgte via ELISA. Die OD₆₀₀ der pBIN *p19* tragenden *A. tumefaciens* betrug 0,3 und die der γ -Tubulin-Konstrukt tragenden *A. tumefaciens* 0,5 in Co-Kultur.

3.2.3.8 Regulation der γ -Tubulin-Expression

Hinweise auf proteinbiochemischer Ebene deuteten auf eine Regulation der γ -Tubulin-Expression hin. So lag die Expressionsrate der γ -Tubulin-Deletionsmutante bei ELISA-Experimenten um einen Faktor $3,2 \pm 0,5$ über der der γ -Tubulin-Vollängensequenz (Daten nicht gezeigt).

Zur Überprüfung der Vermutung einer potentiellen γ -Tubulin-Regulation auf RNA-Ebene, wurden die relativen Transkriptmengen via qRT-PCR quantifiziert und verglichen. Hierzu wurden *N. benthamiana*-Blätter mit pMDC7_gTub- bzw. pMDC7_gTub Δ AB-Konstrukt tragenden C58C1-rif(pTiC58) infiltriert und mit 5,0 μ M 17 β -Estradiol für 96 Stunden induziert, die RNA aufgearbeitet und zur qRT-PCR eingesetzt.

Zur Korrelation der Messwerte sollte auch der Effekt des PTGS-Suppressorproteins *p19* quantifiziert werden. Hierzu wurden mit pMDC7_gTub/pBIN_*p19* Co-Kultur infiltrierte *N. benthamiana*-Blattproben mit pMDC7_gTub infiltrierter *N. benthamiana* Blattproben verglichen.

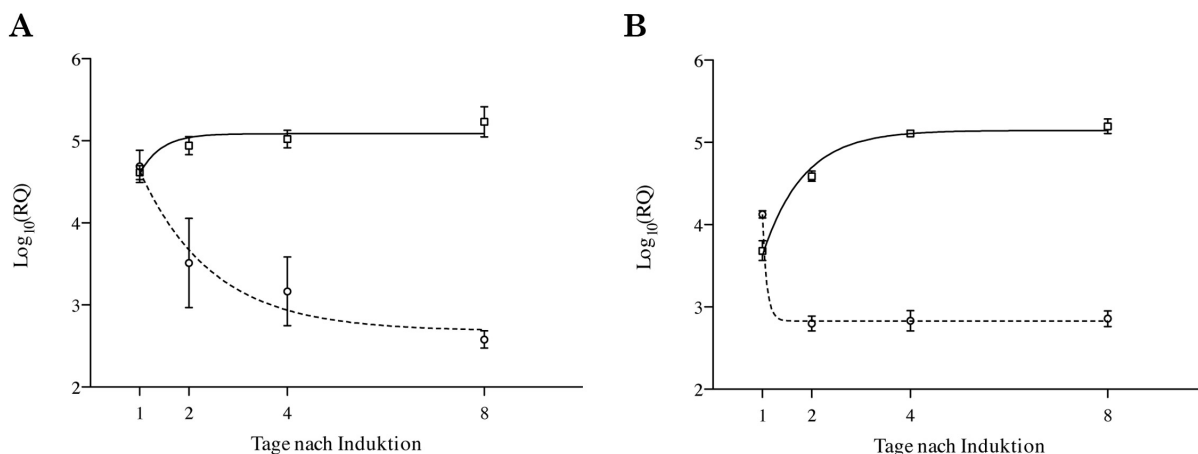


Abbildung 3.43: **Relative RNA-Transkriptkonzentrationen modifizierter γ -Tubulin-CDS**

Graphische Darstellung der relativen γ -Tubulin-RNA-Transkriptkonzentrationen mit Mittelwert, Standardabweichung und Ausgleichsfunktion. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten via qRT-PCR. Die Infiltration wurde mit C58C1-rif(pTiC58) und die Induktion mit 5,0 μ M 17 β -Estradiol für 4 Tage durchgeführt.

A Relative RNA-Transkriptkonzentrationen der modifizierten γ -Tubulin-Vollängensequenz pMDC7_gTub transfizierter *N. benthamiana* Blätter (○) mit Ausgleichsfunktion (···) sowie der γ -A/B-Peptid-Deletionsmutante pMDC7_gTub Δ AB transfizierter *N. benthamiana* Blätter (□) mit Ausgleichsfunktion (—). **B** Relative RNA-Transkriptkonzentrationen der modifizierten γ -Tubulin-Vollängensequenz pMDC7_gTub transfizierter *N. benthamiana* Blätter (○) mit Ausgleichsfunktion (···) sowie der modifizierten γ -Tubulin-Vollängensequenz pMDC7_gTub in Co-Kultur mit pBIN_*p19* transfizierter *N. benthamiana* Blätter (□) mit Ausgleichsfunktion (—).

Die Ausgleichsfunktionen der γ -Tubulin-Vollängen- mit der γ -Tubulin-Teillängen-Transkriptkonzentration näherten sich für die untersuchten Zeiträume den Grenzwerten 2,7 bzw. 5,0 an. Somit lag die Transkriptkonzentration der γ -Tubulin-Deletionsmutante um einen Faktor von ca. 200 über der der γ -Tubulin-Vollängensequenz (Abbildung 3.43.A).

Ein ähnlicher Kurvenverlauf ergab sich für die Studien zum Einfluss des PTGS-Suppressors. Die γ -Tubulin-RNA-Transkriptkonzentration näherte sich für die Co-Kultur einem Grenzwert von circa 5,1 und die der Kontrolle einem Grenzwert von 2,8 an. Somit ergab sich auch hier näherungsweise ein Unterschied um den Faktor 200 (Abbildung 3.43.B).

Der Einfluss des PTGS-Suppressors *p19* auf den nativen – endogenen, nicht modifizierten – γ -Tubulin-RNA-Transkriptanteil ergab den in Abbildung 3.44 gezeigten Zusammenhang. Hierzu wurde der native γ -Tubulin-RNA-Transkriptanteil infiltrierter *N. benthamiana* Blätter im post-induktiven Verlauf untersucht. Die Infiltration erfolgte mit pMDC7_gTub bzw. pMDC7_gTub/pBIN_*p19* tragenden *A. tumefaciens*.

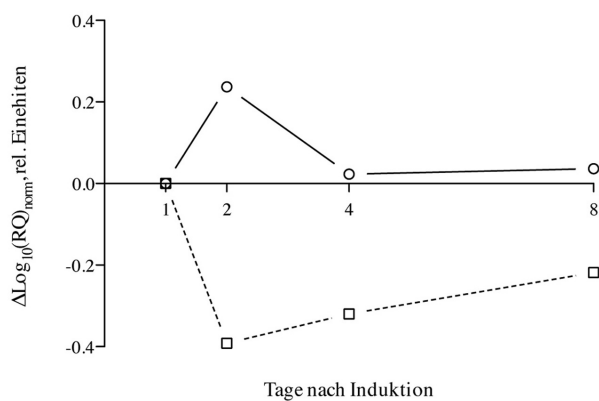


Abbildung 3.44: **Relative RNA-Transkriptkonzentrationen nativer γ -Tubulin-CDS**

Graphische Darstellung normierter, relativer RNA-Transkriptkonzentrationen nativer γ -Tubulin-CDS im post-induktiven Verlauf. qRT-PCR-Messwerte wurden auf einen Standard normiert und die Differenz im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die Infiltration wurde mit C58C1-rif(pTiC58) und die Induktion mit 5,0 μ M 17 β -Estradiol durchgeführt.

Relative RNA-Transkriptkonzentrationen der nativen γ -Tubulin-Vollängensequenz pMDC7_gTub transfizierter und induzierter *N. benthamiana* Blätter ($\square$) mit Punkt-zu-Punkt Verbindungen (- -) sowie der nativen γ -Tubulin-Vollängensequenz pMDC7_gTub/pBIN_*p19* transfizierter und induzierter *N. benthamiana* Blätter ($\circ$) mit Punkt-zu-Punkt Verbindungen (—).

Es zeigte sich, dass die native γ -Tubulin-CDS nach Induktion der Transkription der modifizierten γ -Tubulin-CDS eine rapid negative Regulation erfuhr, die sich im Zeitverlauf jedoch abschwächte. In Gegenwart des PTGS-Suppressorproteins *p19* stieg der native γ -Tubulin-CDS-Anteil nach der Induktion zunächst an, bevor er sich dem Ausgangsniveau annäherte.

3.3 Biochemische Charakterisierung

3.3.1 Native Isolation und Pull-Down

Zur biochemischen Charakterisierung war die native Proteinisolation eine zentrale Voraussetzung. Dies bedingte jedoch gegenüber einer denaturierenden Proteinisolation deutlich geringere Ausbeuten. Die hierbei erzielten Ausbeuten an γ -Tubulin lagen im Bereich von $9,0 \pm 1,3$ ng γ -Tubulin pro 1,0 g Blattmaterial. Durch eine IMAC reduzierte sich die γ -Tubulin-Ausbeute auf $6,7 \pm 1,5$ ng pro 1,0 g Blattmaterial. Die für eine Strukturbestimmung notwendigen Mengen lagen um einen Faktor 5.000 bis 10.000 über den erzielten Ausbeuten [228]. Eine Skalierung hätte den Einsatz von 1.000 bis 2.000 *N. benthamiana*-Pflanzen erforderlich gemacht, was nicht nur die Kapazitäten der Anzuchtträume um einen Faktor 10 überfordert hätte. Auch war eine Agrofektion einer solch hohen Anzahl an Pflanzen praktisch nicht umsetzbar. Somit wurde das Ziel einer Strukturbestimmung verworfen und die vorhandenen Proteinmengen zur Interaktionspartneranalyse eingesetzt. Zur Interaktionspartneranalyse wurde das native Proteinisolat in einem IMAC-Pull-Down verwendet, dessen Ergebnis in Abbildung 3.45 gezeigt ist.

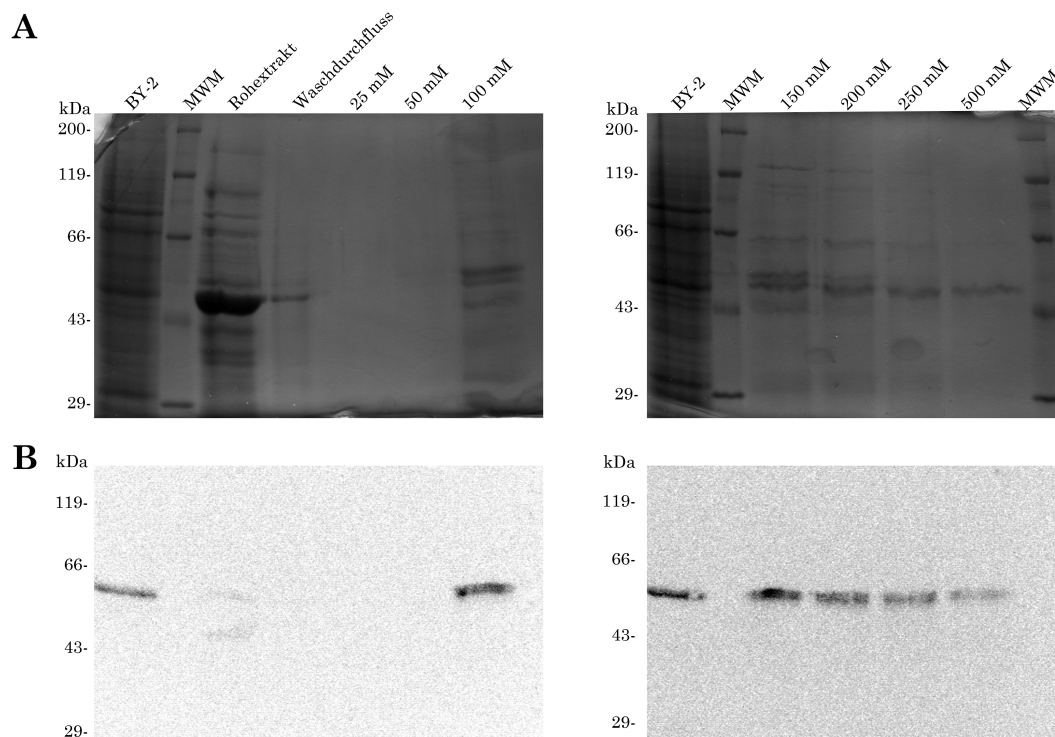


Abbildung 3.45: γ -Tubulin IMAC-Pull-Down

Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung und des immunochemischen γ -Tubulin-Nachweises der einzelnen IMAC-Pull-Down Fraktionen. Die Imidazolkonzentrationen sind in mM über den Spuren gegeben.

A Zur SDS-PAGE wurden 10,0 μ g aufgetragen und das SDS-PAGE-Gel mit kolloidalem Coomassie gefärbt.

B Der immunochemische Nachweis wurde mit dem Antikörper Anti- γ -Tubulin AK 746 (Covalab) durchgeführt. Das zu erwartende Molekulargewicht des modifizierten γ -Tubulins lag bei 54,29 kDa.

Ab einer Imidazolkonzentration von 100 mM zeigten sich bei dem SDS-PAGE-Gel im Größenbereich von 29 bis 200 kDa mehrere Signale (Abbildung 3.45.A). Im immunochemischen γ -Tubulin-Nachweis zeigte sich ebenfalls ab 100 mM Imidazol ein Signal im Größenbereich von circa 55 ± 5 kDa, das über dem der BY-2-Probe lag (Abbildung 3.45.B).

Zur Identifikation potentiell assoziierter Proteine sollten die Proben einer Massenspektrometrischen-Analyse zugeführt werden.

3.3.2 Massenspektrometrische Analyse assoziierter Proteine

Zur massenspektrometrischen Analyse potentieller γ -Tubulin-Interaktionspartner wurden eine Pull-Down Probe des modifizierten γ -Tubulin-Volllängenpeptids, -Deletionsmutante sowie unbehandelte *N. benthamiana*-Blätter als Kontrolle untersucht. Die Messungen wurden je mit 3 Proben mit 2 technischen Replikaten durchgeführt.

3.3.2.1 MALDI-TOF

Die MALDI-TOF-Analyse tryptisch-verdauter Pull-Down-Proben ergab keinerlei verwertbare Ergebnisse. Dies ist hauptsächlich durch die verhältnismäßig hohe Sensitivitätsgrenze der verwendeten Geräte zu erklären. Die wenigen Signale waren aufgrund des geringen Datenbankumfangs für pflanzliche Proteine nicht auswertbar. Auch zeigten die Signale atypische Verschiebungen, die eine Auswertung unmöglich machten (Daten nicht gezeigt).

3.3.2.2 ESI-Massenspektrometrie

Aufgrund der deutlich überlegenen Sensitivität gegenüber der MALDI-TOF Messung wurden 1402 Peptidfragmentspektren gemessen und hieraus insgesamt 323 Proteine identifiziert. Die Peak-Spectra-Identifikation erfolgte auf der Grundlage von internen *A. thaliana*-Datenbanken. Zur Gewährleistung der bestmöglichen Auswertung der dokumentierten Spektren wurde die *A. thaliana* MS-Spektraldatenbank um 12401 *Nicotiana spec.* Proteinsequenzen erweitert. Bei einem *Sample-Spectra-Count*-Schwellenwert von 2 ergab die Analyse der γ -Tubulin-Volllänge Pull-Down-Proben 65 nachgewiesene Proteine. In den Pull-Down-Proben der Deletionsmutante konnten 117 Proteine und in den Kontroll-Proben 56 Proteine identifiziert werden. Je höher der *Sample-Spectra-Count*-Schwellenwert gewählt wurde, desto weniger Proteine konnten identifiziert werden. Ab einem Schwellenwert von 2 konnten Proteine valide identifiziert werden. Die Verteilung der identifizierten Proteine zwischen den Proben ist in Abbildung 3.46 gezeigt. Die Identifikation spezifischer Interaktionspartner erfolgte durch die Betrachtung der Schnittmengen. So wurde neben GCP-2, β -Tubulin und Aktin-7 auch diverse andere Cytoskelett relevante Proteine gefunden.

Ferner wurden Proteasen, Chaperone und Metabolismus relevante Proteine gefunden. Eine vollständige Auflistung aller identifizierten Proteine ist in Tabelle A.48 gegeben. Proteine die sich in der Schnittmenge aller Proben befanden wurden als ubiquitär angesehen und somit nicht weiter bei der Suche nach γ -Tubulin-Interaktionspartnern berücksichtigt. Zur Analyse wurden die identifizierten Proteine nach den *Gene Ontology Annotations* gruppiert und deren prozentualer Anteil betrachtet. Eine funktionell gruppierte Darstellung der gefundenen assoziierten Proteine der γ -Tubulin-Volllängensequenz und γ -Tubulin-Deletionsmutante ist in Abbildung 3.46 gegeben.

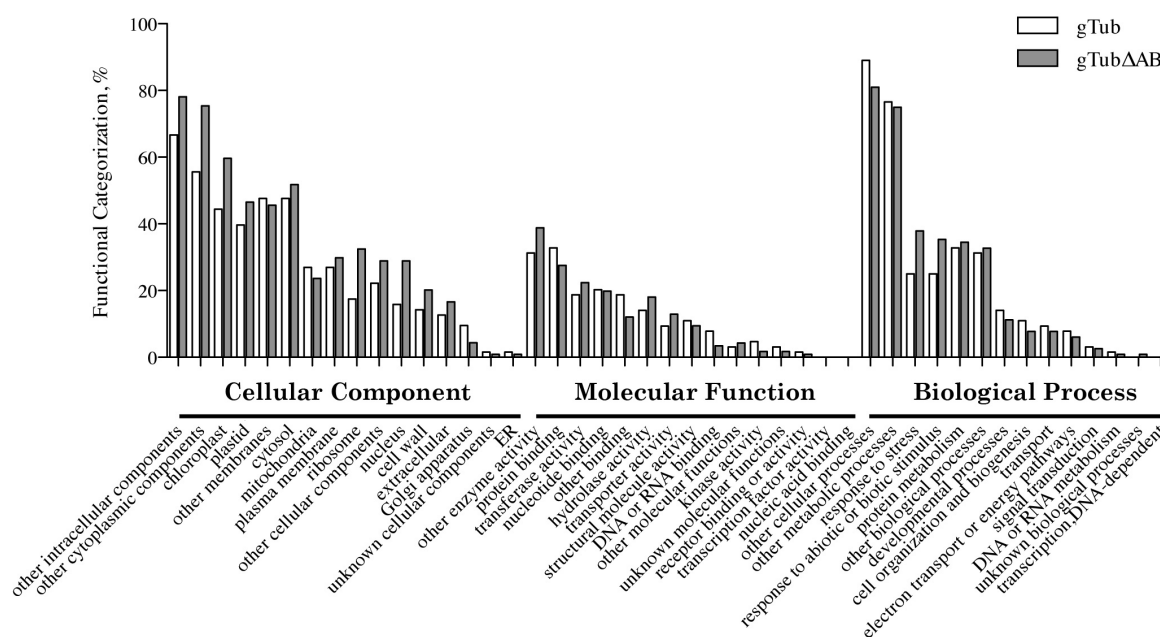
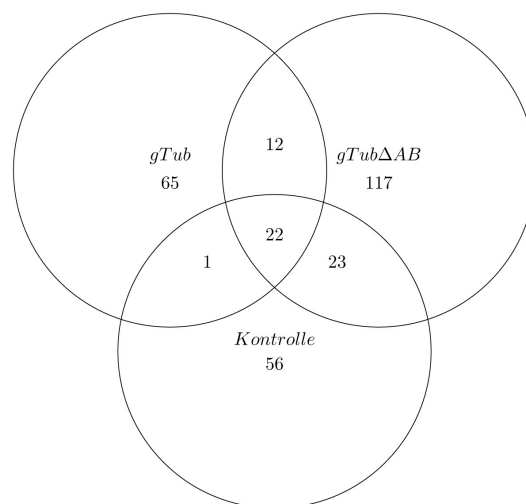


Abbildung 3.46: **Funktionelle Kategorisierung identifizierter γ -Tubulin-Interaktionspartner**

Verteilung der identifizierten Proteine als Venn-Diagramm (oben) und Gruppierung der gefundenen γ -Tubulin-Voll-/Teillängen-Interaktionspartner und deren jeweiliger prozentualer Anteil bzgl. der Funktion nach *Berardini et al.* [229] (unten). Die Darstellung der Schnittmengen erfolgte auf Grundlage eines *Sample-Spectra-Count*-Schwellenwerts von 2.

