

**Differenzielle Expression von Tubulin-Genen  
bei der Entwicklung von Blattzellen  
der Gerste (*Hordeum vulgare* L.)**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Jan Schröder  
geboren in Ravensburg

Mainz, 2000

Dekan: Prof. Dr. J. Markl

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 14.02.2000

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muß sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen  
das möglichste getan hat.*

Johann Wolfgang Goethe

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Wernicke danke ich für die freien Gestaltungsräume innerhalb des Projekts sowie den unkomplizierten Dialog. Herrn Prof. Dr. A. Dorresteyn danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt ebenso Volker Lennerz und insbesondere Heiko Stenger, deren Diplomarbeiten ich betreute. Sie erzielten durch ihre Tätigkeit wesentliche Ergebnisse, die Bestandteil dieser Arbeit sind. Andreas Rothauer danke ich besonders für die Arbeiten zur Erstellung des mitotischen Index. Silke Heichel danke ich für ihre aufmerksame Hilfe bei allen Laborarbeiten und ihren unermüdlichen Einsatz bei der „Ernte“, Frau Mielke für ihr geduldiges Erledigen der relativ langweiligen, aber notwendigen Laborpflichten.

Oliver Vugrek danke ich für die molekularbiologische „Initialzündung“ und Heiko Sawitzky für das Ausknobeln der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-„wobble“ Primer. Günther Ochs danke ich für seine immerwährende Bereitschaft zum kurzfristigen Überbrücken akuter materieller Labornotstände, sein stets offenes Ohr, die wertvollen Anregungen und die Durchsicht des Manuskripts.

Volkmar Schmid sowie den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. G. Rothe danke ich für die Möglichkeit der intensiven Inbeschlagnahme der PCR-Geräte. Thorsten Burmester danke ich für die geduldige Einführung in die Programme zur phylogenetischen Sequenzanalyse.

Für die Durchsicht des Manuskripts danke ich auch Ralph Schuster und Patricia Roth. Ihr danke ich besonders für die Unterstützung in der Endphase.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Das Cytoskelett .....	1
1.2 Die Rolle der kortikalen Mikrotubuli bei der Morphogenese der Pflanzenzelle .....	3
1.3 Die funktionelle Bedeutung multipler Tubulin-Isotypen .....	8
1.4 Zielsetzung .....	10
<b>2. Material und Methoden</b> .....	11
2.1 Chemikalien.....	11
2.2 Pflanzenmaterial.....	12
2.3 Bakterienstämme und Phagen .....	12
2.3.1 Anzucht.....	13
2.3.1.1 Herstellung der Bakterienmedien.....	14
2.4 Oligonukleotid-Primer.....	15
2.5 Computergestützte Sequenzanalysen .....	16
2.6 Nukleinsäurepräparation .....	17
2.6.1 Phenolextraktion von Nukleinsäuren mit TE-gepuffertem Phenol.....	17
2.6.2 Präzipitation von Nukleinsäuren.....	17
2.6.3 Extraktion von Gesamt-RNA aus Blattmaterial .....	17
2.6.4 Extraktion von mRNA .....	19
2.6.5 Isolierung genomischer DNA aus Blattmaterial der Gerste .....	20
2.6.6 Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse .....	20
2.6.6.1 Isolierung ohne Säulenaufreinigung .....	20
2.6.6.2 Säulenchromatographische Aufreinigung.....	21
2.6.7 Aufreinigung von DNA-Gensonden .....	23
2.6.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	24
2.6.8.1 Elektroelution mittels Dialyseschlauch.....	24
2.6.8.2 Bindung an Silicamatrix-Suspension .....	24
2.7 Elektrophorese von Nukleinsäuren .....	25
2.7.1 DNA-Längenstandards .....	25
2.7.2 Nicht denaturierende Gelelektrophorese von DNA.....	26
2.7.3 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA .....	27
2.8 Nukleinsäure-Nachweismethoden.....	28
2.8.1 Photometrische Bestimmung .....	28
2.8.2 Ethidiumbromidfärbung.....	29
2.8.2.1 Densitometrische Bestimmung .....	29
2.8.2.2 Ethidiumbromid-Platten-Assay.....	29
2.8.3 Blotting von Nukleinsäuren .....	29
2.8.3.1 Northernblot.....	29
2.8.3.2 Dotblot .....	30
2.8.3.3 Southernblot.....	31
2.8.4 Radioaktive Markierung von Gensonden .....	32
2.8.4.1 "Random primed"-Markierung .....	32
2.8.4.2 Radioaktive Markierung mittels PCR .....	32
2.8.4.3 Digoxigenin-Markierung von DNA-Sonden und Detektion.....	34
2.8.5 Flüssigszintillations-Zählung.....	35
2.8.6 Hybridisierung von Nukleinsäuren.....	36
2.8.6.1 Hybridisierung von Northernblots und Plaquelifts.....	36
2.8.6.2 Hybridisierung von Southernblots .....	37
2.8.7 Nachweis der Hybridisierungssignale .....	38