Tabelle 3.45: Quotienten der funktionellen Charakterisierung der *gTub* und *gTubΔAB*-Probe

Funktion	$\frac{FC_{gTub}}{FC_{gTub\Delta AB}}$
kinase activity**	2,73
DNA or RNA binding**	2,26
Golgi apparatus*	2,17
unknown molecular functions**	1,82
receptor binding or activity**	1,81
DNA or RNA metabolism***	1,81
unknown cellular components*	1,81
ER*	1,81
other binding**	1,55
cell organization and biogenesis***	1,41
electron transport or energy pathways***	1,30
developmental processes***	1,25
transport***	1,21
signal transduction***	1,21
protein binding**	1,19
structural molecule activity**	1,15
mitochondria*	1,14
other cellular processes***	1,10
other membranes*	1,04
nucleotide binding**	1,02
other metabolic processes***	1,02

* Cellular Component

** Molecular Function

*** Biological Process

Ausschlusspuffer zum Pulldown, sowie der Einsatz nicht ionischer, nicht denaturierender Detergenzien (wie Nonidet P-40) führten zu keinen abweichenden Ergebnissen bei der massenspektroskopischen Analyse.

Von besonderem Interesse waren funktionelle Proteingruppen, deren Anteil bei der Voll-längensequenz-Probe höher ausfiel als in der Deletionsmutanten-Probe. Unterschiede zwischen der γ -Tubulin-Volllängensequenz-Interaktionspartner und der γ -Tubulin-Deletionsmutante bzgl. der funktionellen Charakterisierung sind als Quotient $FC_{gTub}/FC_{gTub\Delta AB}$ für Werte größer 1,0 in Tabelle 3.45 gegeben.

Im Vergleich der γ -Tubulin-Volllängensequenz Pull-Down-Probe mit der -Deletionmutanten Probe zeigte sich, dass Proteine mit Nukleinsäure bezogenen sowie Zell-/Transportvorgang organisierenden Funktionen besonders stark vertreten waren.

Eine Variation der Salzkonzentration im nativen

Diskussion

4.1.	<i>In silico</i> Berechnungen zur Identifikation potentieller Interaktionsstellen	118
4.1.1.	Bewertung des verwendeten Strukturmodells	118
4.1.2.	Schlussfolgerungen aus dem elektrostatischen Oberflächenpotential	119
4.1.3.	Der γ -A/B-Peptid-Bereich als Ort potentieller Proteininteraktionen	119
4.2.	Klonierung und Expression von γ -Tubulin	120
4.2.1.	<i>E. coli</i> -Expressionssystem	121
4.2.2.	Hefe-Expressionssystem	122
4.2.3.	Pflanzliche Expressionssysteme	123
4.2.4.	Regulation der γ -Tubulin-Expression	124
	4.2.4.1. Regulation des γ -Tubulin-Proteingehalts	124
	4.2.4.2. Regulation der γ -Tubulin-RNA	125
4.3.	Charakterisierung der Interaktionspartner	126

4.1 *In silico* Berechnungen zur Identifikation potentieller Interaktionsstellen

4.1.1 Bewertung des verwendeten Strukturmodells

Zur Formung und Überprüfung einer Arbeitshypothese wurden ausgehend von der pflanzlichen γ -Tubulin-Primärstruktur mehrere Tertiärstruktur-Modelle erstellt. Ab einer Aminosäure-Sequenzidentität von 60 Prozent zwischen einer bekannten Strukturvorlage und der unbekannten zu modellierenden Sequenz ist eine Modellierung möglich, die Aussagen bzgl. potentieller Interaktionen zulässt [35, 180]. Bei der Modellierung gilt es eine Strukturvorlage mit maximaler Aminosäure-Sequenzidentität auszuwählen. Eine qualitative Bewertung der erstellten pflanzlichen γ -Tubulin-Modelle wurde nach dem MolProbity Schema vorgenommen, da bei dieser Methode sowohl sterische Überlappungen als auch die Winkelgeometrie des Proteinrückgrats berücksichtigt wurden. Obwohl die überlagerten Tertiärstruktur-Modelle eine hohe Ähnlichkeit aufwiesen (Abbildung 3.16 und 3.20), zeigten Winkelanalysen, dass die Threading-Modellierung qualitativ schlechtere Modelle lieferte als die Homologie-Modellierung (Abbildung 3.18, 3.19 und 3.20). Die Gründe hierfür sollen in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert werden.

Die Threading-Modellierungssoftware ging bei den Berechnungen von einer nicht optimalen humanen Strukturvorlage aus. Obwohl der Erwartungswert des Fold-Recognition Scores für die Threading-Modellierung der humanen c1z5wA-Struktur mit $0,0 \cdot 10^0$ auf eine perfekte Übereinstimmung mit der pflanzlichen γ -Tubulin-Aminosäuresequenz hinwies, ist dies durchaus kritisch zu bewerten, da reelle Aminosäure-Unterschiede bestehen. Die humane γ -Tubulin c1z5w-Struktur verfügte über diverse strukturelle Unstimmigkeiten und Unschärfen bzgl. des Proteinrückgrats, die durch ein Refinement von *Rice et al.* [186] beseitigt wurden. Die von *Rice et al.* aufgeklärte humane γ -Tubulin-Struktur (3CB2) wurde, aus unbekannten Gründen, von der Threading-Modellierungssoftware nicht berücksichtigt.

Bei der Homologie-Modellierung zeigte sich bei den Alignment-Scores, dass die humane 3CB2- γ -Tubulin-Struktur im Vergleich zur humanen 1Z5W- γ -Tubulin-Struktur einen 0,06% besseren Scorewert erreichte. Beide menschliche Strukturen lagen mit Abstand vor den nachfolgenden bekannten γ -Tubulin-Strukturen (Tabelle 3.36). Eine gewichtete Kombination beider Strukturen lieferte deshalb vermutlich einen optimalen Vorschlag für die pflanzliche γ -Tubulin-Struktur mit den niedrigsten MolProbity Scores.

Obwohl das pflanzliche Nt_3CB2-Strukturmodell zwei Aminosäure-Konformationen enthält, die knapp außerhalb der Sollwerte liegen (Tabelle 3.38 und Abbildung 3.18), ist deren Einfluss als geringfügig einzustufen (Tabelle 3.40).

4.1.2 Schlussfolgerungen aus dem elektrostatischen Oberflächenpotential

Protein-Proteininteraktionen sind häufig durch elektrostatische Kräfte stabilisiert. Um zu einer Vorstellung über die Verteilung der Kräfte zu gelangen, wurde eine Berechnung des elektrostatischen Oberflächenpotentials für das pflanzliche γ -Tubulin-Modell durchgeführt. Die Berechnung der elektrostatischen Ladungsdichteverteilung ausgehend vom Nt_3CB2-Strukturmodell führte bei beiden Applikationen (ICM Pro und VMD) zu vergleichbaren Ergebnissen (Abbildung 3.21 und A.47). Auch die schlechter bewerteten Strukturmodelle ergaben bei der APBS-Modellierung sehr ähnliche Werte und Verteilungen. So ist die Vermutung zulässig, dass Variationen in der Struktur die Gesamtheit der elektrostatischen Oberfläche nur minimal beeinflussen.

Es zeigte sich eine auffällige Polarisierung des elektrostatischen Oberflächenpotentials, die Vermutungen zum Aufbau des gTuRC zuließ. Aufgrund des γ -Tubulin-Struktur- und -Ladungsmodells war eine 12- bzw. 13-zählige Ringsymmetrie [230] für den pflanzlichen gTuRC vorstellbar. So lagen der resultierende Außendurchmesser der SymmDock-Modelle bei $24,9 \pm 1,3$ nm und der Innendurchmesser bei $13,3 \pm 1,0$ nm, was den bisher dokumentierten gTuRC-Durchmessern entsprach [2, 230]. Für die Ringmodellierung konnten keine sterischen Überlappungen oder ungünstige Winkelkombinationen dokumentiert werden, was für die Qualität des gTuRC-Modells spricht.

Die elektrostatische Oberflächenpolarisation könnte einen Beitrag zur Stabilisierung sowohl des Rings als auch der lateralen Interaktionen beitragen, je nach Orientierung des γ -Tubulins im gTuRC. Quantitative Berechnungen lieferten jedoch keine validen Ergebnisse, die eine bestimmte γ -Tubulin-Orientierung im Ringverbund favorisieren ließen (Daten nicht gezeigt).

4.1.3 Der γ -A/B-Peptid-Bereich als Ort potentieller Proteininteraktionen

Phylogenetische Studien zeigten eine hohe Konservierung eines als γ -A/B-Peptid-Bereich bezeichneten Abschnitts [43] innerhalb der Plantae. Innerhalb der grünen Landpflanzen konnte in der Arbeitsgruppe eine Differenzierung des γ -A/B-Peptid-Bereichs dokumentiert werden [44]. Dieser Bereich ist maßgeblich bei der Differenzierung der phylogenetischen Gruppen beteiligt (Abbildung 3.22). Dies deutete auf den γ -A/B-Peptid-Bereich als Ort potentieller pflanzenspezifischer Interaktionen hin. Über eine Lokalisation oder einen möglichen zugänglichen Oberflächenanteil des γ -A/B-Peptid-Bereichs lagen bisher nur Vermutungen vor, weshalb es galt, den zugänglichen Oberflächenanteil des γ -A/B-Peptid-Bereichs zu bestimmen.

Analysen des Oberflächenkontakts einzelner Aminosäuren des pflanzlichen Nt_3CB2-Strukturmodells offenbarten, dass der γ -A/B-Peptid-Bereich an der dem Solvent zugänglichen Oberfläche beteiligt ist (Abbildung 3.23.A). Auch zeigte sich, dass der γ -A/B-Peptid-Bereich in einer Region hoher elektrostatischer Oberflächenpolarisation lag, was ihn weiter als potentiellen Ort für Proteininteraktionen prädestiniert (Abbildung 3.23.B). Sekundärstrukturanalysen zeigten, dass sich der γ -B-Peptid-Bereich im Bezug zum γ -A-Peptid-Bereich deutlicher von vergleichbaren Sequenzen abhob (Abbildung 3.23.C) und somit vermutlich wahrscheinlicher involviert in pflanzenspezifische Interaktionen ist.

In Verbindung mit dem Modell der elektrostatischen Oberflächenpolarisation unterstützte dies die Hypothese, dass es sich bei dem γ -A/B-Peptid-Bereich um einen Ort potentieller Protein-Interaktionen handelt. Zur Überprüfung dieser Hypothesen sollte die γ -Tubulin-Volllängensequenz und eine γ -A/B-Peptid-Deletionsmutante exprimiert und für Interaktionspartneranalysen verwendet werden.

4.2 Klonierung und Expression von γ -Tubulin

Für proteinbiochemische Studien, wie der Proteinkristallisation oder Interaktionspartneranalyse, galt es aus der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Systemen eine Auswahl zu treffen. Ein Überblick der einzelnen entscheidungsrelevanten Systemeckdaten ist in Tabelle 4.46 geben.

Tabelle 4.46: Charakteristika verschiedener Expressionssysteme [74, 231, 232]

Charakteristika	<i>E. coli</i>	Hefen	Insekten Zellkultur	Mammalia Zellkultur	Pflanzliche Zellkultur/Gewebe
Wachstum	schnell	schnell	langsam	langsam	sehr langsam
Mediumkomplexität	minimal	minimal	komplex	komplex	komplex
Kosten des Mediums	gering	gering	hoch	hoch	gering
Expressionsrate	hoch	niedrig-hoch	niedrig-hoch	niedrig-moderat	niedrig-moderat
Extrazelluläre Expression	ins Periplasma möglich	ins Medium möglich	ins Medium möglich	ins Medium möglich	ins Medium möglich
Proteinrückfaltung	oft nötig	kann erforderlich sein	nicht nötig	nicht nötig	nicht nötig
N-verknüpfte Glykosylierung	nein	hoher Mannoseanteil	einfach	komplex	hoher Mannoseanteil, Le ^{α}
O-verknüpfte Glykosylierung	nein	ja	ja	ja	ja
Phosphorylierung	nein	ja	ja	ja	ja
Acetylierung	nein	ja	ja	ja	ja

Zur γ -Tubulin-Expression sollten *E. coli*, Hefe und pflanzliche Systeme verwendet werden. Auf die Verwendung von Insekten- bzw. Mammalia-Zellkulturen wurde aufgrund unterschiedlicher PTMs (Tabelle 4.46), unverhältnismäßig hoher Kosten und phylogenetischer Hinweise (Abbildung 3.22) verzichtet.

4.2.1 *E. coli*-Expressionssystem

Die Expression von größeren Mengen an gelöstem und aktivem γ -Tubulin sollte zuerst mit dem *E. coli*-pET-System unternommen werden. Zur Klonierung der γ -Tubulin-CDS war jedoch das Subklonierungssystem pJET1.2 erforderlich, da eine direkte Klonierung in pET-Expressionsvektoren nicht darstellbar war. Die Notwendigkeit der Subklonierung ist vermutlich aufgrund der von der γ -Tubulin-Sequenz ausgebildeten Sekundärstrukturen und der thermodynamischen Instabilität der kohäsiven Enden zu erklären [8].

Mit dem etablierten, T7/*lacO*-Promotor basierten pET-Vektorsystem war es möglich, γ -Tubulin in relativ hohen Mengen zu exprimieren. Jedoch konnte kein lösliches Protein nachgewiesen werden (Abbildung 3.25). Auch umfangreiche Studien zur Erhöhung der Löslichkeit lieferten kein lösliches Protein (Abbildung 3.27). Es ist anzunehmen, dass sich das gesamte γ -Tubulin als sogenannte IBs in der Zelle ablagerte. IBs entstehen hauptsächlich aufgrund inkorrekt gefalteter Polypeptide [233] sowie einer hohen Konzentration nicht nativ vorkommender Polypeptide in der Zelle [234]. Auch könnte eine unvollständige Phosphorylierung bzw. Glykosylierung zu einer Konformationsänderung und der damit verbundenen Ablagerung als IBs geführt haben.

Erste Studien zur Tubulin-Expression in *E. coli* erfolgten von *Lubega et al.* [235]. Das in *E. coli* exprimierte β -Tubulin lag jedoch in inaktiver, immobilisierter Form als IBs vor. Eine Rückfaltung des rekombinanten γ -Tubulins in Lösung [234, 235] oder auf einer Säulenmatrix [236] wurde aufgrund der ebenso notwendigen wie komplexen Tubulin-Faltungsmechanismen [208, 237, 238] abgelehnt. *E. coli* verfügt zwar über endogene Faltungsmechanismen [239, 240], wenn diese aber nicht ausreichen kann die Fusion mit löslichkeitserhöhenden Tags bei der Expression von gelöstem Protein einer Rückfaltung fördern. So war es möglich, mittels alternativer Tags (wie MBP und GST) Tubuline in gelöster und aktiver Form in *E. coli* zu exprimieren [200, 241]. Auch kann die Fusion eines TrxA-Tag der Bildung von IBs vorbeugen und zur Expression von aktivem, gelöstem Protein beitragen [242]. *In silico* Vorhersagen für verschiedene Tag-modifizierte γ -Tubulin-Sequenzen lieferten keine signifikant erhöhten Löslichkeitswahrscheinlichkeiten. So lag die Löslichkeitswahrscheinlichkeit zwischen 44,8% und 50,6% (Tabelle 3.44). Der Schwachpunkt des Vorhersage-Algorithmus war, dass nur die Primärstruktur bei der Berechnung der Löslichkeit berücksichtigt wurde. Biochemische Modifikationen (wie die durch TrxA oder DsbA/C vermittelte Disulfidbrückenausbildung) werden hierbei nicht berücksichtigt. Als Folge dieser Unsicherheit sollten acht verschiedene γ -Tubulin-Fusionskonstrukte kloniert und zur Expression geführt werden (Abbildung 3.28). Hierbei konnte mit keinem Konstrukt γ -Tubulin in gelöster Form dokumentiert werden. Sowohl die Variation der Wachstums- und Induktionsbedingungen als auch die Co-Expression von Chaperonen und der Einsatz von Fusions-Partnern [58] brachten keine Fortschritte bei der Expression von gelöstem Protein. Der Einsatz segregativer Tags (wie *pelB*

und *ompT*), die eine Segregation von rekombinantem Protein in das Periplasma bewirken und so die Ausbildung von Disulfidbrücken aufgrund der vorherrschenden oxidierenden Bedingungen ermöglichen, lieferten keine Verbesserung in Bezug auf die Expression von gelöstem γ -Tubulin.

4.2.2 Hefe-Expressionssystem

Nachdem die Expression von gelöstem γ -Tubulin in *E. coli* nicht erfolgreich war, wurde aufgrund der in Tabelle 4.46 beschriebenen Eigenschaften, das *K. lactis*-System zur Expression von γ -Tubulin ausgewählt. Um die native Proteinstruktur nicht durch eine unnötig harsche Extraktionsmethode zu schädigen, wurde zur segregativen Expression eine α -MF-Sequenz an den N-Terminus der γ -Tubulin-Sequenz angefügt. Der strukturelle Einfluss der N-terminalen Modifikation der γ -Tubulin-CDS wurde als gering eingestuft, da jener vor der Segregation ins Medium wieder rückstandslos entfernt werden sollte.

Nach der Klonierung konnte bei über 400 selektierten und untersuchten Klonen nur ein einziger identifiziert werden, der die Expressionskassette samt γ -Tubulin-CDS trug. Beim Kontrollansatz mit einer MBP-CDS waren circa 20% der untersuchten Klone positiv. Bei der immunochemischen Untersuchung der γ -Tubulin-Expression konnte kein Signal dokumentiert werden, das dem γ -Tubulin zuzuordnen gewesen wäre (Abbildung 3.31). Selbst ein, dem α -MF- γ -Tubulin-Fusionskonstrukt entsprechendes, Signal in der *K. lactis* Probe mit einem zu erwartenden Molekulargewicht von 63,4 kDa war nicht zu dokumentieren. Dies unterstützte die Vermutung, dass die γ -Tubulin-CDS in dem transfizierten Klon nicht translatiert wurde. So ist auch die Vermutung legitim, dass die konstitutiv exprimierte γ -Tubulin-CDS aus *N. tabacum* in *K. lactis* physiologisch aktiv war und in zellorganisierte und zellteilungsrelevante Prozesse eingriff, was zu einem Absterben der Zellen führte, weshalb kein *K. lactis* Klon dokumentiert werden konnte der rekombinantes γ -Tubulin exprimierte. Somit war es vorstellbar, dass hier ein unbekannter Regulationsmechanismus beteiligt war. Das Auftreten eines Signals im Western-Blot mit einem apparenten Molekulargewicht von circa 50 ± 5 kDa in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen ist wahrscheinlich als unspezifische Bindung des Antikörpers zu verstehen. Das *K. lactis* endogene γ -Tubulin hat ein Molekulargewicht von 52,47 kDa [243] und ist vermutlich das signalgebende Peptid. Da ein dem rekombinanten, pflanzlichen γ -Tubulin entsprechendes Signal weder in den transgenen *K. lactis*-Zellen, noch im Medium dokumentiert werden konnte, ist die Annahme gerechtfertigt, dass es bei erfolgreicher Transfektion zu keiner γ -Tubulin-Expression kam. Eine *in silico* Analyse des Codon Usage offenbarte keine Mangelcodons, so dass ein suboptimales Codon Usage als Grund für die nicht erfolgte γ -Tubulin-Expression ausgeschlossen werden konnte. Umfangreiche Versuche der γ -Tubulin-Expression in dem experimentellen Hefestamm FGY217 [244] waren ebenfalls nicht erfolgreich, was die vorausgehenden Vermutungen unterstützte.