2.8.7.1 Röntgenfilmexposition.....	38
2.8.7.2 Nachweis über "Phosphoimaging" und Auswertung.....	39
2.9 PCR-Anwendungen.....	40
2.9.1 Reverse Transkription von RNA.....	40
2.9.2 Polymerasekettenreaktion.....	40
2.9.2.1 Auswahl der Oligonukleotid-Sequenzen ("Primerdesign").....	42
2.9.2.2 PCR mit $\lambda$ -Phagenpartikeln.....	43
2.10 Klonierung von DNA.....	43
2.10.1 Restriktion von DNA.....	43
2.10.1.1 Restriktion von Plasmid-DNA.....	43
2.10.1.2 Restriktion von PCR-Produkten.....	44
2.10.1.3 Restriktion hochmolekularer genomischer DNA von Gerste.....	44
2.10.2 Klonierungsvektor mit d(T)-Überhang.....	44
2.10.3 Ligation von DNA.....	45
2.11 Transformation von Bakterien.....	46
2.11.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien.....	46
2.11.1.2 Transformation kompetenter Bakterien.....	46
2.12 Herstellung von cDNA-Bibliotheken aus Gersten-mRNA.....	47
2.13 Screening von cDNA-Bibliotheken.....	53
2.13.1 Primärscreening.....	53
2.13.2 Weitere Screening-Runden.....	54
2.14 <i>In vivo</i> -Excision.....	55
2.15 DNA-Sequenzierung.....	55
2.16 Bestimmung des mitotischen Index.....	56
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
3.1 Erstellung von cDNA-Bibliotheken aus Gersten-mRNA.....	57
3.1.1 Isolation von poly(A) <sup>+</sup> -mRNA.....	57
3.1.2 Die Synthese von cDNA und Verpackung in Phagenpartikel.....	58
3.2 Isolierung von $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen aus cDNA der Gerste.....	59
3.2.1 Herstellung homologer $\alpha$ -Tubulin DNA-Sonden über PCR.....	59
3.2.2 Screening der cDNA-Bibliothek nach Klonen hoher Abundanz.....	60
3.2.3 Charakterisierung der positiven cDNA-Klone durch Restriktionsanalyse.....	61
3.2.4 Abschätzung der Anzahl der $\alpha$ -Tubulin-Gene im Genom der Gerste durch Southernblot-Analysen.....	62
3.2.5 Differenzierung $\alpha$ -Tubulin-positiver cDNA-Klone geringer Abundanz durch PCR.....	63
3.2.6 Die cDNA-Sequenzen von <i>Hordeum vulgare</i> $\alpha$ -Tubulin.....	66
3.2.6.1 Die <i>Hordeum vulgare</i> $\alpha$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVATUB1.....	66
3.2.6.2 Die <i>Hordeum vulgare</i> $\alpha$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVATUB2.....	68
3.2.6.3 Die <i>Hordeum vulgare</i> $\alpha$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVATUB3.....	71
3.2.6.4 Die <i>Hordeum vulgare</i> $\alpha$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVATUB4.....	73
3.2.6.5 Die <i>Hordeum vulgare</i> $\alpha$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVATUB5.....	75
3.2.7 Die Basenverteilung in den cDNA-Sequenzen HVATUB1 bis HVATUB5.....	76
3.2.8 Sequenzvergleiche der $\alpha$ -Tubulin-Isotypen der Gerste.....	77
3.3 Isolierung von $\beta$ -Tubulin-Sequenzen aus cDNA der Gerste.....	80
3.3.1 Herstellung homologer $\beta$ -Tubulin DNA-Sonden über PCR.....	80
3.3.2 cDNA-Bibliothek Screening mit $\beta$ -Tubulin-Gensonden.....	81
3.3.3 Die cDNA-Sequenzen von <i>Hordeum vulgare</i> $\beta$ -Tubulin.....	81
3.3.3.1 Die <i>Hordeum vulgare</i> $\beta$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVBTUB1.....	82
3.3.3.2 Die <i>Hordeum vulgare</i> $\beta$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVBTUB2.....	84

3.3.3.3 Die <i>Hordeum vulgare</i> $\beta$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVBTUB3.....	85
3.3.4 Die Basenverteilung der cDNA-Sequenzen HVBTUB1 bis HVBTUB3 .....	86
3.3.5 Sequenzvergleiche der $\beta$ -Tubulin-Isotypen aus Gerste .....	87
3.4 Isolierung einer $\gamma$ -Tubulin cDNA-Sequenz aus Gerste .....	88
3.4.1 Herstellung homologer $\gamma$ -Tubulin DNA-Sonden über PCR .....	88
3.4.2 cDNA-Bibliothek Screening mit $\gamma$ -Tubulin-Gensonden.....	89
3.4.3 Charakterisierung weiterer $\gamma$ -Tubulin cDNA-Klone durch PCR.....	90
3.4.4 Nachweis eines vollständigen $\gamma$ -Tubulin-Transkripts mittels RT-PCR.....	91
3.4.5 Abschätzung der Anzahl der $\gamma$ -Tubulin-Gene im Genom der Gerste .....	94
3.4.6 Die <i>Hordeum vulgare</i> $\gamma$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVG TUB.....	95
3.4.7 Der Basengehalt der cDNA-Sequenz HVG TUB .....	98
3.4.8 Sequenzvergleich des $\gamma$ -Tubulins aus Gerste mit anderen Spezies .....	98
3.5 Genexpressionsstudien .....	100
3.5.1 Expression von $\alpha$ -Tubulin-mRNA .....	100
3.5.1.1 Herstellung isotypspezifischer DNA-Sonden mit PCR .....	101
3.5.1.2 Entwicklungsspezifische Expression der einzelnen $\alpha$ -Tubulin-Isotypen .....	103
3.5.2 Expression von $\gamma$ -Tubulin-mRNA .....	107
3.5.2.1 Herstellung 3'-Bereich spezifischer DNA-Sonden für $\gamma$ -Tubulin.....	109
3.5.2.2 Nachweis von HVG TUB-Transkript mit 3'-spezifischen DNA-Sonden.....	111
<b>4. Diskussion</b> .....	113
4.1 Genexpression von $\alpha$ -Tubulin.....	113
4.1.1 Differenzielle Genexpression der $\alpha$ -Tubulin-Isotypen im Entwicklungsgradienten des Blattes .....	114
4.1.2 Vergleich der Abundanz der $\alpha$ -Tubulin-Isotypen auf Transkriptionsebene mit Signalen der 2D SDS-PAGE .....	117
4.1.3 Für die Antikörperherstellung geeignete Sequenzmotive.....	119
4.1.4 Funktionelle Bedeutung der entwicklungsspezifischen Expression von Tubulin- Isotypen .....	120
4.2 Genexpression von $\gamma$ -Tubulin .....	121
4.2.1 Vorkommen von $\gamma$ -Tubulin-Transkript außerhalb des basalen Meristems.....	122
4.2.2 Zur Antikörperherstellung geeignete Sequenzmotive .....	124
4.3 Multiple Polyadenylierung .....	126
4.3.1 Die Bedeutung multipler Polyadenylierungen.....	127
4.3.2 Expression von Polyadenylierungsvarianten des Tubulin.....	128
4.4 Schnellere Identifizierung nah verwandten Isotypen mittels PCR-Technik .....	129
4.5 Phylogenetische Analysen.....	130
4.5.1 Die Einordnung der $\alpha$ -Tubulin-Isotypen aus Gerste in die Subfamilien I-III .....	131
4.5.2 Die verwandschaftliche Beziehung des $\gamma$ -Tubulins aus Gerste zu anderen Pflanzenspezies .....	133
4.6 Ausblick .....	135
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	137
<b>6. Literatur</b> .....	139
<b>7. Anhang</b> .....	154
7.1 Während der Arbeit hergestellte Primer .....	154
7.2 Quellenverweise der Tubulin-Gene .....	157

## Abkürzungen

A	Absorption
abs.	absolut
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure (n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
<i>Bam</i> H I	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
BCP	Bromchlorpropan
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute
cps	Zerfälle pro Sekunde
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DAPI	4', 6-diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	deionisiertes zweifach destilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethan
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridinintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Eco</i> 32 I	<i>Escherichia coli</i> RFL 32
<i>Eco</i> 91 I	<i>Escherichia coli</i> RFL 91
<i>Eco</i> 130 I	<i>Escherichia coli</i> RFL 130
<i>Eco</i> R I	<i>Escherichia coli</i> RY 13
<i>Eco</i> R V	<i>Escherichia coli</i> J62 pLG74
EDTA	Ethylendieamintetraacetic acid
EthBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
Gu-HCl	Guanidinium-Hydrochlorid
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenza</i> Rd
IP	imaging plate
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
M	molar
MES	Morpholinoethansulfonsäure
<i>Mlu</i> I	<i>Micrococcus luteus</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonucleic acid (Boten-RNA)
<i>Nde</i> I	<i>Neisseria dentrificans</i>
n.b.	nicht bestimmt
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte

ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
p.A.	pro Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pDNA	Plasmid-DNA
PE	Polyethylen
pfu	plaque forming unit (Phagen-, bzw. Lysishof)
poly(A) <sup>+</sup> -mRNA	polyadenylierte messenger RNA
PP	Polypropylen
PVP	Polyvinylpyrrolidon 25
RACE	rapid amplification of cDNA ends
rATP	Riboadenosintriphosphat
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuclease
rpm	rotations per minute (Umdrehungszahl)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit folgender PCR
S	Svedbergeinheiten
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i> G
sddH <sub>2</sub> O	steriles, → ddH <sub>2</sub> O
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SM	Sodium Magnesiumsulfat
SSC	Sodium Sodiumcitrat
STE	Sodium Tris EDTA
TAE	Tris Acetat EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TCA	Trichloracetat
TE	→ Tris, → EDTA
Tet	Tetracyclin
T <sub>m</sub>	Temperatur des Schmelzpunkts von Nukleinsäurehybriden
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>badrii</i>
<i>Xho</i> I	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>

**Für die Darstellung der Aminosäuren wurden folgende Symbole benutzt:**

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

Für die metrischen und sonstigen verwendeten Einheiten gilt das Internationale Einheitensystem (*Système International d'Unités* = SI).

## 1. Einleitung

Tierische und pflanzliche Organismen erfahren während ihrer Ontogenese zahlreiche morphologische Veränderungen. Die Funktion eines Organs hängt letztlich von der Struktur der beteiligten Zellen ab. Deshalb ist es wichtig, die Faktoren aufzuklären, die die Morphogenese der Einzelzelle beeinflussen. Eine wichtige Rolle bei der Festlegung der äußeren Form tierischer und pflanzlicher Zellen spielt das Zusammenwirken des intrazellulären Cytoskeletts mit der extrazellulären Matrix.

### 1.1 Das Cytoskelett

Das Cytoskelett dient nicht nur der Festlegung der äußeren Zellform, sondern dient auch als intrazelluläre Strukturkomponente des Cytoplasmas. Abgesehen von diesen eher formgebenden und stabilisierenden Aufgaben nimmt das Cytoskelett auch dynamische Aufgaben wahr. Zusammen mit krafterzeugenden Proteinen (z. B. Myosin oder Kinesin) kann zelluläre und intrazelluläre Bewegung erzeugt werden.

Das Cytoskelett setzt sich aus polymeren Strukturproteinen zusammen, die sich in drei Hauptgruppen untergliedern lassen: Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Diese Unterteilung erfolgt nach der Größe der Komponenten: Aktin-Mikrofilamente weisen als helikal aufgebaute Fasern von allen Cytoskelettkomponenten den geringsten Durchmesser von ungefähr 8 nm auf, Mikrotubuli sind Röhren mit etwa 25 nm Außen- und 14 nm Innendurchmesser und Intermediärfilamente liegen mit einem Durchmesser von ungefähr 8 bis 10 nm dazwischen.