4.2.3 Pflanzliche Expressionssysteme

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse der γ -Tubulin-Expression wurde der Versuch unternommen, γ -Tubulin in pflanzlichen Zellen zu exprimieren. Die γ -Tubulin-Expression in pflanzlichen Zellen bot den Vorteil einer vollständigen Chaperonausstattung und korrekten Phosphorylierungs- bzw. Glykosylierungsmaschinerie, so dass aufgrund dieser Faktoren keine Störungen zu erwarten waren. Auch waren die Kosten im Vergleich zu Mammalia sowie Insekten Zellkulturen deutlich geringer, was für die benötigten Mengen an Protein ein wichtiges Kriterium war.

Auch konnten *A. thaliana*-Pflanzen erfolgreich von Abe *et al.* mit α - und β -Tubulin-GFP-Fusionskonstrukten transfiziert und zur Expression geführt werden [245]. Die induzierbaren und konstitutiven Konstrukte lieferten auch erhebliche Mengen an rekombinantem Protein. Dies könnte dadurch begründet sein, dass α -Tubulin und β -Tubulin in sehr großen Mengen im Cytosol vorliegen und die Zelle somit Schwankungen im Proteinpool für diese beiden Proteine leichter kompensieren kann. Jedoch zeigten die transgenen Pflanzen erhebliche morphologische Auffälligkeiten. Allerdings war der Versuch einer BY-2 sowie *A. thaliana* Transfektion mit einem konstitutiven sowie induzierbaren γ -Tubulin-Konstrukt nicht erfolgreich. Diese Tatsache ist vermutlich durch den Umstand der Zellteilung zu erklären. Da γ -Tubulin für zell- und zellteilungsorganisierende Prozesse verantwortlich ist, kann eine Über- bzw. sogar Basalexpression diese Prozesse nachhaltig stören. Dies deckt sich mit den Beobachtungen und Vermutungen bzgl. der γ -Tubulin-Expression in Hefe-Expressionssystemen.

Die γ -Tubulin-Expression mit dem konstitutiven bzw. induzierbaren Konstrukt in differenzierten *N. benthamiana* Blattgeweben war vermutlich aufgrund der Tatsache möglich, dass die Zellen der Tabak-Blattgewebe zum Zeitpunkt der Transfektion über eine geringe, inhomogene Teilungsaktivität verfügten und dass Störungen im γ -Tubulin-Proteinpool der Zelle geringe Auswirkungen haben. Frühere Studien innerhalb der Arbeitsgruppe zum Vorkommen nativen γ -Tubulins in Blättern, zeigten dass die γ -Tubulin-Expressionsraten in differenzierten Blattgeweben immunochemisch nicht dokumentierbar waren. Mit dem polyklonalen γ -Tubulin-Antikörper war es nicht möglich das endogene γ -Tubulin in *N. benthamiana* detektierten. Hierzu könnten zum Einen durch eine divergente PTM und zum Anderen durch den nachgewiesenen niedrigen γ -Tubulin-Gehalt ausdifferenzierter Blätter [42] verantwortlich sein. Die γ -Tubulin-Affinität dieses Antikörpers wurde jedoch bereits in mehreren Studien bestätigt [8, 45, 213]. Das gesamte dokumentierbare, rekombinante γ -Tubulin lag in gelöster Form vor. Dies könnte auch aus den potentiellen Interaktionen mit anderen Proteinen und potentieller PTM resultieren [246]. Jedoch konnte bei der Expression in Blattgeweben eine deutliche Regulation der γ -Tubulin-Expressionsrate dokumentiert werden die im Folgenden noch diskutiert werden soll.

Die erzielten γ -Tubulin-Expressionsraten waren zu gering, um Studien zur Proteinkristallisation anzustreben. Zur Optimierung der Expressionsrate wurde die γ -Tubulin-CDS um eine Kozaksequenz erweitert, was aber ebenfalls nicht die zur Strukturanalyse erforderlichen Mengen an Protein lieferte. Die Expression von γ -Tubulin-GST-Fusionskonstrukten zur Struktur- und Interaktionspartneranalyse [247] war nicht möglich, obwohl bereits GST in *N. tabacum* exprimiert werden konnte [63] und die verwendete GST-CDS identisch zu dem etablierten Vektorsystem pE4n war [248]. Zu begründen ist dies vermutlich aufgrund unspezifizierter Wechselwirkungen der exprimierten GST-CDS mit den *N. benthamiana* Zellen, da auch die Kontrollkonstrukte keine dokumentierbare Expression zeigten. Obwohl Zuo *et al.* [249] zeigten, dass eine Transfektion und Expression von einem XVE-GFP-Konstrukt in BY-2 darstellbar ist, deutet die Tatsache der nicht erfolgreichen BY-2 Transfektion mit einem XVE- γ -Tubulin-Konstrukt auf eine Basalexpression und das Wirken potentieller Regulationsmechanismen hin.

4.2.4 Regulation der γ -Tubulin-Expression

In einer Zelle können zwischen 10 und 100, aber auch bis zu 10^7 Proteinkopien vorliegen [92]. Viele Faktoren beeinflussen den Proteingehalt und es treten vielfältige Regulationsmechanismen auf. Von der Regulation auf DNA-Ebene, über Regulation des RNA-Gehalts, bis hin zur Degradation fertiger Proteine.

Die Konzentrationsabhängigkeit des entwicklungsbiologisch relevanten γ -Tubulins je nach Gewebe und Teilungsaktivität, wurde bereits in vorherigen Studien der Arbeitsgruppe ausführlich beschrieben [42]. Die in den Zellen vorliegende, endogene γ -Tubulin-Konzentration ist im Verhältnis zu sogenannten Massenproteinen (wie Hexokinasen, u. ä.) relativ gering und hochgradig reguliert. Die Interpretation der γ -Tubulin Expressionsraten in *N. benthamiana*-Blättern lässt keinen messbaren Einfluss der Kozak-Sequenz auf die Expressionsrate erkennen. Die von Kotakis *et al.* postulierte lichtintensitätsabhängige Regulation der Proteinexpressionsrate [73], konnte für γ -Tubulin nicht dokumentiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die γ -Tubulin-Expressionsrate bereits stärkeren Regulation unterworfen war. Im Vergleich zu anderen Proteinen (wie GFP, etc.) [224] ergaben sich, mit verschiedenen Vektorsystemen, für γ -Tubulin relativ niedrige Expressionsraten.

4.2.4.1 Regulation des γ -Tubulin-Proteingehalts

Die Analyse der 17β -Estradiol Dosis-Wirkungskurve für die γ -Tubulin-Expression zeigte einen vergleichbaren Verlauf zu der intensiv untersuchten Dosisabhängigkeit für GFP [139]. Zwischen dem 35S- und XVE-System, unabhängig vom *A. tumefaciens*-Stamm, offenbarten sich in der vorliegenden Arbeit Unterschiede in der γ -Tubulin-Expressionsrate. Die γ -Tubulin-Expressionsraten

beider Systeme lagen weit unter denen anderer Proteine. Erst durch den Einsatz des PTGS-Suppressorproteins *p19* war es überhaupt möglich, γ -Tubulin-Expressionsraten zu erreichen, die weitere proteinbiochemische Untersuchungen erlauben. Auch die Tatsache, dass die Deletionsmutante gegenüber der γ -Tubulin-Volllängensequenz um einen Faktor $3,2 \pm 0,5$ höhere Expressionraten aufwiesen, deutete auf der Ebene der Proteinkonzentration auf eine Regulation hin. Die massenspektrometrischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit offenbarten, dass einige der gefundenen γ -Tubulin assoziierten Proteine zum 26S-Proteasom (regulatorische Partikel wie AAA Nukleotidasen) gehören. Sie wurden zum Teil exklusiv nur in der Volllängen-Probe gefunden. Dies deutet auf eine verstärkte Degradation der überexprimierten Volllängensequenz hin. Eine regulative Degradation Zellzyklus relativer Proteine (wie Cycline, etc.) ist bereits umfangreich dokumentiert [92] und auch für γ -Tubulin vorstellbar.

Für eine immortalisierte Hamster-Ovarien Zelllinie wurden von *Marchesi et al.* Multiproteinkomplexe bestehend aus dem Hitzeschock-Protein HSP70 und dem Elongationsfaktor Ia gefunden [250]. Diese Proteine wirken nachweislich unterstützend bei der Tubulinfaltung. In der vorliegenden Arbeit war der Anteil an HSP70-Chaperon-Signalen in den Proben der (vermutlich inkorrekt gefalteten) Deletionsmutante höher als in den Proben der Volllängensequenz. Dies kann als ein verstärktes Bestreben einer Korrektur bzw. Assistenz bei der Faltung der vermutlich infunktionellen Deletionsmutante verstanden werden. Zur Überprüfung einer vermuteten Regulation auf RNA-Ebene wurde der γ -Tubulin-Transskriptgehalt analysiert.

4.2.4.2 Regulation der γ -Tubulin-RNA

Die Analyse der eigenen Ergebnisse ergab eine Abhängigkeit zwischen der γ -Tubulin-Konzentration und der Induktionszeit, waren aber nicht mit denen von *Zuo et al.* [139] in Einklang zu bringen. So entspricht zwar die dokumentierte γ -Tubulin-Expressionsrate der des XVE-Systems, während die Transskriptrate eine deutliche Gegenregulation aufwies. Aus den Messdaten ist zu schließen, dass die Deletionsmutante eine verminderte Gegenregulation im Vergleich zur Volllängensequenz erfuhr. Ein analoger Effekt war mit dem PTGS-Suppressor *p19* bei der Volllängensequenz zu erzielen (Abbildung 3.43). Eine Verzögerung der PTGS wie *Qui et al.* beobachteten, konnte für den untersuchten Zeitraum hier nicht dokumentiert werden [251].

Die Transkription der rekombinanten γ -Tubulin-Sequenz führte zur Reduktion der endogenen γ -Tubulin-CDS. Bei der Co-Expression des PTGS-Suppressors *p19* stieg nicht nur der Anteil der rekombinanten, sondern auch der endogenen γ -Tubulin-CDS. Dieses Ergebnis ist durch das PTGS-Regulationsmodell erklärbar. Der PTGS-Suppressor *p19* entkoppelt die RNA-Regulation. Vermutungen hierzu wurden durch qRT-PCR-Untersuchungen untermauert (Abbildung 3.44).

4.3 Charakterisierung der Interaktionspartner

In den von *Chuong et al.* zum Ende der vorliegenden Arbeit publizierten Studie [252], wurden erste Vermutungen zu Mikrotubuli-Interaktionspartnern gestellt. *Chuong et al.* verwendeten aus Säugerhirn extrahierte Tubuline für Pull-Down Experimente mit pflanzlichen Extrakten. Diese Vorgehensweise ist aufgrund der Nichtberücksichtigung des pflanzenspezifischen γ -A/B-Peptid-Bereichs, weit mehr als kritisch zu bewerten. Auch waren die Pufferzusammensetzungen problematisch, da hier potentielle Chelatisierungseffekte nicht beachtet wurden.

So wurden von *Chuong et al.* Tubulinextrakte aus Rinderhirn zum Pull-Down verwendet. Wie gezeigt fehlen den Säuger-Tubulinen pflanzenspezifische Sequenzen (wie der γ -A/B-Peptid-Bereich), die für Proteininteraktionen wahrscheinlich erforderlich sind. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Gewinnung des pflanzlichen γ -Tubulins oberste Priorität eingeräumt. Die spezifische Isolation und Purifikation nativer Proteine aus pflanzlichen Zellen ist komplex und mit niedrigen Ausbeuten verbunden. Die Expression einer getaggten γ -Tubulin-Sequenz diente der Gewinnung größerer Proteinmengen. Die Verwendung eines C-terminalen His₆-Tags sowie die geplante Verwendung eines N-terminalen GST-Tags ist eine etablierte Pull-Down Strategie [247]. Strukturelle Modifikationen durch den His₆-Tag sind aufgrund seiner geringen Masse von ca. 1 kDa und der somit geringen Größe vernachlässigbar klein [66, 205, 253]. Studien von *Carson et al.* [204] zeigten, dass der His₆-Tag einen sehr kleinen Effekt auf die Proteinstruktur hat und aus diesem Grund in 90% aller strukturellen biologischen Studien Verwendung findet. Das erarbeitete Strukturmodell zeigte, dass der C-Terminus, wie der N-Terminus, an der Proteinoberfläche repräsentiert ist und somit gravierende strukturelle Verschiebungen nicht zu erwarten waren. Auch zeigte sich eine hohe phylogenetische Variabilität am C-Terminus, was die Positionierung eines Tags an diesem Terminus begünstigte.

Die von *Chuong et al.* gewählte Pufferkomposition wenig vorteilhaft, da dieser EGTA enthielt um zweiwertige Kationen zu komplexieren und so eine mögliche Proteaseaktivität zu reduzieren. *Rice* sowie *Aldaz et al.* [33, 186] zeigten aber, dass Mg²⁺ die Tubulin-GTP-Bindung stabilisiert, somit kann der Einsatz von EGTA die potentielle Proteaseaktivität reduzieren, destabilisiert aber Tubuline. Der äquimolare Einsatz von MgSO₄ und EGTA nach *Chuong et al.* ist somit *ad absurdum* geführt. In der vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grunde auch EDTA/EGTA-freie Proteaseinhibitoren von Roche verwendet.

Die Isolation von γ -Tubulin ohne assoziierte Proteine unter nativen Bedingungen zur Proteinkristallisation nach der von *Chuong et al.* vorgeschlagenen Variation der Salzkonzentration

zur Destabilisierung der Tubulin-Komplexe, war nicht erfolgreich. Eine Alternative ist die *in vitro* γ -Tubulin-Expression in Weizenkeimling-Extrakten von Promega. Als Vorteile wären die verhältnismäßig kurze Translationszeit sowie die nicht notwendige Proteinisolation und damit verhältnismäßig einfache Proteinpurifikation zu nennen. Diesen Vorteilen standen relativ hohe Kosten im Verhältnis zur Proteinausbeute gegenüber. Die Proteinmengen für ein initiales Proteinkristallisationsscreening wurden mit mindestens 8400 Euro beziffert, weshalb die Verwendung kommerzieller Zellextrakte verworfen wurde. Die Etablierung eines Präparationsprotokolls eigener, kostengünstigerer *in vitro* Weizenkeimling-Extrakte war im Labormaßstab nicht darstellbar.

Ferner wurden keine Deletionsmutanten und valide Negativkontrollen bei den Studien von *Chuong et al.* [252] in die Protein-Interaktionspartnerstudien einbezogen. Dieser Mangel wurde durch die, in der vorliegenden Arbeit vorgestellten, γ -Tubulin-Deletionsmutante behoben. Auch wurde von *Chuong et al.* [252] eine hoch affine Matrixkomposition, Affi-Gel-10 (Bio-Rad) und Sepharose CL-6B (Sigma), zum Pulldown verwendet ohne freie und nicht besetzte Bindestellen durch Glycine-Methylester zu inaktivieren [254]. Diese Matrices verfügen neben den unbesetzten Stellen auch über Eigenschaften als Ionentauscher, was die Proteinbindung unspezifischer macht.

In der arbeitsgruppeninternen Studie von *Klapperich* [255] wurden mittels eines Hefe-Zwei-Hybridsystems Untersuchungen zu potentiellen γ -Tubulin-Interaktionspartnern durchgeführt und lieferten neben plausiblen potentiellen γ -Tubulin-Interaktionspartnern auch schwerer nachvollziehbare. Einige der von *Klapperich* identifizierten Proteine wurden auch in der vorliegenden Arbeit als γ -Tubulin-Interaktionspartner gefunden, wie z. B. die AAA-ATPase RPT4a. Problematisch beim Hefe-Zwei-Hybridsystem sind falsch-positiv bzw. falsch-negativ identifizierte Interaktionspartner. Falsch-positive sowie falsch-negative Protein-Interaktionen entstehen z. B. aufgrund der Lokalisation im Hefe Zellkern, was zur Folge haben kann, dass das Beute-Protein aufgrund des Milieus eine nicht native Faltung annehmen kann. Im Falle der Tubuline wurde gezeigt, dass die Faltung ein immanent wichtiger Faktor für die Funktionalität ist. Auch konnten im Hefe-Zwei-Hybridsystem Proteininteraktionen dokumentiert werden, die aufgrund des Zellzyklus oder der Kompartimentierung nicht gemeinsam auftreten.

Dem Hefe-Zwei-Hybrid-System und Pull-Down/massenspektroskopischen Interaktionspartneranalysen ist jedoch gemein, dass eine Kenntnis der Interaktion noch keine Informationen über den Mechanismus oder die Proteinanordnung liefert. Hierfür ist eine Kenntnis der Proteinstruktur(en) oder eine genaue Vorstellung der Strukturen nötig. Im Vergleich zu den Studien von *Klapperich* wurde in der vorliegenden Arbeit ein umfassenderes Bild der Interaktionspartner und deren funktioneller Gruppierung erarbeitet.

So wurde in der vorliegenden Arbeit das Protein Aktin-7 massenspektroskopisch als Interaktionspartner identifiziert, was die Hypothese der Mikrotubuli-Aktin-Interaktion durch ein sogenanntes Multifunktionelles Protein stützt [256]. Da γ -Tubulin maßgeblich an der Mikrotubuliorganisation beteiligt ist, scheint die Vermutung gerechtfertigt, dass sich in dem (in der vorliegenden Studie) erarbeiteten Datensatz weitere γ -Tubulin-Interaktionspartner enthalten sein können. Der Versuch einer Erweiterung der vorhandenen *A. thaliana*-Protein-Datenbank um mehrere tausend Proteine aus Tabak lieferte keine neuen γ -Tubulin-Interaktionspartner. Die bekannten Tabak-Proteine sind häufig sogenannte Mengenproteine, die einen hohen Anteil an der Zellmasse haben. Regulatorische Proteine liegen nur in geringerem Umfang in der Zelle vor oder werden gar nur transient exprimiert und sind schwerer zu erfassen. Die Identifikation regulatorischer Proteine ist somit entsprechend aufwendig.