Intermediärfilamente sind sehr dauerhafte Proteinfasern einer eher heterogenen Familie und in ihrem Vorkommen auf tierische Zellen beschränkt; ein sicherer Nachweis bei höheren Pflanzen gestaltete sich bisher schwierig (MENZEL 1993). Mikrofilamente wurden hingegen bei allen bisher untersuchten Eukaryonten gefunden. Sie sind mitverantwortlich für die elastischen Eigenschaften des Cytoplasmas; zusammen mit dem Protein Myosin gewährleisten sie Muskelkontraktion bei Tieren und Cytoplasmaströmung bei Pflanzen (siehe auch KATO & TONOMURA 1977, KAMIYA 1981, GROLIG 1990, WILLIAMSON 1993). Auch Mikrotubuli wurden in allen eukaryontischen Zellen nachgewiesen. Innerhalb von Cilien und Flagellen sorgen sie zusammen mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) für die Motilität von Organismen. Außerdem ermöglichen sie die intrazelluläre Translokation von Cytoplasma-Bestandteilen - sei es der Vesikeltransport in Nervenzellen oder die Verschiebung

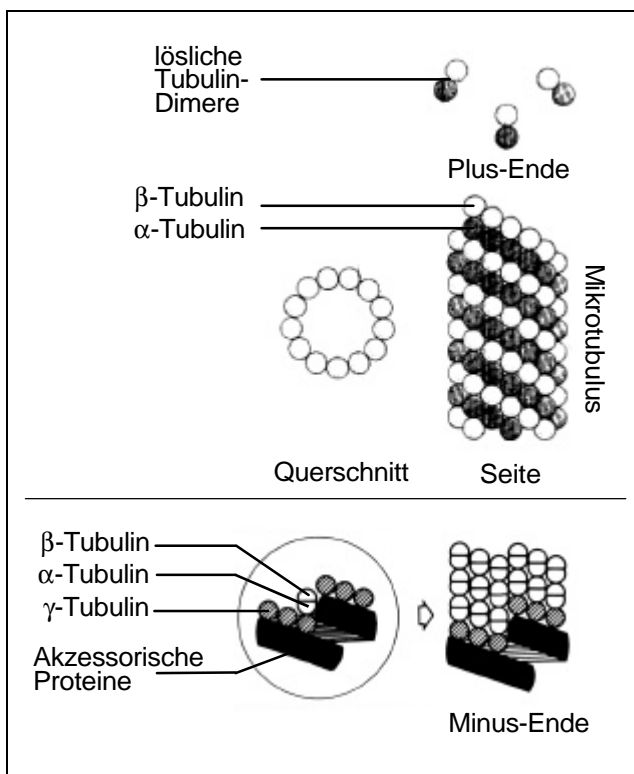
der Chromosomen innerhalb der Kernspindel während der Mitose. Mikrotubuli- und Mikrofilamentsystem sind ein wichtiger räumlicher Ordnungsfaktor im Rahmen der Proteinbiosynthese (Davies et al. 1998). Außerdem müssen sie besonders während des pflanzlichen Zellzyklus koordiniert zusammenwirken, um die für den Ablauf von Kern- und Zellteilung notwendigen Cytoskelettstrukturen aufbauen zu können (siehe auch STAIGER & LLOYD 1991, GALWAY & HARDHAM 1991, LAMBERT & LLOYD 1994, GODDARD et al. 1994, CYR & PALEVITZ 1995). Im folgenden soll auf das Genprodukt Tubulin sowie die Struktur und Funktion von Mikrotubuli genauer eingegangen werden.

Mikrotubuli (MT) bestehen typischerweise aus 13 parallel angeordneten Protofilamenten, die die Wand des Mikrotubulus bilden. Jedes Protofilament besteht aus Heterodimeren, die sich aus jeweils einem  $\alpha$ - und einem  $\beta$ -Tubulinmolekül zusammensetzen. Dadurch, daß die Heterodimere leicht gegeneinander verschoben entlang der Längsachse des Mikrotubulus angeordnet sind, kommt es zur helikalen Anordnung der Heterodimere (AMOS & BAKER 1979, MANDELKOW et al. 1986). Die polare Struktur des Mikrotubulus ergibt sich aus der geordneten Verbindung der Monomere zueinander (siehe Abb. 1).

Die Aggregation zum Mikrotubulus erfolgt durch GTP-aktivierte Heterodimere, wobei prinzipiell  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin GTP binden können, aber nur GTP- $\beta$ -Tubulin nach der Assemblierung wieder zu GDP-Tubulin hydrolysiert wird (BURNS & FARELL 1996). In der verzögerten GTP-Hydrolyse liegt auch der Hauptgrund des MT-Wachstums: Wenn schneller GTP-Tubulin nachgeliefert wird, als hydrolysiert werden kann, wächst der MT. Solange das instabilere GDP-Tubulin nicht am Ende des MT vorliegt, erfolgt kein Abbau, das GTP-Tubulin („GTP-cap“) wirkt MT-stabilisierend (MITCHISON & KIRSCHNER 1984). Möglicherweise interagiert die GTP-Bindestelle intramolekular mit dem C-terminalen Bereich des Tubulins, wobei mehrere mögliche GTP-Bindestellen diskutiert werden (siehe auch LINSE & MANDELKOW 1988, PADILLA et al. 1993, BURNS & FARELL 1996).

Das MT-Ende, an dem eine Netto-Anlagerung von GTP-Tubulin stattfindet, wird als „Plus-Ende“ bezeichnet (siehe Abb. 1). Das MT-Ende mit GDP-Tubulin unterliegt der Depolymerisation und wird als „Minus-Ende“ bezeichnet. Obwohl Tubulin-Dimere grundsätzlich autonom zu MT assemblieren können, haben sie *in vivo* meist in „microtubule associated centers“ (MTOCs) ihren Ursprung, so daß die „Minus-Enden“ vor unkontrollierter Depolymerisation geschützt sind.

Eine wichtige Rolle in MTOCs spielt eine weitere, von OAKLEY & OAKLEY (1989) entdeckte Tubulin-Klasse, das  $\gamma$ -Tubulin. Möglicherweise leiten initiale Protofilamente aus  $\gamma$ -Tubulin die Assemblierung der MT ein, die eigentliche MT-Röhrenstruktur käme durch die nachfolgende laterale Anlagerung von  $\alpha/\beta$ -Dimeren an diese Protofilamente zustande (ERICKSON & STOFFLER 1996). Ein anderes Modell postuliert Multiprotein-Komplexe aus  $\gamma$ -Tubulin und akzessorischen Proteinen („ $\gamma$ -somes“, siehe Abb. 1), die als direkte Matrize die Nukleation der MT einleiten sollen (RAFF 1996, MARC 1997).



**Abb. 1: Schematische Darstellung eines Mikrotubulus.**

Am Minus-Ende fungiert ein „ $\gamma$ -some“ (unterer Teil der Abbildung, eingekreist) als Nukleationszentrum (verändert nach MARC 1997). Am Plus-Ende assoziieren die Tubulin-Dimere.

## 1.2 Die Rolle der kortikalen Mikrotubuli bei der Morphogenese der Pflanzenzelle

Die Gestalt der pflanzlichen Zelle wird durch lokal unterschiedlich stark ausgestaltete Cellulose-Mikrofibrillen der Zellwand festgelegt, die dem inneren Druckpotential der großen Zentralvakuole mehr oder weniger Widerstand entgegensetzen (GREEN 1980, KUTSCHERA 1991). Parallel zur Zellstreckungsrichtung ausgerichtete Mikrofibrillen lassen ein transversales Wachstum zu, senkrecht ausgerichtete ein longitudinales.

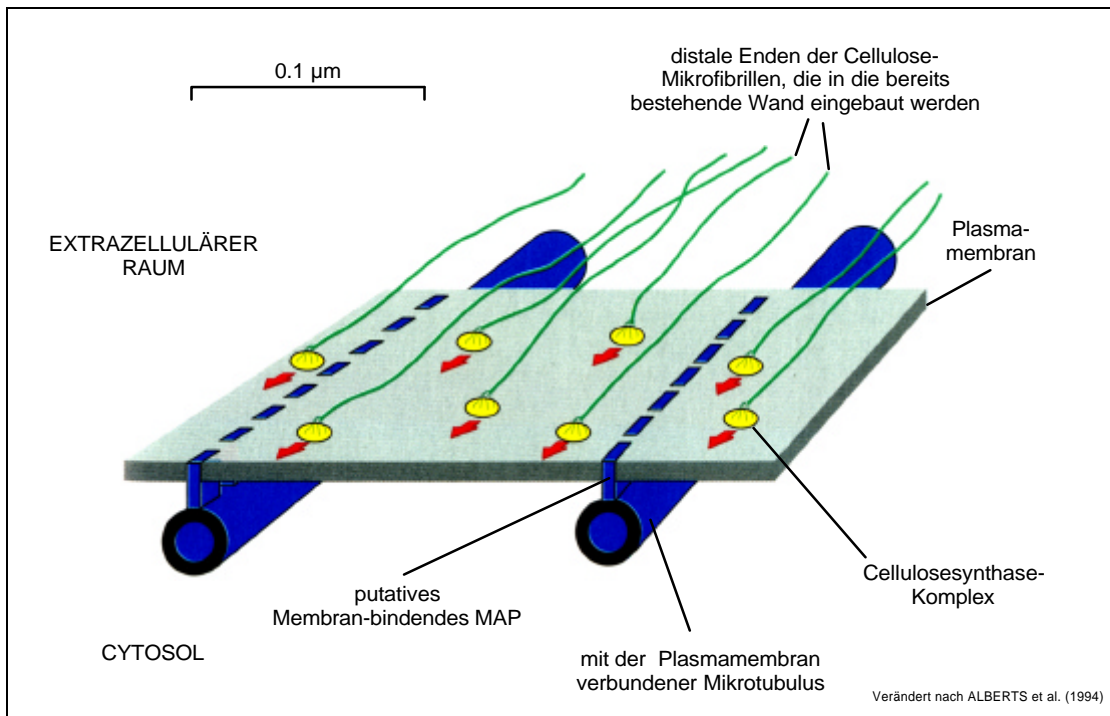
### **Kolokalisation von kortikalen Mikrotubuli und Cellulose-Mikrofibrillen**

Seit die Kolokalisation der Cellulose-Mikrofibrillen mit dem intrazellulären kortikalen Mikrotubuli-Cytoskelett von LEDBETTER & PORTER (1963) beschrieben wurde, postuliert man, daß MT die Anordnung der Cellulose-Mikrofibrillen steuern (Übersicht siehe auch GUNNING & HARDHAM 1982, ROBINSON & QUADER 1982, LLOYD 1984, LLOYD 1987, GIDDINGS & STAEHELIN 1991). Bei vielen Pflanzen konnte eine derartige Kolokalisation festgestellt werden: In Xylemgefäßen von *Zinnia elegans* (FALCONER & SEAGULL 1985), bei Epithemzellen von Hydathoden von *Pilea cadierei* (GALATIS 1988), in Mesophyllzellen des Weizenblattes (JUNG & WERNICKE 1990), in Mesophyllzellen von *Adiantum* (PANTERIS et al. 1993a), in Epidermiszellen von *Vigna sinensis* (PANTERIS et al. 1993b), in Armpalisadenzellen von *Nigella damascena* (WERNICKE et al. 1993), in Mesophyllzellen bei Nadeln von *Pinus silvestris* (HOSS & WERNICKE 1995) oder in Mesophyllzellen der Gerste (HELLMANN & WERNICKE 1998). In all diesen Fällen finden sich diskrete ringförmige und bandartige Mikrotubulibündel an den Orten der Zellwandverstärkung.

Diese eher deskriptiven Untersuchungen werden auch durch verschiedene Experimente mit MT-destabilisierenden Inhibitoren bestätigt, die einen Einfluß kortikaler MT auf die Anordnung der Cellulosefibrillen nahelegen (Übersicht siehe HEPLER & FOSKET 1971, BROWER & HEPLER 1976, ELEFTEHERIU 1987, SEAGULL 1990, WERNICKE & JUNG 1992).