Für die pflanzliche γ -Tubulin-Vollängensequenz aus *N. tabacum* konnte in *N. benthamiana* auch eine Interaktion mit GCP2 dokumentiert werden, die auch von *Mishra et al.* [257] für humane HeLa Zellen nachgewiesen wurde. Weitere pflanzenspezifische γ -Tubulin-Interaktionspartner sind vermutlich noch in den Spektra-Rohdaten enthalten, zur Auswertung bedarf es jedoch einer vollständigen Protein-Spectra-Peakdatenbank für Tabak.

Die von *Kong et al.* [258] postulierte GCP4-Interaktion, aufgrund immunochemischer Hinweise, konnte nicht belegt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht mittels degenerierter Oligonukleotide die GCP4-CDS aus *N. benthamiana* aufzuklären. Dies blieb ohne Erfolg und bedarf weiterer Studien. Der von *Kong et al.* verwendete GCP4-Antikörper, wurde uns zur Verfügung gestellt und lieferte in mehreren Studien unter Standardbedingungen keine Signale. Erst bei hohen GCP4-Konzentrationen zeigte der Antikörper beim Western-Blot ein nicht reproduzierbares Signal. Dies ist als kritisch zu bewerten, da jeder Antikörper über eine unspezifische Bindekapazität verfügt und bei hohen Proteinkonzentrationen unspezifische Bindungen begünstigt sind.

Die Identifikation des TCP1-Chaperons als γ -Tubulin-Interaktionspartner in der massenspektrometrischen Analyse korreliert mit den Ergebnissen von *Stoppin-Mellet et al.* [32] und untermauert die Hypothese der zur γ -Tubulin-Faltung notwendigen höher evolvierten Chaperone. Die γ -Tubulin-Interaktionen mit Teilen des 26S-Proteasoms erklären γ -Tubulin-Degradationsmuster und deuten in Verbindung mit den Transkripttiteranalysen auf eine Gegenregulationen bei erhöhtem γ -Tubulin-Proteiniter hin, obwohl Blattgewebe selbst nur noch über geringe Teilungsaktivität verfügen.

Zusammenfassung

Wie alle Eukaryoten besitzen auch höhere Pflanzen ein mikrotubuläres Cytoskelett. Einige Funktionen dieses Cytoskeletts sind relativ stark konserviert, andere dagegen scheinen sehr pflanzen-spezifisch zu sein. Dies betrifft insbesondere charakteristische mikrotubuläre Netzwerke, die bei der Neubildung und der Verstärkung der Zellwände wichtige Rollen übernehmen. Wie der Aufbau dieser Netzwerke kontrolliert wird, ist bisher relativ unklar. Typische Mikrotubuli organisierende Zentren (MTOC), insbesondere Centrosomen oder Spindelpolkörper, sind bei höheren Pflanzen nicht beobachtet worden. Von pilzlichen und tierischen Organismen weiß man, dass γ -Tubulin mit seinen assoziierten Proteinen in den MTOC bei der Nukleation von Mikrotubuli eine Schlüsselfunktion hat. Dieses Mitglied der Tubulin-Superfamilie wird aber auch in Pflanzen gefunden.

Zu Beginn der Arbeit wurden mittels *in silico* Berechnungen Strukturmodelle des pflanzlichen γ -Tubulins aus *Nicotiana tabacum* erarbeitet, da die Struktur, die zu einem Verständnis der pflanzlichen Wachstumsregulation beitragen könnte, bisher unbekannt ist. An den erarbeiteten Strukturmodellen konnte gezeigt werden, dass das pflanzenspezifische γ -A/B-Peptid an der Solvens zugänglichen Oberfläche beteiligt ist, helikale Sekundärstrukturen ausbildet und eine starke elektrostatische Oberflächenpolarisation aufweist, was in der Summe starke Indizien für eine an Protein-Proteininteraktionen beteiligte Domäne sind. Auf Grundlage der bioinformatischen Daten konnte für weitere Studien eine notwendige γ -Tubulin-Deletionsmutante entwickelt werden.

Für Röntgendiffraktionsstudien und γ -Tubulin-Interaktionspartneranalysen war die Verfügbarkeit verhältnismäßig großer Proteinmengen notwendig. Die Expression der γ -Tubulin-Volllängensequenz in gelöster und aktiver Form stellte einen immanent wichtigen Zwischenschritt dar.

Das *Escherichia coli* T7/*lacO*-Expressionssystem lieferte, trotz vielversprechender Erfolge in der Vergangenheit, kein gelöstes rekombinantes γ -Tubulin. So wurden zwar verhältnismäßig hohe Expressionsraten erzielt, aber das rekombinante γ -Tubulin lag quantitativ als *Inclusion bodies* vor. Eine Variationen der Expressionsparameter (wie z. B. Temperatur, Modulation der Expressionsrate und Chaperon Co-Expression) sowie umfangreiche Versuche mittels verschiedenster Konstrukte mit diversen potentiell die Löslichkeit erhöhenden Tags γ -Tubulin in gelöster Form in *E. coli* zu exprimieren blieben erfolglos. Eine Denaturierung der *Inclusion bodies* und Rückfaltung wurde aufgrund der wohl bei der Tubulinfaltung notwendigen komplexeren Chaperone sowie thermodynamischer Überlegungen ausgeschlossen.

Die höher evolvierte Chaperonausstattung war ein Hauptgrund für die Verwendung der eukaryotischen Hefe-Expressionssysteme *K. lactis* und des experimentellen *S. cerevisiae*-Stammes FGY217 zur γ -Tubulin-Expression. So konnten nach der Selektion nur transgene Hefe-Zellen dokumentiert werden, die die γ -Tubulin-Expressionskassette nachweislich an der vorgesehenen Zielposition in ihrem Genom integrierten, aber keine dokumentierbare Expression zeigten. Die wahrscheinlichste Begründung hierfür ist, dass ein erhöhter intrazellulärer γ -Tubulin-Titer mit dem Zellwachstum und der Zellteilung dieser eukaryotischen Organismen interferierte und durch Rückkopplungen die rekombinante γ -Tubulin-CDS aus *N. tabacum* ausgeschaltet wurde.

Der Versuch einer transienten γ -Tubulin-Überexpression in differenzierten Blattgeweben höherer Pflanzen war eine logische Konsequenz aus den vorherigen Ergebnissen und lieferte, wenn auch nicht die für eine Proteinkristallisation notwendigen Mengen, gelöstes γ -Tubulin. Bestrebungen einer stabilen Transfektion von *A. thaliana* oder BY-2-Zellkulturen mit einer γ -Tubulin-CDS lieferten keine transgenen Organismen, was starke Interferenzen der rekombinanten γ -Tubulin-CDS in den Zellen vermuten lässt. Transfektionsversuche mit nur GFP tragenden Konstrukten ergaben hingegen eine hohe Anzahl an transgenen Organismen, die auch verhältnismäßig starke Expressionsraten zeigten. Die erzielten Proteinmengen bei der transienten γ -Tubulin-Überexpression in *N. benthamiana* Blattgeweben, in Co-Expression mit dem Posttranscriptional Gene Silencing-Suppressorprotein *p19*, waren für einen Pull-Down sowie eine massenspektroskopische Analyse der Interaktionspartner ausreichend und ergaben Befunde.

Ergebnisse anderer Forschungsgruppen konnten zum Teil bestätigt, aber auch Vermutungen widerlegt werden. Eine abschließende Auswertung des erarbeiteten massenspektroskopischen Datensatzes wird jedoch erst dann möglich sein, wenn das Tabak-Proteom vollständig sequenziert ist. Die Erweiterung der bestehenden pflanzlichen Vergleichsdatenbanken um das bisher bekannte Tabak-Proteom vervielfachte die Anzahl der in dieser Studie identifizierten γ -Tubulin-Interaktionspartner. So konnte eine γ -Tubulin-Interaktion mit GCP2, wie sie bereits für menschliche Zellen postuliert wird, erstmalig bei pflanzlichen Zellen belegt werden. Die Identifikation von Aktin-7 als Interaktionspartner pflanzlichen γ -Tubulins ist bisher einmalig. Interaktionen mit dem TCP1-Chaperon untermauern die Hypothese der zur Faltung pflanzlichen γ -Tubulins notwendigen Chaperone. Beobachtete γ -Tubulin-Degradationsmuster in Verbindung mit Interaktionen des 26S-Proteasoms deuten auf eine Gegenregulationen bei erhöhtem γ -Tubulin-Titer auf Proteinebene hin. Da Blattgewebe selbst nur noch über eine sehr geringe und inhomogene Teilungsaktivität verfügen ist diese Regulation hoch spannend. Auch konnte durch Co-Expression des PTGS-Suppressorproteins *p19* gezeigt werden, dass bei der γ -Tubulin-Expression eine Regulation auf RNA-Ebene erfolgt.

Anhang

A.1. Strukturmodellierung	II
A.2. Massenspektrometrische-Proteinidentifikation	II

A.1 Strukturmodellierung

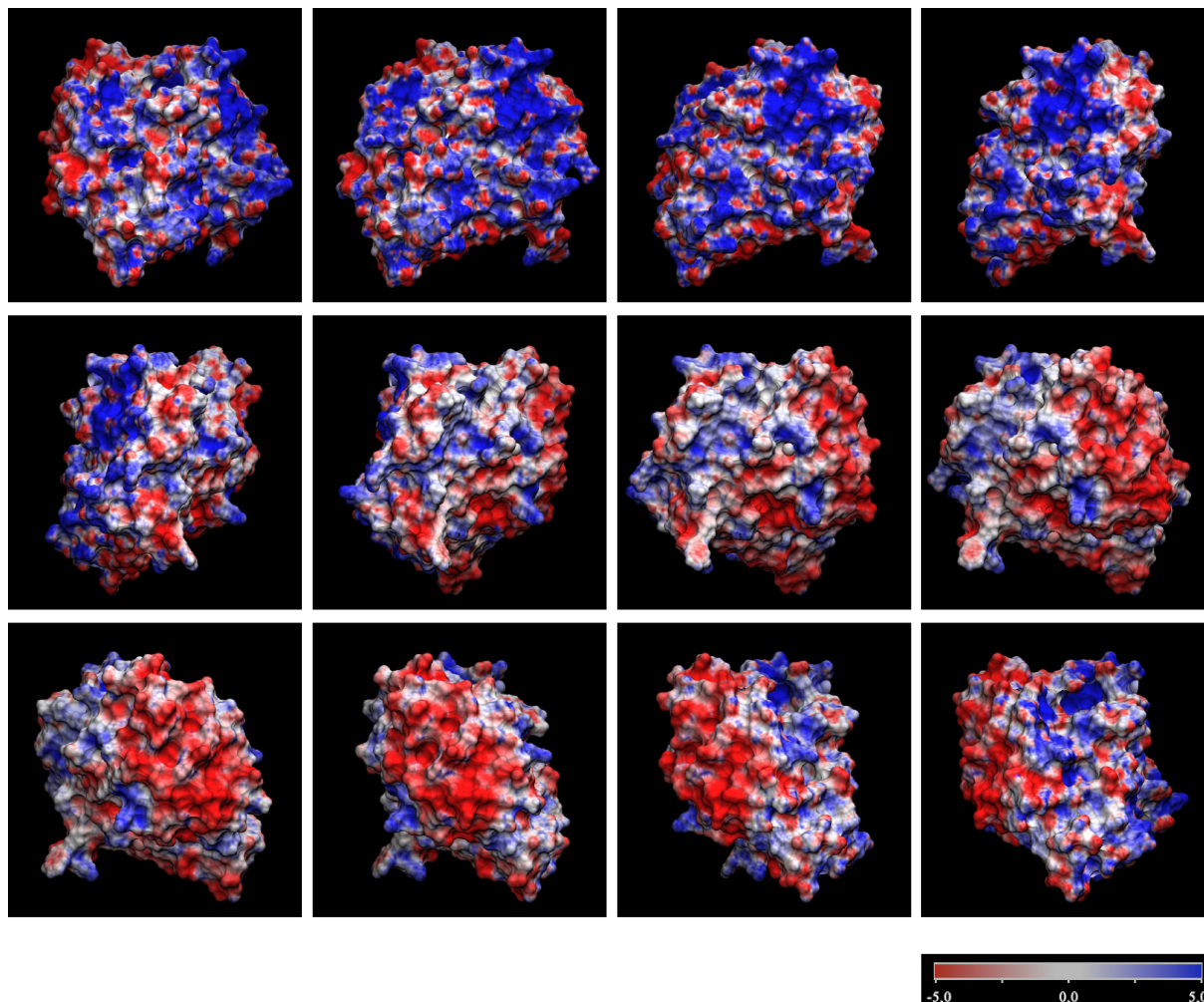


Abbildung A.47: **Plot des elektrostatischen Oberflächenpotentials für Nt_3CB2**

Über das Proteinrückgrad wurde ein Netz gelegt, das entsprechend dem jeweiligen Potential eingefärbt wurde. Die Berechnung erfolgte mit dem SURF-Algorithmus [259] für VMD mittels einer *Linearized traditional Poisson-Boltzmann-Equation* unter *multiple Debye-Huckel sphere boundary conditions*. Ausgehend von der Grundansicht (oben links) erfolgte eine Drehung im Uhrzeigersinn um jeweils 30° um die z-Achse. Die Referenz für das elektrostatische Potential ist in der Joule pro Coulomb gegeben.

A.2 Massenspektrometrische-Proteinidentifikation

Tabelle A.47: Anzahl der gefundenen Proteine abhängig vom *Sample-Spectra-Count*-Schwellenwert

Schwellenwert	$gTub$	$gTub\Delta AB$	K	$gTub \cap gTub\Delta AB$	$gTub \cap K$	$gTub\Delta AB \cap K$	$gTub \cap gTub\Delta AB \cap K$
1	147	224	119	31	7	51	39
2	65	117	56	12	1	23	22
3	35	67	26	1	0	8	13
4	25	39	12	4	0	1	10
5	11	19	9	4	0	0	5
6	6	10	2	1	0	1	1

Tabelle A.48: In Pull-Down-Proben massenspektrometrisch identifizierte Proteine

Locus	Name/Funktion	Peak – Spectra – Count			Sample – Spectra – Count		
		γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle	γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle
At1g01220	ghmp kinase-related	1	0	0	1	0	0
At1g02560	clpp5 (nuclear encoded clp protease 5)	0	4	1	5	0	3
At1g04480	60s ribosomal protein 123 (rpl23a)	0	1	0	1	0	1
At1g05010	efe (ethylene-forming enzyme)	0	1	0	1	0	1
At1g07920	elongation factor 1-alpha / ef-1-alpha	5	7	7	19	4	4
At1g07930	elongation factor 1-alpha / ef-1-alpha	5	7	7	19	4	4
At1g07940	elongation factor 1-alpha / ef-1-alpha	5	7	7	19	4	4
At1g08250	adt6 (arogenate dehydratase 6)	2	0	0	2	2	0
At1g09100	rpt5b (26s proteasome aaa-atpase subunit rpt5b)	2	2	0	4	2	2
At1g09270	impa-4 (importin alpha isoform 4)	0	1	0	1	0	1
At1g09340	crb (chloroplast rna binding)	0	6	3	9	0	3
At1g11430	plastid developmental protein dag	0	1	0	1	0	1
At1g11720	atss3 (starch synthase 3)	2	0	0	2	2	0
At1g11840	atglx1 (glyoxalase i homolog)	0	1	0	1	0	1
At1g11860	aminomethyltransferase	3	12	3	18	2	6
At1g11910	aspartyl protease family protein	1	1	0	2	1	1
At1g12900	gap-2 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase a subunit 2)	0	4	0	4	0	4
At1g14000	vik (vhl-interacting kinase)	1	0	0	1	1	0
At1g14750	sds (solo dancers)	0	0	1	1	0	0
At1g15730	prli-interacting factor 1	3	0	0	3	3	0
At1g15820	lhcb6 (light harvesting complex psii subunit 6)	1	0	0	1	1	0
At1g17170	atgst24 (glutathione s-transferase tau 24)	0	0	1	1	0	0
At1g17880	nascent polypeptide-associated complex (nac) domain-containing protein	0	0	1	1	0	1
At1g20200	emb2719 (embryo defective 2719)	3	0	0	3	3	0
At1g20620	cat3 (catalase 3)	2	4	1	7	2	4
At1g22275	zyp1b	0	0	1	1	0	1
At1g22410	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase	2	1	0	3	2	1
At1g22780	pfl (pointed first leaves)	1	2	2	5	1	2
At1g23310	ggt1 (glutamate:glyoxylate aminotransferase)	0	4	0	4	0	4
At1g23740	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	0	1	1	2	0	1
At1g24150	fh4 (formin homologue 4), actin binding / protein binding	0	1	0	1	0	1
At1g24180	iar4, oxidoreductase	1	2	1	4	1	2
At1g24510	t-complex protein 1 epsilon subunit, putative / tcp-1-epsilon, putative / chaperonin	2	0	0	2	2	0
At1g25570	leucine-rich repeat protein-related	1	0	0	1	1	0
At1g26630	fbr12 (fumonisin b1-resistant12), translation initiation factor	1	0	0	1	1	0
At1g29150	ats9 (arabidopsis non-atpase subunit 9)	1	0	0	1	1	0
At1g29880	glycyl-trna synthetase / glycine-trna ligase	0	6	3	9	0	6
At1g30580	gtp binding	0	5	1	6	0	4
At1g31230	ak-hsdh i (aspartate kinase-homoserine dehydrogenase i)	3	1	0	4	3	1
At1g31330	psaf (photosystem i subunit f)	1	0	0	1	1	0
At1g31730	epsilon-adaptin, putative	1	0	0	1	1	0

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.48 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Locus	Funktion	Peak – Spectra – Count			Sample – Spectra – Count			
		γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle	Total	γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle
Atlg32060	prk (phosphoribulokinase)	0	6	2	8	0	4	2
Atlg32990	prp11 (plastid ribosomal protein l11)	0	0	1	1	0	0	1
Atlg33850	40s ribosomal protein s15, putative	0	2	1	3	0	2	1
Atlg34030	40s ribosomal protein s18 (rps18b)	1	2	2	5	1	2	2
Atlg34410	arf21 (auxin response factor 21), transcription factor	0	0	1	1	0	0	1
Atlg35160	gfl14 phi (gfl14 protein phi chain)	0	2	0	2	0	2	0
Atlg42970	gapb (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase b subunit)	4	9	5	18	4	4	4
Atlg45000	26s proteasome regulatory complex subunit p42d	1	0	0	1	1	0	0
Atlg50990	protein kinase-related	0	1	0	1	0	1	0
Atlg52510	hydrolase, alpha/beta fold family protein	0	1	0	1	0	1	0
Atlg53240	malate dehydrogenase (nad), mitochondrial	0	3	1	4	0	3	1
Atlg53750	rpt1a (regulatory particle triple-a 1a), atpase	4	2	0	6	3	2	0
Atlg54100	aldh7b4 (aldehyde dehydrogenase 7b4)	0	0	1	1	0	0	1
Atlg54340	icdh (isocitrate dehydrogenase)	0	1	0	1	0	1	0
Atlg56070	los1, copper ion binding / translation elongation factor	0	10	4	14	0	5	3
Atlg56190	phosphoglycerate kinase	13	15	9	37	5	6	6
Atlg56340	crt1 (calreticulin 1)	1	0	0	1	1	0	0
Atlg56410	erd2 (early-responsive to dehydration 2)	0	0	2	2	0	0	2
Atlg60070	binding / clathrin binding / protein binding / protein transporter	1	0	0	1	1	0	0
Atlg60550	echid (enoyl-coa hydratase/isomerase d)	0	1	1	2	0	1	1
Atlg61520	lhca3, chlorophyll binding	1	1	0	2	1	1	0
Atlg62020	coatomer protein complex, subunit alpha	1	0	0	1	1	0	0
Atlg63770	peptidase m1 family protein	0	5	1	6	0	4	1
Atlg64740	tua1 (alpha-1 tubulin), structural constituent of cytoskeleton	3	2	2	7	2	2	2
Atlg65930	isocitrate dehydrogenase	0	5	1	6	0	4	1
Atlg68010	hpr, glycerate dehydrogenase	0	1	1	2	0	1	1
Atlg68750	atpcc4, phosphoenolpyruvate carboxylase	5	2	0	7	3	2	0
Atlg69740	hembl, catalytic/ metal ion binding	0	3	0	3	0	2	0
Atlg70410	carbonic anhydrase, putative	0	6	2	8	0	5	2
Atlg70710	atgh9b1 (arabidopsis thaliana glycosyl hydrolase 9b1), cellulase	1	0	0	1	1	0	0
Atlg71220	ebs1 (ems-mutagenized bri1 suppressor 1)	2	0	0	2	2	0	0
Atlg72330	alaat2 (alanine aminotransferase 2)	0	8	2	10	0	5	2
Atlg72370	p40, structural constituent of ribosome	0	0	1	1	0	0	1
Atlg72810	threonine synthase, putative	1	0	0	1	1	0	0
Atlg73110	ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	0	1	2	3	0	1	2
Atlg74590	gstu10 (glutathione s-transferase tau 10)	0	1	0	1	0	1	0
Atlg74910	adp-glucose pyrophosphorylase family protein	1	0	0	1	1	0	0
Atlg75780	tub1, gtp binding / gtpase/ structural molecule	0	2	0	2	0	2	0
Atlg76450	oxygen-evolving complex-related	0	1	0	1	0	1	0
Atlg77090	thylakoid lumenal 29.8 kda protein	0	1	0	1	0	1	0
Atlg78360	atgstu21 (glutathione s-transferase tau 21)	0	1	0	1	0	1	0
Atlg78370	atgstu20 (glutathione s-transferase tau 20)	0	1	1	2	0	1	1
Atlg78870	ubc35 (ubiquitin-conjugating enzyme 35)	0	1	0	1	0	1	0

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.48 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Locus	Funktion	Peak – Spectra – Count			Sample – Spectra – Count		
		γ	$\gamma\Delta AB$	Kontrolle	γ	$\gamma\Delta AB$	Kontrolle
Atlg78900	vha-a (vacuolar atp synthase subunit a)	65	22	7	94	6	5
Atlg79230	mst1 (mercaptopyruvate sulfurtransferase 1)	0	3	0	3	0	0
Atlg80030	dna1 heat shock protein, putative	1	0	0	1	1	0
Atlg80410	emb2753 (embryo defective 2753), binding	1	0	0	1	1	0
Atlg80600	win1 (hopw1-1-interacting 1)	0	2	0	2	0	0
At2g01140	fructose-bisphosphate aldolase	0	2	1	3	0	1
At2g01250	60s ribosomal protein l7 (rpl7b)	0	2	2	4	0	2
At2g04030	cr88, atp binding	0	1	0	1	0	0
At2g05710	aconitate hydratase, cytoplasmic	0	7	0	7	0	0
At2g05990	mod1 (mosaic death 1)	0	2	1	3	0	1
At2g13360	agt (alanine:glyoxylate aminotransferase)	0	1	4	5	0	3
At2g18230	atppa2 (arabidopsis thaliana pyrophosphorylase 2)	0	1	0	1	0	0
At2g18450	sdh1-2, succinate dehydrogenase	0	1	0	1	0	0
At2g20450	60s ribosomal protein l14 (rpl14a)	0	1	1	2	0	1
At2g21170	tim (triosephosphate isomerase)	0	2	0	2	0	0
At2g21330	fructose-bisphosphate aldolase	2	2	5	9	2	4
At2g21630	transport protein, putative	1	0	0	1	0	0
At2g21660	ccr2 (cold, circadian rhythm, and rna binding 2)	0	1	4	5	0	3
At2g22780	pmdh1 (peroxisomal nad-malate dehydrogenase 1)	0	3	0	3	0	0
At2g26080	atgldp2 (arabidopsis thaliana glycine decarboxylase p-protein 2)	0	1	0	1	0	0
At2g28000	cpn60a (chaperonin-60alpha), atp binding / protein binding	1	6	1	8	1	1
At2g29120	atglr2.7, intracellular ligand-gated ion channel	1	0	0	1	0	0
At2g29630	thic (thiaminc), adp-ribose pyrophosphohydrolase / catalytic	2	0	0	2	2	0
At2g29770	kelch repeat-containing f-box family protein	1	0	0	1	1	0
At2g33040	atp synthase gamma chain, mitochondrial (atpc)	1	0	0	1	1	0
At2g33210	hsp60-2 (heat shock protein 60-2), atp binding	1	1	0	2	1	0
At2g33370	60s ribosomal protein l23 (rpl23b)	0	1	0	1	0	0
At2g33800	ribosomal protein s5 family protein	1	2	2	5	1	2
At2g34470	ureg (urease accessory protein g), atp binding / metal ion binding	7	0	1	8	4	1
At2g35040	aicartf/impchase bienzyme family protein	0	0	1	1	0	1
At2g35660	ctf2a, monooxygenase/ oxidoreductase	1	0	0	1	0	0
At2g36325	hydrolase, acting on ester bonds	1	0	0	1	1	0
At2g36530	los2, copper ion binding / phosphopyruvate hydratase	0	4	3	7	0	3
At2g39730	rca (rubisco activase), adp binding / atp binding	11	11	6	28	5	5
At2g41220	glu2 (glutamate synthase 2), glutamate synthase (ferredoxin)	0	1	0	1	0	0
At2g41680	ntrc (nadh-dependent thioredoxin reductase c)	1	1	0	2	1	0
At2g42600	atppc2 (phosphoenolpyruvate carboxylase 2)	1	4	0	5	1	4
At2g43560	immunophilin / flkbp-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	0	0	1	0	0	1
At2g43750	oasb (o-acetylserine (thiol) lyase b), cysteine synthase	0	1	0	1	0	0
At2g45290	transketolase, putative	0	1	0	1	0	0
At3g01390	vma10 (vacuolar membrane atpase 10)	0	1	0	1	0	0
At3g02110	scpl25 (serine carboxypeptidase-like 25), serine-type carboxypeptidase	2	0	0	2	2	0
At3g04340	emb2458 (embryo defective 2458)	1	0	0	1	1	0

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.48 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Locus	Funktion	Peak – Spectra – Count			Sample – Spectra – Count			
		γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle	Total	γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle
At3g04400	emb2171 (embryo defective 2171), structural constituent of ribosome 2,3-biphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase heat shock cognate 70 kda protein 3 (hsc70-3) (hsp70-3) apx2 (ascorbate peroxidase 2), l-ascorbate peroxidase adk1 (adenosine kinase 1), adenosine kinase/ copper ion binding anion-transporting atpase family protein atfer2 (ferritin 2), binding / ferric iron binding / oxidoreductase clathrin heavy chain, putative 2-cys peroxiredoxin, chloroplast (bas1) chaperonin, putative ubp13 (ubiquitin-specific protease 13), ubiquitin thiolesterase hsp70 (heat shock protein 70), atp binding gtp binding / gtpase 30s ribosomal protein s10, chloroplast, putative atrl1, transporter (s)-2-hydroxy-acid oxidase, peroxisomal, putative / glycolate oxidase 60s ribosomal protein 118a (rpl18ac) atppc3 (phosphoenolpyruvate carboxylase 3) pldalpha1 (phospholipase d alpha 1), phospholipase d into3 (methionine over-accumulator 3) chaperonin, putative atp-1, atp binding / protein binding / unfolded protein binding rna-binding protein, putative sahh2 (s-adenosyl-l-homocysteine (sah) hydrolase 2) hsp60 (heat shock protein 60), atp binding pp2aa2 (protein phosphatase 2a subunit a2) atprx q, antioxidant/ peroxiredoxin glucan phosphorylase, putative vacuolar atp synthase subunit h family protein adf2 (actin depolymerizing factor 2), actin binding rps15ad (ribosomal protein s15a d), structural constituent of ribosome unknown protein subtilase family protein phs2 (alpha-glucan phosphorylase 2), phosphorylase/ transferase mdh (malate dehydrogenase), l-malate dehydrogenase/ binding atbbc1 (arabidopsis thaliana breast basic conserved 1) emb1796 (embryo defective 1796), atp binding monodehydroascorbate reductase, putative pyruvate kinase, putative fructose-1,6-bisphosphatase ppl1 (psbp-like protein 1) 2-oxoglutarate dehydrogenase e1 component, putative	0	1	0	1	0	1	0
At3g08590		0	3	0	3	0	3	0
At3g09440		1	2	1	4	1	2	1
At3g09640		1	3	0	4	1	3	0
At3g09820		0	1	0	1	0	1	0
At3g10350		0	1	0	1	0	1	0
At3g11050		1	0	1	2	1	0	1
At3g11130		0	1	0	1	0	1	0
At3g11630		0	4	2	6	0	4	2
At3g11830		3	1	0	4	3	1	0
At3g11910		1	0	0	1	1	0	0
At3g12580		2	5	3	10	2	3	3
At3g12915		1	3	0	4	1	3	0
At3g13120		0	0	1	1	0	0	1
At3g13640		0	2	0	2	0	2	0
At3g14415		0	1	2	3	0	1	2
At3g14600		4	1	2	7	4	1	2
At3g14940		5	1	0	6	3	1	0
At3g15000		0	0	1	1	0	0	1
At3g15730		0	1	0	1	0	1	0
At3g17390		0	0	1	1	0	0	1
At3g18190		4	2	0	6	4	2	0
At3g20050		2	1	0	3	2	1	0
At3g21215		2	0	0	2	1	0	0
At3g23810		0	5	0	5	0	4	0
At3g23990		2	3	0	5	2	3	0
At3g25800		0	1	0	1	0	1	0
At3g26060		1	1	1	3	1	1	1
At3g29320		0	1	0	1	0	1	0
At3g42050		1	0	0	1	1	0	0
At3g46000		0	1	0	1	0	1	0
At3g46040		0	1	0	1	0	1	0
At3g46206		0	1	3	4	0	1	3
At3g46840	1	0	0	1	1	0	0	
At3g46970	0	1	0	1	0	1	0	
At3g47520	0	2	0	2	0	2	0	
At3g49010	0	2	2	4	0	2	2	
At3g49240	1	0	0	1	1	0	0	
At3g52880	0	4	2	6	0	3	2	
At3g52990	1	0	1	2	1	0	1	
At3g54050	0	6	4	10	0	5	3	
At3g55330	0	1	0	1	0	1	0	
At3g55410	3	0	0	3	3	0	0	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.48 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Locus	Funktion	Peak – Spectra – Count			Sample – Spectra – Count		
		γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle	γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle
At3g55440	tpi (triosephosphate isomerase)	0	3	0	3	0	3
At3g55610	p5cs2 (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthase 2)	1	0	0	1	1	0
At3g55800	sbpase (sedoheptulose-bisphosphatase)	0	4	0	4	0	3
At3g56240	cch (copper chaperone), copper chaperone	0	0	1	1	0	0
At3g58610	ketol-acid reductoisomerase	0	4	2	6	0	3
At3g58730	vacuolar atp synthase subunit d (vatd)	2	1	0	3	1	1
At3g59480	pkfb-type carboxylate kinase family protein	0	1	0	1	0	1
At3g59760	oasc (o-acetylserine (thiol) lyase isoform c), atp binding	2	2	1	5	2	2
At3g60750	transketolase, putative	1	0	2	3	1	0
At3g62120	trna synthetase class ii (g, h, p and s) family protein	0	2	1	3	0	2
At3g63140	csp41a (chloroplast stem-loop binding protein)	0	1	0	1	0	1
At4g00570	malate oxidoreductase, putative	1	2	1	4	1	2
At4g01310	ribosomal protein l5 family protein	0	4	0	4	0	3
At4g01800	preprotein translocase seca subunit, putative	0	1	0	1	0	1
At4g01850	sam-2 (s-adenosylmethionine synthetase 2)	1	0	0	1	1	0
At4g04350	emb2369 (embryo defective 2369)	0	1	0	1	0	1
At4g04640	atpcl, enzyme regulator	0	2	0	2	0	2
At4g04910	nsf (n-ethylmaleimide sensitive factor)	1	1	0	2	1	1
At4g09800	rps18c (s18 ribosomal protein)	1	2	2	5	1	2
At4g10340	lhcb5 (light harvesting complex of photosystem ii 5)	0	1	0	1	0	1
At4g11150	tuf (vacuolar atp synthase subunit e1)	7	0	0	7	4	0
At4g11820	mvla1, acetyl-coa c-acetyltransferase	5	1	1	7	4	1
At4g13930	shn4 (serine hydroxymethyltransferase 4)	9	6	3	18	6	5
At4g13940	mee58 (maternal effect embryo arrest 58)	0	7	1	8	0	4
At4g14030	sbp1 (selenium-binding protein 1)	1	0	0	1	1	0
At4g14970	unknown protein	1	0	0	1	1	0
At4g15510	photosystem ii reaction center psbp family protein	0	1	0	1	0	1
At4g17300	ns1, asparagine-trna ligase	0	1	0	1	0	1
At4g18360	(s)-2-hydroxy-acid oxidase, peroxisomal	0	1	0	1	0	1
At4g18570	proline-rich family protein	0	0	1	1	0	1
At4g19710	bifunctional aspartate kinase/homoserine dehydrogenase	2	0	0	2	2	0
At4g20360	atrabelb (arabidopsis rab gtpase homolog elb), gtp binding / gtpase	11	7	5	23	6	5
At4g23710	vag2, hydrolase, acting on acid anhydrides	1	0	0	1	1	0
At4g23820	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) fp	0	1	0	1	0	1
At4g24190	shd (shepherd), atp binding / unfolded protein binding	1	3	0	4	1	2
At4g24620	pgi1 (phosphoglucose isomerase 1), glucose-6-phosphate isomerase	0	5	0	5	0	3
At4g24820	26s proteasome regulatory subunit, putative (rpn7)	2	2	0	4	2	2
At4g26900	at-hf (his hf), imidazoleglycerol-phosphate synthase	0	1	0	1	0	1
At4g27440	porb (protochlorophyllide oxidoreductase b)	0	0	1	1	0	0
At4g29670	thioredoxin family protein	0	1	0	1	0	1
At4g31300	pba1, endopeptidase/ peptidase/ threonine-type endopeptidase	0	1	0	1	0	1
At4g31520	sda1 family protein	0	1	0	1	0	1
At4g32180	atpauk2 (pantothenate kinase 2), pantothenate kinase	1	1	0	2	1	1

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.48 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Locus	Funktion	Peak – Spectra – Count			Sample – Spectra – Count			
		γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle	Total	γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle
At4g32290	unknown protein	1	0	0	1	1	0	0
At4g33010	atgldp1 (arabidopsis thaliana glycine decarboxylase p-protein 1)	1	0	0	1	1	0	0
At4g33090	apm1 (aminopeptidase m1), aminopeptidase	0	0	1	1	0	0	1
At4g33680	agd2 (aberrant growth and death 2)	0	2	1	3	0	2	1
At4g34450	coatmer gamma-2 subunit, putative / gamma-2 coat protein	0	2	0	2	0	2	0
At4g35090	cat2 (catalase 2), catalase	16	11	3	30	5	5	3
At4g35830	aconitate hydratase, cytoplasmic / citrate hydro-lyase / aconitase (aco)	0	2	1	3	0	2	1
At4g37340	cyp81d3, electron carrier/ heme binding	0	1	0	1	0	1	0
At4g37800	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase	0	3	0	3	0	3	0
At4g37910	mthsc70-1 (mitochondrial heat shock protein 70-1), atp binding	1	3	1	5	1	3	1
At4g38510	vacuolar atp synthase subunit b, putative / v-atpase b subunit	2	0	0	2	2	0	0
At4g38630	rpn10 (regulatory particle non-atpase 10), peptide receptor	2	0	0	2	2	0	0
At4g38800	atmtn1, catalytic/ methylthioadenosine nucleosidase	0	1	0	1	0	1	0
At4g38970	fructose-bisphosphate aldolase, putative	2	3	4	9	2	3	3
At4g39520	gtp-binding protein, putative	0	1	0	1	0	1	0
At4g39810	exonuclease/ nucleic acid binding	0	0	1	1	0	0	1
At4g39980	dhs1 (3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase 1)	4	0	0	4	2	0	0
At5g01410	rsr4 (reduced sugar response 4)	0	4	2	6	0	4	2
At5g02500	hsc70-1 (heat shock cognate protein 70-1), atp binding	1	1	0	2	1	1	0
At5g03300	adk2 (adenosine kinase 2), adenosine kinase/ copper ion binding / kinase	0	1	0	1	0	1	0
At5g03630	atmdar2, monodehydroascorbate reductase (nadh)	0	2	0	2	0	2	0
At5g04140	glu1 (glutamate synthase 1), glutamate synthase (ferredoxin)	0	5	1	6	0	4	1
At5g05620	gcp2 (gamma-tubulin complex protein 2), gtp binding / gtpase/ structural molecule	1	0	0	1	1	0	0
At5g05780	rpn8a (rp non-atpase subunit 8a)	1	0	0	1	1	0	0
At5g06460	atuba2, ubiquitin activating enzyme/ ubiquitin-protein ligase	0	1	0	1	0	1	0
At5g09550	rab gdp-dissociation inhibitor	0	2	2	4	0	2	2
At5g09660	pmdh2 (peroxisomal nad-malate dehydrogenase 2), malate dehydrogenase	0	5	2	7	0	4	2
At5g09810	act7 (actin 7), structural constituent of cytoskeleton	2	2	0	4	2	2	0
At5g10240	asn3 (asparagine synthetase 3), asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)	6	1	1	8	6	1	1
At5g13120	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin-type family protein	0	1	0	1	0	1	0
At5g14590	isocitrate dehydrogenase, putative / nadp+ isocitrate dehydrogenase	0	1	1	2	0	1	1
At5g15490	udp-glucose 6-dehydrogenase, putative	0	1	0	1	0	1	0
At5g16710	dhar3 (dehydroascorbate reductase 1)	0	1	0	1	0	1	0
At5g17380	pyruvate decarboxylase family protein	0	1	0	1	0	1	0
At5g19770	tua3, structural constituent of cytoskeleton	1	0	1	2	1	0	1
At5g19780	tua5, structural constituent of cytoskeleton	1	0	1	2	1	0	1
At5g20280	atsps1f (sucrose phosphate synthase 1f)	0	1	0	1	0	1	0
At5g20290	40s ribosomal protein s8 (rps8a)	0	3	2	5	0	3	2
At5g20890	chaperonin, putative	6	1	0	7	4	1	0
At5g20950	glycosyl hydrolase family 3 protein	2	2	0	4	1	2	0
At5g20980	atms3 (methionine synthase 3)	0	2	1	3	0	2	1
At5g22330	rin1 (resistance to pseudomonas syringae pv maculicola interactor 1)	1	0	0	1	1	0	0
At5g22620	phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase family protein	0	2	0	2	0	2	0