### **Steuerung der Cellulosesynthase-Komplexe durch Mikrotubuli**

Die kortikalen Mikrotubuli sind zum Teil über Brückenproteine mit der Plasmamembran assoziiert. Die Cellulosesynthase-Komplexe sind bewegliche Membranproteine, die Cellulosefibrillen an der Zelloberfläche polymerisieren (BROWN 1985, SCHNEIDER & HERTH 1986, DELMER 1987, DELMER & AMOR 1995). Es liegt also nahe, eine Steuerung der lokalen Zellwanddeposition darin zu sehen, daß die freie transversale Beweglichkeit der Synthase-Komplexe in der Membran durch parallel ausgerichtete kortikale MT eingeschränkt wird (siehe Abb. 2). Die Depositionsrichtung der Cellulosefibrillen wird auf diese Weise vorgegeben (GIDDINGS & STAEHELIN 1991). Die Kräfte für die Bewegung der Synthase-Komplexe entlang der MT-Strukturen resultieren aus der Polymerisation der Mikrofibrillen (HERTH 1980, STAEHELIN & GIDDINGS 1982, MELAN 1990).



**Abb. 2: Modell der gerichteten Biosynthese der Cellulose.**

Die Beweglichkeit der transmembranen Cellulosesynthese-Komplexe wird eingeschränkt durch kortikale Mikrotubuli. Dadurch wird die Orientierung der Cellulose-Mikrofibrillen vorgegeben und die Textur der Zellwand geprägt. Verändert nach ALBERTS et al. (1994). MAP = microtubule associated protein.

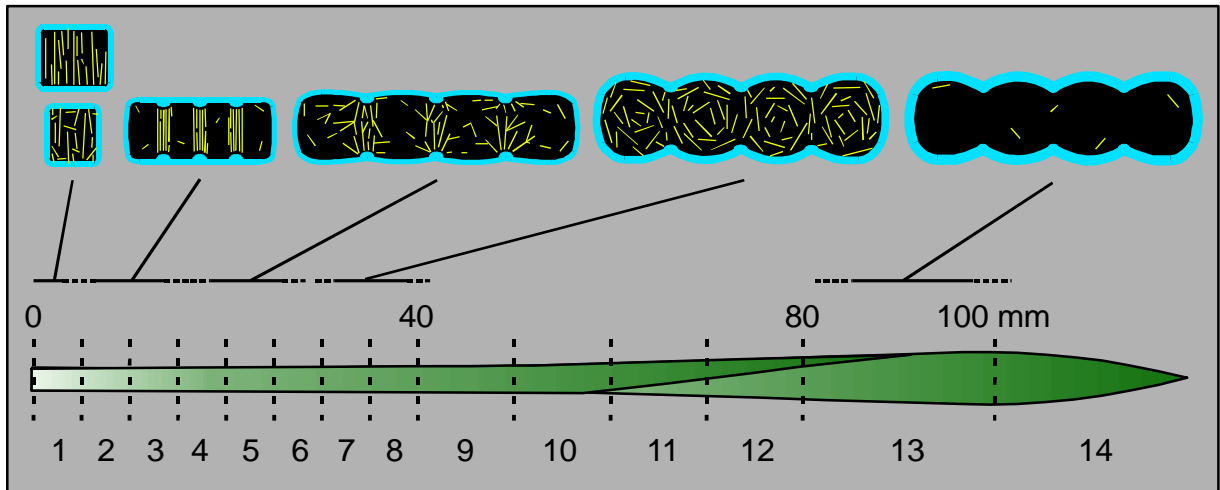
### Der zelluläre Entwicklungsgradient im Getreideblatt

Zur Beschreibung der Morphogenese von Blattzellen sind die Blätter monokotyler Pflanzen besser geeignet als die der dikotylen Arten. Bei monokotylen Blättern ist das Meristem auf den basalen Bereich des Blattes begrenzt. Bei dikotylen Blättern kann dagegen der Entwicklungsgradient zwischen Meristem und älteren Blattbereichen bei weitem nicht so klar definiert werden. Entlang der Längsachse des monokotylen Blattes verdrängen teilungsaktive Zellen an der Blattbasis die älteren Zellen aus diesem Bereich. Im nachfolgenden Blattabschnitt erfolgt ein starkes Streckungswachstum dieser Zellen, was zu einer weiteren Verdrängung von älteren Zellen vom Meristem weg führt. Der resultierende Alters- oder Entwicklungsgradient von jüngeren, meristematischen Zellen zu älteren funktionell spezialisierten Zellen in Richtung Blattspitze ermöglicht es, innerhalb eines Blattabschnittes Zellpopulationen vergleichbaren Entwicklungszustandes zu untersuchen. Differenzierungsvorgänge von der meristematischen zur weiter differenzierten Mesophyllzelle können so bestimmten Blattregionen gut zugeordnet werden.

## **Dynamische Mikrotubulimuster bei der Morphogenese der Mesophyllzellen im Gerstenblatt**

Mesophyllzellen machen auch bei monokotylen Blättern die Hauptmenge der Zellen eines Blattes aus (JELLINGS & LEECH 1982) und sind bei monokotylen Pflanzen im Gegensatz zu den dikotylen Arten nicht in Palisaden- und Schwammparenchym unterteilt. Ausdifferenzierte Mesophyllzellen von Weizen- und Gerstenblättern zeichnen sich durch eine regelmäßig gebuchtete, röhrenförmige und langgestreckte Zellform aus (JUNG et al. 1993). Sowohl bei Mesophyllzellen des Weizenblattes (JUNG & WERNICKE 1990, JUNG 1991) als auch bei denen des Gerstenblattes (MEYER et al. 1998, HELLMANN & WERNICKE 1998) konnten eindeutige Kolokalisationen zwischen örtlich verstärkt auftretenden Depositionen von Zellwandmaterial und verdichteten Anordnungen von MT-Bündeln festgestellt werden (siehe Abb. 3). In Bereichen dieser ringförmigen Zellwandverstärkungen ist eine Ausdehnung der Zelle nicht mehr möglich. Hingegen sind die übrigen Zellwandbereiche noch sehr flexibel, was bei weiterem Wachstum zur charakteristisch gebuchteten Zellgestalt der ausdifferenzierten Mesophyllzelle führt. Anschließend zerfällt dieses hochgeordnete Muster sehr schnell in ein diffuses MT-Netz.