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.48 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Locus	Funktion	Peak – Spectra – Count			Sample – Spectra – Count			
		γ	$\gamma\Delta AB$	Kontrolle	Total	γ	$\gamma\Delta AB$	Kontrolle
At5g23120	hcf136, protein binding	1	3	1	5	1	3	1
At5g23860	tub8, structural constituent of cytoskeleton	10	2	0	12	6	2	0
At5g24060	unknown protein	0	1	0	1	0	1	0
At5g24150	sqp1, squalene monooxygenase	1	0	0	1	1	0	0
At5g26360	chaperonin, putative	2	0	0	2	2	0	0
At5g27470	seryl-trna synthetase / serine-trna ligase	0	1	0	1	0	1	0
At5g28840	gme (gdp-d-mannose 3',5'-epimerase)	0	18	6	24	0	6	4
At5g30510	rps1 (ribosomal protein s1)	0	1	2	3	0	1	2
At5g35630	gs2 (glutamine synthetase 2)	0	2	0	2	0	2	0
At5g37600	atgsr1, copper ion binding / glutamate-ammonia ligase	0	4	0	4	0	4	0
At5g37830	oxp1 (oxoprolinase 1)	0	1	0	1	0	1	0
At5g39320	udp-glucose 6-dehydrogenase	0	1	0	1	0	1	0
At5g40870	atuk/uprt1 (uridine kinase/uracil phosphoribosyltransferase 1)	1	0	0	1	1	0	0
At5g41520	40s ribosomal protein s10 (rps10b)	0	1	0	1	0	1	0
At5g43010	rpt4a, atpase	1	0	0	1	1	0	0
At5g43330	malate dehydrogenase, cytosolic	0	3	3	6	0	3	3
At5g43940	hot5 (sensitive to hot temperatures 5)	0	2	0	2	0	2	0
At5g46290	kas i (3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase i)	3	0	0	3	3	0	0
At5g47190	ribosomal protein l19 family protein	0	1	0	1	0	1	0
At5g47840	amk2 (adenosine monophosphate kinase)	0	1	0	1	0	1	0
At5g48230	acat2 (acetoacetyl-coa thiolase 2)	0	1	0	1	0	1	0
At5g48300	adg1 (adp glucose pyrophosphorylase 1)	0	2	3	5	0	1	3
At5g48880	pkt2 (peroxisomal 3-keto-acyl-coa thiolase 2)	0	0	1	1	0	0	1
At5g49460	acib-2 (atp citrate lyase subunit b 2), atp citrate synthase	0	3	1	4	0	3	1
At5g49910	cphsc70-2eat shock protein 70-2 (chloroplast heat shock protein 70-2)	1	0	0	1	1	0	0
At5g50850	mab1 (macci-bou), catalytic/ pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)	0	4	0	4	0	3	0
At5g50920	clpc1, atp binding / atp-dependent peptidase/ atpase	0	1	1	2	0	1	1
At5g51820	pgm (phosphoglucomutase), phosphoglucomutase	0	2	0	2	0	2	0
At5g51970	sorbitol dehydrogenase, putative / l-iditol 2-dehydrogenase	0	0	1	1	0	0	1
At5g52640	athsp90.1 (heat shock protein 90.1)	0	4	0	4	0	3	0
At5g53480	importin beta-2, putative	0	1	0	1	0	1	0
At5g54160	atomt1 (o-methyltransferase 1), caffeine o-methyltransferase	5	8	0	13	5	6	0
At5g54750	transport protein particle (trapp) component bet3, putative	3	0	0	3	2	0	0
At5g54770	thi1, protein homodimerization	6	2	0	8	3	2	0
At5g54940	eukaryotic translation initiation factor suil1, putative	1	0	0	1	1	0	0
At5g56030	hsp81-2 (heat shock protein 81-2), atp binding	0	1	1	2	0	1	1
At5g58290	rpt3 (regulatory particle triple-a atpase 3), atpase	2	1	0	3	2	1	0
At5g58330	malate dehydrogenase (nadp), chloroplast, putative	0	1	0	1	0	1	0
At5g59240	40s ribosomal protein s8 (rps8b)	0	3	0	3	0	3	0
At5g60390	elongation factor 1-alpha / ef-1-alpha	5	7	7	19	4	4	5
At5g62790	dxr (1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase)	0	1	0	1	0	1	0
At5g63420	emb2746 (embryo defective 2746), dna binding / catalytic/ hydrolase	1	0	0	1	1	0	0
At5g64140	rps28 (ribosomal protein s28), structural constituent of ribosome	2	2	2	6	2	2	2

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.48 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Anhang

Locus	Funktion	Peak – Spectra – Count			Sample – Spectra – Count			
		γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle	Total	γ	$\gamma_{\Delta AB}$	Kontrolle
At5g64300	atgch, 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase pck2 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 2) 2-oxoglutarate dehydrogenase e1 component 3-dehydroquinate synthase fmr1 (ferredoxin-nadp(+)-oxidoreductase 1) sdh1-1, atp binding / succinate dehydrogenase large subunit of rubisco	5	1	0	6	4	1	0
At5g65690		2	0	0	2	2	0	0
At5g65750		2	0	0	2	2	0	0
At5g66120		0	0	1	1	0	0	1
At5g66190		1	1	1	3	1	1	1
At5g66760		1	0	3	4	1	0	2
AtCg00020		0	1	0	1	0	1	0
AtCg00120		3	7	2	12	2	6	2
AtCg00160		1	0	0	1	1	0	0
AtCg00180		1	0	0	1	1	0	0
AtCg00280		0	1	1	2	0	1	1
AtCg00380		0	3	0	3	0	3	0
AtCg00480		8	36	11	55	5	6	5
AtCg00490		24	44	33	101	6	6	6
AtCg00580		0	1	0	1	0	1	0
AtCg00680		1	0	0	1	1	0	0
AtCg00720		1	0	0	1	1	0	0
AtCg00740		1	0	0	1	1	0	0
AtCg00780		0	2	1	3	0	1	1
AtCg00830	6	2	2	10	4	2	2	
AtCg00840	0	2	0	2	0	2	0	
AtCg01060	0	2	0	2	0	2	0	
AtCg01300	0	2	0	2	0	2	0	
AtCg01310	6	2	2	10	4	2	2	
REV_AT1G70750	0	1	0	1	0	1	0	
REV_AT2G47370	1	0	0	1	1	0	0	
REV_AT3G01900	0	1	0	1	0	1	0	
REV_AT3G29760	0	0	1	1	0	0	1	
REV_AT3G52120	0	1	0	1	0	1	0	
REV_AT4G01037	0	1	0	1	0	1	0	
REV_AT4G18340	1	0	0	1	1	0	0	
REV_AT4G35790	0	1	0	1	0	1	0	
REV_AT5G56170	0	0	1	1	0	0	1	
REV_AT5G56570	0	1	0	1	0	1	0	
REV_AT5G58460	0	0	1	1	0	0	1	
REV_AT5G65450	1	0	0	1	1	0	0	

Literaturverzeichnis

- [1] C. Yang, L. Xing, and Z. Zhai. Intermediate filaments in higher plant cells and their assembly in a cell-free system. *Protoplasma*, 171(1-2):44–54, 1992.
- [2] B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R.L. Jones. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists Rockville, MD, 2000.
- [3] H. C. Joshi and B. A. Palevitz. γ -Tubulin and microtubule organization in plants. *Trends Cell Biol.*, 6:41–44, February 1996. [PubMed:[15157488](#)].
- [4] Bruce Alberts. *Molecular Biology of the Cell*. Wiley-VCH, 5 edition, November 2007.
- [5] T. Nagata, Y. Nemoto, and S. Hasezawa. Tobacco BY-2 cell line as the HeLa cell in the biology of higher plants. *International Review of Cytology*, 132:1–30, 1992.
- [6] D. Menzel. Chasing coiled coils: intermediate filaments in plants. *Botanica acta*, 106(4):294–300, 1993.
- [7] Harvey Lodish, Arnold Berk, Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 4. edition, 2001.
- [8] M. Ostertag. Etablierung eines heterologen expressionssystems für γ -tubulin aus nicotiana tabacum. Master’s thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Institut für Allgemeine Botanik, 2008.
- [9] M. C. Ledbetter and K. R. Porter. A microtubule in plant cell fine structure. *J. Cell Biol.*, 19:239–250, October 1963. [PubMed:[19866635](#)].
- [10] H. P. Erickson. FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell*, 80:367–370, February 1995. [PubMed:[7859278](#)].
- [11] H. P. Erickson. FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trends Cell Biol.*, 7:362–367, September 1997. [PubMed:[17708981](#)].
- [12] B. Vulevic and J. J. Correia. Thermodynamic and structural analysis of microtubule assembly: the role of GTP hydrolysis. *Biophys. J.*, 72:1357–1375, March 1997. [PubMed:[9138581](#)].
- [13] H. W. Wang and E. Nogales. Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature*, 435:911–915, June 2005. [PubMed:[15959508](#)].
- [14] J. Lowe, H. Li, K. H. Downing, and E. Nogales. Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 313:1045–1057, November 2001. [PubMed:[11700061](#)].
- [15] A. Desai and T. J. Mitchison. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13:83–117, 1997. [PubMed:[9442869](#)].
- [16] D. R. Kellogg, M. Moritz, and B. M. Alberts. The centrosome and cellular organization. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:639–674, 1994. [PubMed:[7979251](#)].

- [17] A. Krebs, K. N. Goldie, and A. Hoenger. Structural rearrangements in tubulin following microtubule formation. *EMBO Rep.*, 6:227–232, March 2005. [PubMed:[15731766](#)].
- [18] G. O. Wasteneys. Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7:651–660, December 2004. [PubMed:[15491913](#)].
- [19] S. Gilroy, A. Trewavas, and S. Gilroy. Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:307–314, April 2001. [PubMed:[11283728](#)].
- [20] G. O. Wasteneys. Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J. Cell. Sci.*, 115:1345–1354, April 2002. [PubMed:[11896182](#)].
- [21] J.D. Pickett-Heaps. The evolution of the mitotic apparatus: an attempt at comparative ultrastructural cytology in dividing plant cells. *Cytobios*, 3:257–280, 1969.
- [22] K. C. Vaughn and J. D. Harper. Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. *Int. Rev. Cytol.*, 181:75–149, 1998. [PubMed:[9522456](#)].
- [23] C. Lloyd and J. Chan. Microtubules and the shape of plants to come. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5:13–22, January 2004. [PubMed:[14708006](#)].
- [24] D. Drykova, V. Cenklova, V. Sulimenko, J. Volc, P. Draber, and P. Binarova. Plant γ -tubulin interacts with $\alpha\beta$ -tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *Plant Cell*, 15:465–480, February 2003. [PubMed:[12566585](#)].
- [25] P. Binarova, V. Cenklova, J. Prochazkova, A. Doskocilova, J. Volc, M. Vrlik, and L. Bogre. γ -tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18:1199–1212, May 2006. [PubMed:[16603653](#)].
- [26] R. Heald, R. Tournebise, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, and E. Karsenti. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature*, 382:420–425, August 1996. [PubMed:[8684481](#)].
- [27] T. Murata, S. Sonobe, T. I. Baskin, S. Hyodo, S. Hasezawa, T. Nagata, T. Horio, and M. Hasebe. Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of γ -tubulin in higher plants. *Nat. Cell Biol.*, 7:961–968, October 2005. [PubMed:[16138083](#)].
- [28] C. E. Oakley and B. R. Oakley. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 338:662–664, April 1989. [PubMed:[2649796](#)].
- [29] P. G. McKean, S. Vaughan, and K. Gull. The extended tubulin superfamily. *J. Cell. Sci.*, 114:2723–2733, August 2001. [PubMed:[11683407](#)].
- [30] Y. Zheng, M. K. Jung, and B. R. Oakley. γ -tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell*, 65:817–823, May 1991. [PubMed:[1904010](#)].
- [31] M. Pastuglia, J. Azimzadeh, M. Goussot, C. Camilleri, K. Belcram, J. L. Evrard, A. C. Schmit, P. Guerche, and D. Bouchez. γ -tubulin is essential for microtubule organization and development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18:1412–1425, June 2006. [PubMed:[16698945](#)].
- [32] V. Stoppin-Mellet, C. Peter, and AM Lambert. Distribution of γ -tubulin in higher plant cells: cytosolic γ -tubulin is part of high molecular weight complexes. *Plant biology*, 2(3):290–296, 2000.

- [33] H. Aldaz, L. M. Rice, T. Stearns, and D. A. Agard. Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human γ -tubulin. *Nature*, 435:523–527, May 2005. [PubMed:[15917813](#)].
- [34] R. C. Edgar. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5:113, August 2004. [PubMed:[15318951](#)].
- [35] M. A. Marti-Renom, A. C. Stuart, A. Fiser, R. Sanchez, F. Melo, and A. Sali. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29:291–325, 2000. [PubMed:[10940251](#)].
- [36] B. R. Oakley, C. E. Oakley, Y. Yoon, and M. K. Jung. γ -tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 61:1289–1301, June 1990. [PubMed:[2194669](#)].
- [37] H. C. Joshi, M. J. Palacios, L. McNamara, and D. W. Cleveland. γ -tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature*, 356:80–83, March 1992. [PubMed:[1538786](#)].
- [38] B. R. Oakley. γ -Tubulin. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 49:27–54, 2000. [PubMed:[11005013](#)].
- [39] C. Wiese and Y. Zheng. A new function for the γ -tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat. Cell Biol.*, 2:358–364, June 2000. [PubMed:[10854327](#)].
- [40] U. Fuchs, B. Moepps, H. P. Maucher, and H. Schraudolf. Isolation, characterization and sequence of a cDNA encoding gamma-tubulin protein from the fern *Anemia phyllitidis* L. Sw. *Plant Mol. Biol.*, 23(3):595–603, November 1993. [PubMed:[8219092](#)].
- [41] B. Liu, H. C. Joshi, T. J. Wilson, C. D. Silflow, B. A. Palevitz, and D. P. Snustad. γ -Tubulin in *Arabidopsis*: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell*, 6:303–314, February 1994. [PubMed:[8148650](#)].
- [42] J. Schroder, K. Kautz, and W. Wernicke. γ -tubulin in barley and tobacco: sequence relationship and RNA expression patterns in developing leaves during mitosis and post-mitotic growth. *Plant Cell Physiol.*, 43:224–229, February 2002. [PubMed:[11867702](#)].
- [43] R. G. Burns. Analysis of the γ -tubulin sequences: implications for the functional properties of γ -tubulin. *J. Cell. Sci.*, 108 (Pt 6):2123–2130, June 1995. [PubMed:[7673333](#)].
- [44] Robert Lukes. *Charakterisierung spezieller pflanzlicher γ -Tubulin-Sequenzbereiche und Detektion potentieller Interaktionspartner mittels Yeast-two-Hybrid-System*. PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2008.
- [45] Sven Schlag. *Nukleation pflanzlicher Mikrotubuli: Expression relevanter Gene*. PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2008.
- [46] J. Frydman, E. Nimmesgern, H. Erdjument-Bromage, J. S. Wall, P. Tempst, and F. U. Hartl. Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO J.*, 11:4767–4778, December 1992. [PubMed:[1361170](#)].
- [47] J. Chen, J. L. Song, S. Zhang, Y. Wang, D. F. Cui, and C. C. Wang. Chaperone activity of DsbC. *J. Biol. Chem.*, 274:19601–19605, July 1999. [PubMed:[10391895](#)].

- [48] I. G. Macreadie, M. N. Jagadish, A. A. Azad, and P. R. Vaughan. Versatile cassettes designed for the copper inducible expression of proteins in yeast. *Plasmid*, 21:147–150, March 1989. [PubMed:[2500675](#)].
- [49] Mewes Böttner. *Die Expression humaner Proteine in der Hefe Pichia pastoris: Hochdurchsatzverfahren und bioinformatische Identifizierung von Expression-beeinflussenden Sequenzmerkmalen*. PhD thesis, Technische Universität, Berlin, 2004.
- [50] B. P. Curran and V. Bugeja. Basic investigations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.*, 313:1–13, 2006. [PubMed:[16118418](#)].
- [51] J. A. van den Berg, K. J. van der Laken, A. J. van Ooyen, T. C. Renniers, K. Rietveld, A. Schaap, A. J. Brake, R. J. Bishop, K. Schultz, and D. Moyer. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology (N.Y.)*, 8:135–139, February 1990. [PubMed:[1366557](#)].
- [52] S. Linder, M. Schliwa, and E. Kube-Grandenrath. Expression of *Reticulomyxa filosa* tubulins in *Pichia pastoris*: regulation of tubulin pools. *FEBS Lett.*, 417:33–37, November 1997. [PubMed:[9395069](#)].
- [53] T. Horio and B. R. Oakley. Expression of *Arabidopsis* γ -tubulin in fission yeast reveals conserved and novel functions of γ -tubulin. *Plant Physiol.*, 133:1926–1934, December 2003. [PubMed:[14605233](#)].
- [54] B. W. Swinkels, A. J. van Ooyen, and F. J. Bonekamp. The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64:187–201, 1993. [PubMed:[8092859](#)].
- [55] CJB Van der Vlugt-Bergmans and AJJ Van Ooyen. Expression cloning in *kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Techniques*, 13(1):87–92, 1999.
- [56] New England Biolabs. *K. lactis Protein Expression Kit - E 1000*. New England Biolabs, 2005.
- [57] J. D. Read, P. A. Colussi, M. B. Ganatra, and C. H. Taron. Acetamide selection of *Kluyveromyces lactis* cells transformed with an integrative vector leads to high-frequency formation of multicopy strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:5088–5096, August 2007. [PubMed:[17586678](#)].
- [58] A. L. Demain and P. Vaishnav. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.*, 27:297–306, 2009. [PubMed:[19500547](#)].
- [59] A. R. Kusnadi, Z. L. Nikolov, and J. A. Howard. Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnol. Bioeng.*, 56:473–484, December 1997. [PubMed:[18642268](#)].
- [60] H. Daniell, N. D. Singh, H. Mason, and S. J. Streatfield. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci.*, 14:669–679, December 2009. [PubMed:[19836291](#)].
- [61] G. An. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol.*, 79(2):568–570, October 1985. [PubMed:[16664453](#)].
- [62] D. Weigel and J. Glazebrook. *Arabidopsis: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Pr, 2002.

- [63] T. Yu, Y. S. Li, X. F. Chen, J. Hu, X. Chang, and Y. G. Zhu. Transgenic tobacco plants overexpressing cotton glutathione S-transferase (GST) show enhanced resistance to methyl viologen. *J. Plant Physiol.*, 160(11):1305–1311, November 2003. [PubMed:[14658382](#)].
- [64] R. P. Hellens, A. C. Allan, E. N. Friel, K. Bolitho, K. Grafton, M. D. Templeton, S. Karunairetnam, A. P. Gleave, and W. A. Laing. Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods*, 1:13, 2005. [PubMed:[16359558](#)].
- [65] S. Marillonnet, C. Thoeringer, R. Kandzia, V. Klimyuk, and Y. Gleba. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol.*, 23:718–723, June 2005. [PubMed:[15883585](#)].
- [66] Kai Terpe. Protein-Affinität-Tags. *BIOspektrum*, 4:389–391, 2007.
- [67] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, and G. Belfrage. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258:598–599, December 1975. [PubMed:[1678](#)].
- [68] J. Van Leene, E. Witters, D. Inze, and G. De Jaeger. Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends Plant Sci.*, 13:517–520, October 2008. [PubMed:[18771946](#)].
- [69] H. Vaucheret, C. Beclin, and M. Fagard. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell. Sci.*, 114(Pt 17):3083–3091, September 2001. [PubMed:[11590235](#)].
- [70] O. Voinnet, S. Rivas, P. Mestre, and D. Baulcombe. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.*, 33:949–956, March 2003. [PubMed:[12609035](#)].
- [71] E. J. Chapman, A. I. Prokhnevsky, K. Gopinath, V. V. Dolja, and J. C. Carrington. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.*, 18:1179–1186, May 2004. [PubMed:[15131083](#)].
- [72] D. Pignatta, P. Kumar, M. Turina, A. Dandekar, and B. W. Falk. Quantitative analysis of efficient endogenous gene silencing in *Nicotiana benthamiana* plants using tomato bushy stunt virus vectors that retain the capsid protein gene. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 20:609–618, June 2007. [PubMed:[17555269](#)].
- [73] C. Kotakis, N. Vrettos, D. Kotsis, M. Tsagris, K. Kotzabasis, and K. Kalantidis. Light intensity affects RNA silencing of a transgene in *Nicotiana benthamiana* plants. *BMC Plant Biol.*, 10:220, 2010. [PubMed:[20939918](#)].
- [74] A. J. Ytterberg and O. N. Jensen. Modification-specific proteomics in plant biology. *J Proteomics*, 73(11):2249–2266, October 2010. [PubMed:[20541636](#)].
- [75] Fermentas. *CloneJET PCR Cloning Kit*, k1231, k1232 edition, 2010.
- [76] Promega. *pGEM-T Vector System*, 2010.
- [77] Novagen. *pET System Manual*, 11. tb055 edition, January 2006.
- [78] Novagen. *pET-44a-c(+)* Vector, tb330 rev. a0502 edition, 2008.

- [79] EMBL. Bacterial Vector Database, http://www.embl-hamburg.de/~geerlof/webPP/vectordb/bact_vectors/, 2010.
- [80] M. D. Curtis and U. Grossniklaus. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.*, 133:462–469, October 2003. [PubMed:[14555774](#)].
- [81] J. Zuo, Q. W. Niu, and N. H. Chua. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.*, 24:265–273, October 2000. [PubMed:[11069700](#)].
- [82] M. Padidam, V. S. Reddy, R. N. Beachy, and C. M. Fauquet. Molecular characterization of a plant mitochondrial chaperone GrpE. *Plant Mol. Biol.*, 39:871–881, March 1999. [PubMed:[10344193](#)].
- [83] P. Hajdukiewicz, Z. Svab, and P. Maliga. The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.*, 25:989–994, September 1994. [PubMed:[7919218](#)].
- [84] R. Sauermost and D. Freudig. *Lexikon der Biologie*. Spektrum, Akad. Verl., 2006.
- [85] Carl Roth. *Antibiotika*. Carl Roth, November 2009.
- [86] AppliChem. *Antibiotika und Antimykotika in Life Sciences*. AppliChem, June 2011.
- [87] Robert Koch Institut. Stellungnahme der ZKBS zur Biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen, 2002.
- [88] S. G. Grant, J. Jessee, F. R. Bloom, and D. Hanahan. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:4645–4649, June 1990. [PubMed:[2162051](#)].
- [89] Invitrogen. *One Shot ccdB Survival 2 T1R Chemically Competent Cells*. Invitrogen, May 2008.
- [90] F. W. Studier and B. A. Moffatt. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, 189:113–130, May 1986. [PubMed:[3537305](#)].
- [91] H. Jeong, V. Barbe, C. H. Lee, D. Vallenet, D. S. Yu, S. H. Choi, A. Couloux, S. W. Lee, S. H. Yoon, L. Cattolico, C. G. Hur, H. S. Park, B. Segurens, S. C. Kim, T. K. Oh, R. E. Lenski, F. W. Studier, P. Daegelen, and J. F. Kim. Genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.*, 394:644–652, December 2009. [PubMed:[19786035](#)].
- [92] R.J. Mayer, A.J. Ciechanover, and Martin. Rechsteiner. *Protein degradation*. Wiley-vch Weinheim, 2004.
- [93] Novagen. *Host Strain Competent Cell Selection Guide*, 2002.
- [94] Novagen. *Competent Cells*, tb009 rev.f0104 edition, 2004.
- [95] A. Hoekema, PR Hirsch, PJJ Hooykaas, and RA Schilperoort. A binary plant vector strategy based on separation of vir-and t-region of the agrobacterium tumefaciens ti-plasmid. *Nature*, 303:179–180, 1983.

- [96] B. S. de Pater, R. J. de Kam, J. H. Hoge, and R. A. Schilperoort. Effects of mutations in the TATA box region of the *Agrobacterium* T-cyt gene on its transcription in plant tissues. *Nucleic Acids Res.*, 15:8283–8292, October 1987. [PubMed:[3671084](#)].
- [97] R. Hellens, P. Mullineaux, and H. Klee. Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.*, 5:446–451, October 2000. [PubMed:[11044722](#)].
- [98] M. Holsters, B. Silva, F. Van Vliet, C. Genetello, M. De Block, P. Dhaese, A. Depicker, D. Inze, G. Engler, and R. Villarroel. The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid*, 3:212–230, March 1980. [PubMed:[6100894](#)].
- [99] C. Koncz and J. Schell. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet*, 204:383–396, 1986.
- [100] E. Mansur, C. Lacorte, and W. R. Krul. Peanut transformation. *Methods Mol. Biol.*, 44:87–100, 1995. [PubMed:[7581687](#)].
- [101] N. Van Larebeke, G. Engler, M. Holsters, S. Van den Elsacker, I. Zaenen, R. A. Schilperoort, and J. Schell. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, 252:169–170, November 1974. [PubMed:[4419109](#)].
- [102] R. Deblaere, B. Bytebier, H. De Greve, F. Deboeck, J. Schell, M. Van Montagu, and J. Leemans. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.*, 13:4777–4788, July 1985. [PubMed:[4022773](#)].
- [103] G. Bertani. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 62:293–300, September 1951. [PubMed:[14888646](#)].
- [104] J.H. Miller. *Experiments in molecular genetics*. Cold Springs Harbor, New York, 1972.
- [105] S. N. Cohen, A. C. Chang, and L. Hsu. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69:2110–2114, August 1972. [PubMed:[4559594](#)].
- [106] D. Hanahan. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166:557–580, June 1983. [PubMed:[6345791](#)].
- [107] B. Pope and H. M. Kent. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 24:536–537, February 1996. [PubMed:[8602370](#)].
- [108] K. Stankevicius, P. Povilionis, A. Lubys, S. Menkevicius, and A. Janulaitis. Cloning and characterization of the unusual restriction-modification system comprising two restriction endonucleases and one methyltransferase. *Gene*, 157:49–53, May 1995. [PubMed:[7607524](#)].
- [109] R. Höfgen and L. Willmitzer. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.*, 16:9877, October 1988. [PubMed:[3186459](#)].
- [110] K. Kato, T. Matsumoto, A. Koiwai, S. Mizusaki, K. Nishida, M. Noguchi, and E. Tamaki. Fermentation technology today. *Kyoto: Soc. Fermentation Technol*, pages 689–695, 1972.
- [111] EM Linsmaier and F. Skoog. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologica plantarum*, 1965.

- [112] T. Murashige and F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant*, 15:473–497, 1962.
- [113] J. P. Sweetman, C. Chu, N. Qu, A. J. Greenland, U. Sonnewald, and I. Jepson. Ethanol vapor is an efficient inducer of the alc gene expression system in model and crop plant species. *Plant Physiol.*, 129:943–948, July 2002. [PubMed:[12114549](#)].
- [114] S. J. Clough and A. F. Bent. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16:735–743, December 1998. [PubMed:[10069079](#)].
- [115] C. Koncz, N.H. Chua, J. Schell, et al. Methods in arabidopsis research. *Methods in Arabidopsis research.*, 1992.
- [116] D.R. Hoagland and DI Arnon. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 98(1):1105–1114, 1938.
- [117] Leu+Gyax AG. *Silwet L-77*. Leu+Gyax AG, 2006.
- [118] Ludovic Bonin and Gerard Citron. L’effi cacité des dernières spécialités . *Perspectives Agricoles*, 343:38–42, 2008.
- [119] M. J. Kim, K. Baek, and C. M. Park. Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.*, 28:1159–1167, August 2009. [PubMed:[19484242](#)].
- [120] J. W. Park, S. Faure-Rabasse, M. A. Robinson, B. Desvoyes, and H. B. Scholthof. The multifunctional plant viral suppressor of gene silencing P19 interacts with itself and an RNA binding host protein. *Virology*, 323:49–58, May 2004. [PubMed:[15165818](#)].
- [121] Y. Yang, R. Li, and M. Qi. In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J.*, 22(6):543–551, June 2000. [PubMed:[10886774](#)].
- [122] M. Wydro, E. Kozubek, and P. Lehmann. Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochim. Pol.*, 53:289–298, 2006. [PubMed:[16582986](#)].
- [123] J. Sambrook and D.W. Russell. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL press, 2001.
- [124] W. Eckert and J. Kartenbeck. *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*. Springer, 1. edition, 2008.
- [125] G. Schrimpf and A. Aigner. *Gentechnische Methoden*. Spektrum, Akad. Verl., 2002.
- [126] Friedrich Lottspeich, Joachim W. Engels, and Lay S. Zettlmeier. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, 2. edition, Dezember 2008.
- [127] C. Mülhardt. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, 2008.
- [128] W. Holleman and E. Wiberg. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie, 101. Auflage*. W. de Gruyter, 1995.
- [129] P. Schopfer, A. Brennicke, and H. Mohr. *Pflanzenphysiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2006.

-
- [130] A. Fallert-Müller. *Lexikon der Biochemie*. Spektrum Akad. Verl., 2000.
- [131] P. Sauer, M. Muller, and J. Kang. Quantitation of dna. *Qiagen News*, 2:23–26, 1998.
- [132] W. W. Wilfinger, K. Mackey, and P. Chomczynski. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22:474–476, March 1997. [PubMed:[9067025](#)].
- [133] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350–1354, December 1985. [PubMed:[2999980](#)].
- [134] H. J. Müller. *PCR-Polymerase-Kettenreaktion*. Spektrum Akademischer Verlag, 2001.
- [135] K. J. Livak and T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25:402–408, December 2001. [PubMed:[11846609](#)].
- [136] M.W. Pfaffl. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1(10):92–5, 2004.
- [137] F. Ishige, M. Takaichi, R. Foster, N.H. Chua, and K. Oeda. A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocot plants. *The Plant Journal*, 18(4):443–448, 1999.
- [138] D. B. Hall and K. Struhl. The VP16 activation domain interacts with multiple transcriptional components as determined by protein-protein cross-linking in vivo. *J. Biol. Chem.*, 277:46043–46050, November 2002. [PubMed:[12297514](#)].
- [139] J. Zuo and N. H. Chua. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11:146–151, April 2000. [PubMed:[10753773](#)].
- [140] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, August 1970. [PubMed:[5432063](#)].
- [141] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254, May 1976. [PubMed:[942051](#)].
- [142] O. Warburg and W. Christian. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Naturwissenschaften*, 29(39):589–590, 1941.
- [143] J. Falbe and M. Regitz. *Römpf Chemie Lexikon. 9. erweiterte und neubearbeitete Auflage*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 1989.
- [144] H. Rehm and T. Letzel. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- [145] D. M. Neville. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.*, 246:6328–6334, October 1971. [PubMed:[5127429](#)].
- [146] M. Manning and W. Colon. Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward β -sheet structure. *Biochemistry*, 43:11248–11254, September 2004. [PubMed:[15366934](#)].

- [147] D. Kang, Y.S. Ghoo, M. Suh, and C. Kang. Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *BULLETIN-KOREAN CHEMICAL SOCIETY*, 23(11):1511–1512, 2002.
- [148] G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, and P. G. Righetti. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25:1327–1333, May 2004. [PubMed:[15174055](#)].
- [149] J. Kyhse-Andersen. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 10:203–209, December 1984. [PubMed:[6530509](#)].
- [150] C. Haan and I. Behrmann. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J. Immunol. Methods*, 318:11–19, January 2007. [PubMed:[17141265](#)].
- [151] J. C. Sanchez, F. Ravier, C. Pasquali, S. Frutiger, N. Paquet, B. Bjellqvist, D. F. Hochstrasser, and G. J. Hughes. Improving the detection of proteins after transfer to polyvinylidene difluoride membranes. *Electrophoresis*, 13:715–717, 1992. [PubMed:[1281090](#)].
- [152] E. Engvall and P. Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8:871–874, September 1971. [PubMed:[5135623](#)].
- [153] E. S. Bos, A. A. van der Doelen, N. van Rooy, and A. H. Schuurs. 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine as an Ames test negative chromogen for horse-radish peroxidase in enzyme-immunoassay. *J Immunoassay*, 2:187–204, 1981. [PubMed:[7047570](#)].
- [154] G. H. Lathe and C. R. Ruthven. The separation of substances on the basis of their molecular weights, using columns of starch and water. *Biochem. J.*, 60:xxxiv, August 1955. [PubMed:[13249976](#)].
- [155] G. H. Lathe and C. R. Ruthven. The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water. *Biochem. J.*, 62:665–674, April 1956. [PubMed:[13315231](#)].
- [156] J. Porath and P. Flodin. Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, 183:1657–1659, June 1959. [PubMed:[13666849](#)].
- [157] J.C. Janson and L. Rydén. *Protein purification: Principles, high-resolution methods, and applications*. Wiley-VCH, 1st edition, 1989.
- [158] Amersham Biosciences. Gel filtration - principles and methods. Technical report, 2002.
- [159] B. Thiede, S. Lamer, J. Mattow, F. Siejak, C. Dimmler, T. Rudel, and P. R. Jungblut. Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14:496–502, 2000. [PubMed:[10717661](#)].
- [160] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen, and M. Mann. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 1:2856–2860, 2006. [PubMed:[17406544](#)].

- [161] M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947–2948, November 2007. [PubMed:[17846036](#)].
- [162] P. Rice, I. Longden, and A. Bleasby. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.*, 16:276–277, June 2000. [PubMed:[10827456](#)].
- [163] F. Abascal, R. Zardoya, and D. Posada. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 21:2104–2105, May 2005. [PubMed:[15647292](#)].
- [164] M. Gouy, S. Guindon, and O. Gascuel. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.*, 27:221–224, February 2010. [PubMed:[19854763](#)].
- [165] M. Fuhrmann, A. Hausherr, L. Ferbitz, T. Schodl, M. Heitzer, and P. Hegemann. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol. Biol.*, 55(6):869–881, August 2004. [PubMed:[15604722](#)].
- [166] J. Zuegge, M. Ebeling, and G. Schneider. H-BloX: visualizing alignment block entropies. *J. Mol. Graph. Model.*, 19:304–306, 2001. [PubMed:[11449568](#)].
- [167] G. E. Crooks, G. Hon, J. M. Chandonia, and S. E. Brenner. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.*, 14:1188–1190, June 2004. [PubMed:[15173120](#)].
- [168] M.D. Abramoff, P.J. Magalhaes, and S.J. Ram. Image processing with imagej. *Biophotonics international*, 11(7):36–42, 2004.
- [169] A. Moll, A. Hildebrandt, H. P. Lenhof, and O. Kohlbacher. BALLView: an object-oriented molecular visualization and modeling framework. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 19:791–800, November 2005. [PubMed:[16470421](#)].
- [170] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25:1605–1612, October 2004. [PubMed:[15264254](#)].
- [171] T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, J. A. McCammon, and N. A. Baker. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.*, 32:W665–667, July 2004. [PubMed:[15215472](#)].
- [172] J. Stone. An efficient library for parallel ray tracing and animation. Master’s thesis, Computer Science Department, University of Missouri-Rolla, 1998.
- [173] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, 14:33–38, February 1996. [PubMed:[8744570](#)].
- [174] V. B. Chen, W. B. Arendall, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66:12–21, January 2010. [PubMed:[20057044](#)].

- [175] I. W. Davis, A. Leaver-Fay, V. B. Chen, J. N. Block, G. J. Kapral, X. Wang, L. W. Murray, W. B. Arendall, J. Snoeyink, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.*, 35:W375–383, July 2007. [PubMed:[17452350](#)].
- [176] I. W. Davis, L. W. Murray, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. *Nucleic Acids Res.*, 32:W615–619, July 2004. [PubMed:[15215462](#)].
- [177] D. Schneidman-Duhovny, Y. Inbar, R. Nussinov, and H. J. Wolfson. Geometry-based flexible and symmetric protein docking. *Proteins*, 60:224–231, August 2005. [PubMed:[15981269](#)].
- [178] L. A. Kelley and M. J. Sternberg. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*, 4:363–371, 2009. [PubMed:[19247286](#)].
- [179] S. S. Sheik, P. Sundararajan, A. S. Hussain, and K. Sekar. Ramachandran plot on the web. *Bioinformatics*, 18:1548–1549, November 2002. [PubMed:[12424132](#)].
- [180] D. Baker and A. Sali. Protein structure prediction and structural genomics. *Science*, 294:93–96, October 2001. [PubMed:[11588250](#)].
- [181] S. Henikoff and J. G. Henikoff. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:10915–10919, November 1992. [PubMed:[1438297](#)].
- [182] S. B. Needleman and C. D. Wunsch. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.*, 48:443–453, March 1970. [PubMed:[5420325](#)].
- [183] S. Karlin and S. F. Altschul. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:2264–2268, March 1990. [PubMed:[2315319](#)].
- [184] A. Hansen. *Bioinformatik: Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler*. Birkhauser, 2004.
- [185] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402, September 1997. [PubMed:[9254694](#)].
- [186] L. M. Rice, E. A. Montabana, and D. A. Agard. The lattice as allosteric effector: structural studies of $\alpha\beta$ - and γ -tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105:5378–5383, April 2008. [PubMed:[18388201](#)].
- [187] J. D. Thompson, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25:4876–4882, December 1997. [PubMed:[9396791](#)].
- [188] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.*, 7:95–99, July 1963. [PubMed:[13990617](#)].
- [189] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Arendall, P. I. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. Structure validation by $C\alpha$ geometry: ϕ, ψ and $C\beta$ deviation. *Proteins*, 50:437–450, February 2003. [PubMed:[12557186](#)].

- [190] R. M. Bennett-Lovsey, A. D. Herbert, M. J. Sternberg, and L. A. Kelley. Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins*, 70:611–625, February 2008. [PubMed:[17876813](#)].
- [191] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, and J. A. McCammon. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:10037–10041, August 2001. [PubMed:[11517324](#)].
- [192] M. Totrov and R. Abagyan. Rapid boundary element solvation electrostatics calculations in folding simulations: successful folding of a 23-residue peptide. *Biopolymers*, 60:124–133, 2001. [PubMed:[11455546](#)].
- [193] K.E.V. Holde, WC Johnson, and PS Ho. *Principles of physical biochemistry*. Prentice-Hall, New Jersey, 2005.
- [194] M. Gouy. Sur la constitution de la charge electrique a la surface d'un electrolyte. 1910.
- [195] D.L. Chapman. Li. a contribution to the theory of electrocapillarity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 25(148):475–481, 1913.
- [196] F. Fogolari, A. Brigo, and H. Molinari. The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. *J. Mol. Recognit.*, 15:377–392, 2002. [PubMed:[12501158](#)].
- [197] R.E. Bank and M. Holst. A new paradigm for parallel adaptive meshing algorithms. *SIAM Journal on Scientific Computing*, 22:1411, 2000.
- [198] E.H. Simpson. Measurement of diversity. *Nature*, 163(4148):688–688, 1949.
- [199] A. Sanchez-Flores, E. Perez-Rueda, and L. Segovia. Protein homology detection and fold inference through multiple alignment entropy profiles. *Proteins*, 70:248–256, January 2008. [PubMed:[17671981](#)].
- [200] S. Linder, M. Schliwa, and E. Kube-Grandenrath. Expression of Reticulomyxa filosa α - and β -tubulins in Escherichia coli yields soluble and partially correctly folded material. *Gene*, 212:87–94, May 1998. [PubMed:[9661667](#)].
- [201] Daniel Weiß. Versuche zur optimierung der heterologen Expression von γ -Tubulin zur Strukturaufklärung. Master's thesis, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2009.
- [202] Esther Göbel. Strukturmodellierung und Optimierungsversuche zur heterologen Expression von γ -Tubulin aus *Nicotiana tabacum*. Master's thesis, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2009.
- [203] J. Arnau, C. Lauritzen, G. E. Petersen, and J. Pedersen. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.*, 48:1–13, July 2006. [PubMed:[16427311](#)].
- [204] M. Carson, D. H. Johnson, H. McDonald, C. Brouillette, and L. J. Delucas. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 63:295–301, March 2007. [PubMed:[17327666](#)].

- [205] J. J. Lichty, J. L. Malecki, H. D. Agnew, D. J. Michelson-Horowitz, and S. Tan. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr. Purif.*, 41:98–105, May 2005. [PubMed:[15802226](#)].
- [206] N. H. Tolia and L. Joshua-Tor. Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nat. Methods*, 3:55–64, January 2006. [PubMed:[16369554](#)].
- [207] J. G. Thomas and F. Baneyx. Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 11:289–296, December 1997. [PubMed:[9425634](#)].
- [208] Katja Siegers. Biosynthese von Tubulin. *BIOspektrum*, 4:354–355, 2006.
- [209] David Waugh. MBP Fusion FAQ, 2003.
- [210] D. M. Francis and R. Page. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 5:1–29, August 2010. [PubMed:[20814932](#)].
- [211] D. L. Wilkinson and R. G. Harrison. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N.Y.)*, 9:443–448, May 1991. [PubMed:[1367308](#)].
- [212] Alexandra Fischer. Transiente Überexpression von pflanzlichem γ -Tubulin in *Nicotiana benthamiana* und anschließende Purifikation. Master’s thesis, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2011.
- [213] Marcus Wolf. Versuche zur isolation genomischer γ -tubulin sequenzen und expression entsprechender cDNA von *Nicotiana tabacum* in einem bakteriellen system. Master’s thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Institut für Allgemeine Botanik, 2008.
- [214] M. Deutsch and M. Long. Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Res.*, 27:3219–3228, August 1999. [PubMed:[10454621](#)].
- [215] L. Zhu, Y. Zhang, W. Zhang, S. Yang, J. Q. Chen, and D. Tian. Patterns of exon-intron architecture variation of genes in eukaryotic genomes. *BMC Genomics*, 10:47, 2009. [PubMed:[19166620](#)].
- [216] A. B. Rose. Intron-mediated regulation of gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 326:277–290, 2008. [PubMed:[18630758](#)].
- [217] Y. Y. Yamamoto, H. Ichida, T. Abe, Y. Suzuki, S. Sugano, and J. Obokata. Differentiation of core promoter architecture between plants and mammals revealed by LDSS analysis. *Nucleic Acids Res.*, 35:6219–6226, 2007. [PubMed:[17855401](#)].
- [218] H. A. Luetcke, K. C. Chow, F. S. Mickel, K. A. Moss, H. F. Kern, and G. A. Scheele. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.*, 6:43–48, January 1987. [PubMed:[3556162](#)].
- [219] G. Pesole, C. Gissi, G. Grillo, F. Licciulli, S. Liuni, and C. Saccone. Analysis of oligonucleotide AUG start codon context in eukaryotic mRNAs. *Gene*, 261:85–91, December 2000. [PubMed:[11164040](#)].
- [220] D. R. Cavener and S. C. Ray. Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acids Res.*, 19:3185–3192, June 1991. [PubMed:[1905801](#)].

- [221] F. Guerineau, A. Lucy, and P. Mullineaux. Effect of two consensus sequences preceding the translation initiator codon on gene expression in plant protoplasts. *Plant Mol. Biol.*, 18:815–818, February 1992. [PubMed:[1373083](#)].
- [222] C. P. Joshi, H. Zhou, X. Huang, and V. L. Chiang. Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol. Biol.*, 35:993–1001, December 1997. [PubMed:[9426620](#)].
- [223] J. A. Lindbo. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC Biotechnol.*, 7:52, 2007. [PubMed:[17723150](#)].
- [224] J. A. Lindbo. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiol.*, 145:1232–1240, December 2007. [PubMed:[17720752](#)].
- [225] M. Lukaszewicz, M. Feuermann¹, B. Jerouville, A. Stas, and M. Boutry. In vivo evaluation of the context sequence of the translation initiation codon in plants. *Plant Sci.*, 154:89–98, May 2000. [PubMed:[10725562](#)].
- [226] K. Eichler. Optimierung eines transfektionssystems zur promotoranalyse eines pflanzlichen γ -tubulins. Master’s thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2009.
- [227] Y. Gleba, V. Klimyuk, and S. Marillonnet. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:134–141, April 2007. [PubMed:[17368018](#)].
- [228] M.R. Sanderson and J. Skelly. *Macromolecular crystallography: conventional and high-throughput methods*. Oxford University Press, USA, 2007.
- [229] T. Z. Berardini, S. Mundodi, L. Reiser, E. Huala, M. Garcia-Hernandez, P. Zhang, L. A. Mueller, J. Yoon, A. Doyle, G. Lander, N. Moseyko, D. Yoo, I. Xu, B. Zoeckler, M. Montoya, N. Miller, D. Weems, and S. Y. Rhee. Functional annotation of the Arabidopsis genome using controlled vocabularies. *Plant Physiol.*, 135(2):745–755, June 2004. [PubMed:[15173566](#)].
- [230] M. Moritz, M. B. Braunfeld, V. Guenebaut, J. Heuser, and D. A. Agard. Structure of the γ -tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.*, 2:365–370, June 2000. [PubMed:[10854328](#)].
- [231] J.M. Fernandez and J.P. Hoeffler. *Gene expression systems: using nature for the art of expression*. Academic Press, 1998.
- [232] V. Gomord and L. Faye. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7:171–181, April 2004. [PubMed:[15003218](#)].
- [233] C. M. Dobson and R. J. Ellis. Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *EMBO J.*, 17(18):5251–5254, September 1998. [PubMed:[9736604](#)].
- [234] H. Lilie, E. Schwarz, and R. Rudolph. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9(5):497–501, October 1998. [PubMed:[9821278](#)].
- [235] G. W. Lubega, T. G. Geary, R. D. Klein, and R. K. Prichard. Expression of cloned β -tubulin genes of *Haemonchus contortus* in *Escherichia coli*: interaction of recombinant β -tubulin with native tubulin and mebendazole. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 62:281–292, December 1993. [PubMed:[8139621](#)].
- [236] Natalia Oganessian, Sung-Hou Kim, and Rosalind Kim. On-column Chemical Refolding of Proteins. *PharmaGenomics*, 4:22–26, 2004.

- [237] K. Siegers, B. Bolter, J. P. Schwarz, U. M. Bottcher, S. Guha, and F. U. Hartl. TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes. *EMBO J.*, 22:5230–5240, October 2003. [PubMed:[14517260](#)].
- [238] S. Geissler, K. Siegers, and E. Schiebel. A novel protein complex promoting formation of functional α - and γ -tubulin. *EMBO J.*, 17:952–966, February 1998. [PubMed:[9463374](#)].
- [239] F. Baneyx. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(5):411–421, October 1999. [PubMed:[10508629](#)].
- [240] F. Baneyx and M. Mujacic. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.*, 22:1399–1408, November 2004. [PubMed:[15529165](#)].
- [241] D. W. Hollomon, J. A. Butters, H. Barker, and L. Hall. Fungal β -tubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42:2171–2173, September 1998. [PubMed:[9736529](#)].
- [242] E. R. LaVallie, E. A. DiBlasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel, and J. M. McCoy. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N.Y.)*, 11:187–193, February 1993. [PubMed:[7763371](#)].
- [243] B. Dujon, D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. De Montigny, C. Marck, C. Neugeglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J. M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisrame, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. De Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J. M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G. F. Richard, M. L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J. L. Souciet. Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430(6995):35–44, July 2004. [PubMed:[15229592](#)].
- [244] D. Drew, S. Newstead, Y. Sonoda, H. Kim, G. von Heijne, and S. Iwata. GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Protoc*, 3:784–798, 2008. [PubMed:[18451787](#)].
- [245] T. Abe and T. Hashimoto. Altered microtubule dynamics by expression of modified α -tubulin protein causes right-handed helical growth in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant J.*, 43:191–204, July 2005. [PubMed:[15998306](#)].
- [246] C.H. Schein. Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Nature Biotechnology*, 7(11):1141–1149, 1989.
- [247] Margret Einarson. Detection of protein protein interactions using the gst fusion protein pull-down technique. *Nature Methods*, pages 275–276, 2004.
- [248] M. J. Dubin, C. Bowler, and G. Benvenuto. A modified Gateway cloning strategy for overexpressing tagged proteins in plants. *Plant Methods*, 4:3, 2008. [PubMed:[18211686](#)].
- [249] J. Zuo, Q. W. Niu, N. Nishizawa, Y. Wu, B. Kost, and N. H. Chua. KORRIGAN, an *Arabidopsis* endo-1,4-beta-glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. *Plant Cell*, 12(7):1137–1152, July 2000. [PubMed:[10899980](#)].

- [250] V. T. Marchesi and N. Ngo. In vitro assembly of multiprotein complexes containing α , β , and γ tubulin, heat shock protein HSP70, and elongation factor 1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:3028–3032, April 1993. [PubMed:[8464918](#)].
- [251] W. Qiu, J. W. Park, and H. B. Scholthof. Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 15(3):269–280, March 2002. [PubMed:[11952130](#)].
- [252] S. D. Chuong, A. G. Good, G. J. Taylor, M. C. Freeman, G. B. Moorhead, and D. G. Muench. Large-scale identification of tubulin-binding proteins provides insight on subcellular trafficking, metabolic channeling, and signaling in plant cells. *Mol. Cell Proteomics*, 3:970–983, October 2004. [PubMed:[15249590](#)].
- [253] Kay Terpe. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied and Microbiology and Biotechnology*, 72(2):211–222, September 2006.
- [254] S. D. Chuong, R. T. Mullen, and D. G. Muench. Identification of a rice RNA- and microtubule-binding protein as the multifunctional protein, a peroxisomal enzyme involved in the beta -oxidation of fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 277(4):2419–2429, January 2002. [PubMed:[11706039](#)].
- [255] S. Klapperich. Suche nach interaktionspartnern pflanzlichen γ -tubulins über den a/b-peptidbereich unter anwendung des yeast-two-hybrid-systems. Master’s thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2007.
- [256] D.G.M.D.G. Muench and N.I.P. Nam-Il Park. Messages on the move: the role of the cytoskeleton in mrna localization and translation in plant cells this review is one of a selection of papers published in the special issue on plant cell biology. *Botany*, 84(4):572–580, 2006.
- [257] R. K. Mishra, P. Chakraborty, A. Arnaoutov, B. M. Fontoura, and M. Dasso. The Nup107-160 complex and γ -TuRC regulate microtubule polymerization at kinetochores. *Nat. Cell Biol.*, 12:164–169, February 2010. [PubMed:[20081840](#)].
- [258] Z. Kong, T. Hotta, Y. R. Lee, T. Horio, and B. Liu. The γ -tubulin complex protein GCP4 is required for organizing functional microtubule arrays in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 22:191–204, January 2010. [PubMed:[20118227](#)].
- [259] A. Varshney, F. Jr. Brooks, and W.V. Wright. Linearly scalable computation of smooth molecular surfaces. *IEEE Computer Graphics and Applications*, 1994.

Abbildungsverzeichnis

1.1. Haupt-Filamenttypen des Cytoskeletts	3
1.2. Struktur eines Mikrotubulus und seiner Untereinheiten	5
1.3. Dynamische Instabilität eines Mikrotubulus	6
1.4. Organisation der Mikrotubuli im Laufe des Zellzyklus bei höheren Pflanzen	7
1.5. Tubulinpolymerisation ausgehend vom γ -Tubulin-Ringkomplex	9
1.6. Modell der Mikrotubulinukleation durch Translokation des gTuRC	10
2.7. PPF-D-Verteilung in den Pflanzenanzuchtsräumen	26
2.8. Induktionsschema der Proteinexpression durch IPTG-Zugabe	47
2.9. Induktion der Proteinexpression in Pflanzenzellen durch 17β -Estradiol	48
2.10. Molekulargewicht als Funktion des R_F -Wertes	52
2.11. Aufbau einer Blot-Apparatur	56
2.12. Grundlagen einer Gelfiltration	63
2.13. Gradient zur ESI-MS	69
3.14. Arbeitsfluss der bioinformatischen Datenerhebung	72
3.15. Alignment zur γ -Tubulin Homologie-Modellierung	74
3.16. Darstellung überlagerter γ -Tubulin Tertiärstrukturmodelle	75
3.17. Torsionswinkel des Proteinrückgrads	76
3.18. Ramachandran-Plots der γ -Tubulin Strukturmodelle	77
3.19. Vergleichender $\Delta C\beta$ Plot der γ -Tubulin Strukturen	78
3.20. Proteinrückgradanalyse des Nt_c1zw5A-Strukturmodells	81
3.21. Plot des elektrostatischen Oberflächenpotentials für Nt_3CB2	83
3.22. Vergleichende γ -Tubulin Primärstrukturanalysen	84
3.23. Vergleichende γ -Tubulin Sequenz- und Strukturanalysen	86
3.24. Amplifikation und Klonierung der modifizierten γ -Tubulin-CDS in pET-44a(+)	88
3.25. Expression von γ -Tubulin in <i>E. coli</i>	89
3.26. Strategie zur Expression der γ -Tubulin Vollängensequenz in <i>E. coli</i>	90
3.27. Expression von γ -Tubulin in verschiedenen <i>E. coli</i> Stämmen	91
3.28. Klonierung und Expression getaggtter γ -Tubulin-CDS in <i>E. coli</i>	93
3.29. Purifikation von rekombinantem γ -Tubulin aus <i>E. coli</i>	95
3.30. Amplifikation und Klonierung der modifizierten γ -Tubulin-CDS pKLAC1	97
3.31. Segregative Expression von γ -Tubulin in <i>K. lactis</i>	98
3.32. Vergleichende Darstellung der γ -Tubulin Exon-Intron Struktur	99
3.33. Sequence-Logo der Kozak-Sequenz für dikotyle Pflanzen	100
3.34. Klonierung konstitutiver Expressionskonstrukte	101
3.35. Klonierung verschiedener 17β -Estradiol induzierbarer Expressionskonstrukte	102
3.36. <i>In planta</i> GFP-Expression in <i>A. thaliana</i>	103
3.37. Transiente γ -Tubulin-Expression in <i>N. benthamiana</i> -Blättern	104
3.38. Konstitutive γ -Tubulin-Expression in <i>N. benthamiana</i> -Blättern	105
3.39. Vergleichende Betrachtung der Infiltrationstechnik	106
3.40. Einfluss der 17β -Estradiol-Konzentration auf die γ -Tubulin-Expressionsrate	107
3.41. Abhängigkeit der Expressionsrate vom <i>A. tumefaciens</i> -Stamm und Promotor	108
3.42. γ -Tubulin-Expressionsrate in Abhängigkeit des PTGS-Suppressors <i>p19</i>	109
3.43. Relative RNA-Transkriptkonzentrationen modifizierter γ -Tubulin-CDS	110
3.44. Relative RNA-Transkriptkonzentrationen nativer γ -Tubulin-CDS	111
3.45. γ -Tubulin IMAC-Pull-Down	112
3.46. Funktionelle Kategorisierung identifizierter γ -Tubulin-Interaktionspartner	114
A.47. Plot des elektrostatischen Oberflächenpotentials für Nt_3CB2	II

Tabellenverzeichnis

2.1. Plasmide	18
2.2. Verwendete Selektionsfaktor-Stammlösungen	20
2.3. Merkmale der verwendeten <i>E. coli</i> bzw. <i>A. tumefaciens</i>	20
2.4. Zusammensetzung der Nährmedien zur Bakterienanzucht	21
2.5. Medien zur Präparation RbCl-kompetenter <i>E. coli</i>	21
2.6. Stammlösungen zur Blau-Weiss-Selektion	22
2.7. Medien zur Hefenkultivierung	24
2.8. Lösungen zur Präparation kompetenter Hefen	25
2.9. Medien zur Pflanzenkultivierung	27
2.10. Nährstofflösungen nach Hoagland zur Pflanzenkultivierung	28
2.11. Medien zur transienten Expression in <i>N. benthamiana</i>	30
2.12. Lösungen zur Midi-Präparation	34
2.13. Zuwählende Agarosekonzentration abhängig vom Trennbereich	35
2.14. Spezifikationen der Bio-Rad Gel-Elektrophorese Systeme	36
2.15. Puffer zur Agarose-Gelelektrophorese	37
2.16. RT-PCR-Durchführung	39
2.17. PCR-Ansatz und Durchführung	40
2.18. Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide	43
2.19. Restriktion	45
2.20. Blunt-End-Ligation	46
2.21. Sticky-End-Ligation	46
2.22. Denaturierungspuffer	49
2.23. Aufschlusspuffer	50
2.24. SDS-PAGE-Puffer und Gelzusammensetzung für 2 Gele	53
2.25. Lösungen zur Proteinfärbung und Konservierung	55
2.26. Lösungen zur kolloidalen Proteinfärbung und Konservierung	55
2.27. Lösungen zum Elektroblothing	56
2.28. Antikörper	57
2.29. ECL-Ansatz	58
2.30. ELISA-Puffer	60
2.31. IMAC-Puffer	61
2.32. Säulenmatrices zur Gelfiltration	63
2.33. Gelfiltrationspuffer	63
2.34. Elutionslösungen zum Gelverdau	66
2.35. Auflistung der verwendeten Software gruppiert nach Verwendungszweck	70
3.36. GGSEARCH-Ergebnisse sortiert nach den optimalen globalen Alignment-Scores	73
3.37. Intervalle der Homologie-Fittingparameter	75
3.38. Statistische Betrachtung der $\Delta C\beta$ Werte	76
3.39. RMSD-Vergleich der einzelnen Strukturen und Modelle	78
3.40. MolProbity-Scoring Ergebnisse der beiden besten Modelle	79
3.41. Fold-Recognition Scores der γ -Tubulin Modelle	80
3.42. MolProbity-Scoring Ergebnisse für das Threading- γ -Tubulin-Modell	80
3.43. Parametervariationen zur Expression von gelöstem γ -Tubulin	90
3.44. Primärstruktur bedingte Wahrscheinlichkeit einer Expression von löslichem Protein	92
3.45. Quotienten der funktionellen Charakterisierung der <i>gTub</i> und <i>gTub</i> ΔAB -Probe	115
4.46. Charakteristika verschiedener Expressionssysteme	120
A.47. Anzahl der gefundenen Proteine abhängig vom <i>Sample-Spectra-Count</i> -Schwellenwert	II
A.48. In Pull-Down-Proben massenspektrometrisch identifizierte Proteine	III