Im besonders gut standardisierbaren zweiten Blatt einer Länge von 10 bis 12 cm sind kleine mitotische, nahezu isodiametrische Mesophyllzellen mit zerstreut angeordneten MT bis in einem Bereich fünf Millimeter von der Blattbasis entfernt anzutreffen (siehe Abb. 3). Postmitotische, zunehmend langgestreckte Zellen mit transversalen kortikalen MT-Strängen sind eher in fünf bis zehn Millimeter Entfernung von der Blattbasis vorhanden. In diesem Abschnitt findet eine Umorientierung der MT-Bündel zu immer noch transversalen, aber ringförmig konzentrierten MT-Bändern statt. Schon in Blattabschnitten ab etwa 17 mm Entfernung von der Blattbasis sind diese distinkten MT-Bänder in Auflösung begriffen, und Zellwandverstärkungen sind an diesen Stellen deutlich nachweisbar. Zellen aus Blattregionen in 30 bis 35 mm Entfernung von der Blattbasis haben ein kortikales MT-Netzwerk zerstreuter MT-Anordnung, es erfolgt eine gleichmäßige Deposition von Zellwandmaterial. Zellen aus Abschnitten zur Blattspitze hin zeigen eine nahezu vollständige Reduktion des kortikalen MT-Netzwerkes. Im folgenden werden die einzelnen Blattsegmente mit Ziffern entsprechend Abb. 3 bezeichnet.



**Abb. 3: Der zelluläre Entwicklungsgradient im Gerstenblatt.**

Schematische Darstellung des kortikalen Mikrotubulimusters der Mesophyllzellen (oben) im Gerstenblatt (unten). Das sich ändernde kortikale Mikrotubulimuster ist durch dünne Striche angedeutet. Die unterschiedlichen Segmente im Entwicklungsgradienten des Gerstenblattes sind mit den Ziffern 1 bis 14 benannt.

### Wie werden kortikale Mikrotubulimuster reorganisiert?

Angesichts der Dynamik des mikrotubulären Cytoskeletts stellt sich die Frage, in welcher Weise die Mikrotubuli entsprechend den Anforderungen der verschiedenen Zellstadien reorganisiert werden. Immunfluoreszenz-Studien legen zwar die Reorganisation mikrotubulärer Muster durch die Verschiebung ganzer Mikrotubuli nahe. Neuere Arbeiten (YUAN et al. 1994, HUSH et al. 1994, HELLMANN & WERNICKE 1998, MEYER et al. 1998) tendieren allerdings dahin, daß die Formation der MT durch Assemblierung bzw. Neusynthese von Tubulin realisiert wird. Ein weiterer Aspekt ist, ob an der Formation von MT innerhalb verschiedener Zellstadien im Rahmen der Tubulinsynthese auch verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta$ - Tubulin-Isotypen, möglicherweise auch  $\gamma$ -Tubulin, beteiligt sind. Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Dynamik des kortikalen Cytoskeletts und unterschiedlichen Mustern auf Proteinebene bei Gerste konnten schon gefunden werden. Neben eher konstitutiven Tubulin-Signalen treten auch solche auf, die hauptsächlich in Blattbereichen mit distinkten MT-Bänderungen nachweisbar sind (HELLMANN 1995, HELLMANN & WERNICKE 1998). Bei einer Reihe höherer Pflanzen wurden auf Genebene bereits mehrere Tubulin-Isotypen beschrieben, die auch in unterschiedlichen Organen exprimiert werden (Übersicht siehe z. B. LUDUEÑA 1998).

### **1.3 Die funktionelle Bedeutung multipler Tubulin-Isotypen**

Gerade bei mehrzelligen Eukaryonten ist das Auftreten von multiplen Tubulin-Isotypen ein weit verbreitetes Phänomen. Über phänomenologische Betrachtungen hinaus ist allerdings bisher wenig bekannt. Die Isotypen könnten das Produkt unterschiedlicher Gene und/oder posttranslationaler Modifikationen sein. Auf Genebene könnten verschiedene Möglichkeiten von der funktionellen Redundanz bis hin zur Unentbehrlichkeit einzelner Isotypen für bestimmte Entwicklungsstadien zutreffen (LUDUEÑA 1993, LUDUEÑA 1998).

#### **I. Verschiedene Isotypen haben keine unterschiedlichen Funktionen.**

Die evolutionäre Entwicklung mehrerer Isotypen, die keine funktionellen Unterschiede aufweisen, käme dadurch zustande, daß in bestimmten Entwicklungsstadien oder Organen einzelne, durch Genduplikation entstandene Tubulin-Gene ausschließlich im Zusammenspiel anderer Gene aktiviert werden. Mit der Zeit würden zufällige Mutationen zur Ausbildung einer entwicklungs- oder organspezifischen Tubulin-Sequenz, eines Isotyps führen. Manche Tubulin-Isotypen weisen lediglich geringe Sequenzunterschiede von nur ein bis zwei Aminosäure-Positionen auf, funktionelle Unterschiede erscheinen hier eher unwahrscheinlich. So finden sich alle bei Säugern beschriebenen  $\beta$ -Tubulin-Isotypen sowohl im MT-Netzwerk der Interphasezellen als auch in der Teilungsspindel mitotischer Zellen (JOSHI et al. 1987, LEWIS et al. 1987). Zahlreiche Experimente lassen den Schluß zu, daß verschiedene Isotypen ohne gravierende funktionelle Einbußen austauschbar sind. Andererseits zeigen verschiedene „Knock Out“-Untersuchungen an Organismen wie *Aspergillus* und *Saccharomyces*, die nur zwei Isotypen besitzen, daß, obwohl die Isotypen generell austauschbar sind, sich dennoch Fitness-Unterschiede manifestieren. Diese können aber häufig durch eine erhöhte Kopienzahl des „Ersatz“-Tubulins kompensiert werden (KIRK & MORRIS 1993). Der funktionelle Ersatz von Isotypen scheint also prinzipiell möglich, birgt aber möglicherweise langfristig Selektionsnachteile. Dies führt zu folgendem Modell:

#### **II. Verschiedene Isotypen resultieren aus umweltbedingter Adaptation, üben aber keine spezifischen Funktionen aus**

Der Vorteil der Existenz mehrerer Isotypen bestünde in einem besseren Reaktionsvermögen auf sich verändernde Umweltbedingungen. Mögliche funktionelle Unterschiede würden sich erst sekundär ergeben; die Isotypen wären in ihrer Funktion nicht als präadaptiert anzusehen. Bei *Arabidopsis* wird auf Transkriptionsebene die Zusammensetzung der Isotypen je nach

Temperaturverhältnissen variiert; so scheinen bestimmte Isotypen besonders kältestabil zu sein (CHU et al. 1993). Auch zeigen bestimmte Isotypen unterschiedliches Resistenzverhalten gegenüber Inhibitoren, wie bei Pilzen und Nematoden gezeigt werden konnte (MAY 1989, ROOS et al. 1990). So prägt sich auch die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Cytostatika in einer vermehrten Expression unempfindlicherer Isotypen aus (DUMONTET et al. 1996).

### **III. Verschiedene Isotypen haben unterschiedliche Funktionen**

Funktionelle Diversität als Ursache für die Vielzahl der Tubulin-Isotypen wurde mit der Multitubulinhypothese von FULTON & SIMPSON bereits 1976 formuliert. So sollen Sequenzunterschiede, die funktionelle Besonderheiten einzelner Isotypen begründen, größtenteils schon a priori bestehen. Die hohe Konservierung der Sequenzunterschiede zwischen den Tubulin-Isotypen über Artgrenzen hinweg unterstützt dieses Denkmodell. Wäre hingegen die Ausprägung verschiedener Isotypen nicht funktionell relevant, sollten sich die Sequenzunterschiede in „toleranten“ Bereichen manifestieren. Die Positionen, in denen sich die Isotypen untereinander unterscheiden, müßten also auch gemäß der Speziesdistanz in ähnlichem Maße variieren. Die Tatsache, daß dies oft nicht der Fall ist, spricht für funktionelle Unterschiede zwischen den Isotypen.

Oft liegen auch verschiedene Isotypen innerhalb eines Zelltyps heterogen verteilt vor. Dies wird als weiterer Hinweis auf eine funktionelle Spezifität von Isotypen gewertet. In den MT der Neuriten oder in axonemalen MT werden im Unterschied zum übrigen Zellkörper bevorzugt nur bestimmte Isotypen eingebaut (JOSHI & CLEVELAND 1989, RENTHAL et al. 1993). Mit „Knock Out“- und Mutations-Experimenten kann nachgewiesen werden, daß MT spezieller Rezeptorneuronen oder Axonemata ohne bestimmte Isotypen nicht mehr assembliert werden oder ihre Aufgaben nicht mehr erfüllen können (HOYLE & RAFF 1990, HAMELIN et al. 1992, FACKENTHAL et al. 1993, HOYLE et al. 1995, FACKENTHAL et al. 1995, RAFF et al. 1997). Darüberhinaus müssen koevolutionäre Einflüsse durch MAPs in Betracht gezogen werden. So kann das Kinesin-ähnliche Motorprotein *ncd* nur mit einem speziellen mitosespezifischen  $\alpha$ -Tubulin-Isotyp interagieren (KOMMA & ENDOW 1997).

Obwohl grundsätzlich verschiedene Isotypen im Rahmen der MT-Assemblierung austauschbar scheinen, sprechen diese Befunde eher für eine funktionelle Diversität der Isotypen, besonders bei hochspezialisierten MT. So gilt es zu klären, ob bei Pflanzen bestimmte Isotypen im Zuge von Umorganisationsprozessen im kortikalen mikrotubulären Cytoskelett bevorzugt assembliert werden.

## 1.4 Zielsetzung

Aus anderen Forschungsgruppen war bereits bekannt, daß Tubulin-Isotypen auch bei Pflanzen in Multigenfamilien mit bis zu neun Isotypen vorkommen (Übersicht siehe z.B. LUDWIG et al. 1987, SILFLOW et al. 1987, KOPCZAK et al. 1992, JOYCE et al. 1992, VILLEMUR et al. 1992, BRIERLEY et al. 1995, QIN et al. 1997, WHITTAKER & TRIPLETT 1999). Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand, ob auch bei Gerste Multigenfamilien von Tubulin bestehen. Falls auch bei Gerste unterschiedliche Isotypen vorhanden sein sollten, galt es zu untersuchen, ob deren Transkription in Zusammenhang mit den sich entwicklungspezifisch verändernden kortikalen MT-Mustern des Blattes steht. Besondere Aufmerksamkeit galt hierbei neben dem  $\alpha$ -Tubulin auch dem  $\gamma$ -Tubulin als Initiator der räumlich definierten Nukleation der Mikrotubuli. Da zu Beginn dieser Arbeit bei Gerste keinerlei Sequenzinformationen über Tubulin-Gene vorlagen, mußten diese zunächst isoliert, kloniert und sequenziert werden. Im Gegensatz zu vielen polyploiden Kulturpflanzen ist die Gerste diploid und außerdem homozygot; multiple Allelie war daher nicht zu erwarten und die Validierung möglicher Isotypen sollte kein Problem darstellen. Aus entsprechend differenziertem Blattgewebe mußten cDNA-Bibliotheken erstellt werden, die mittels homologer DNA-Gensonden nach Tubulin-Sequenzen durchmustert wurden. Auf Genebene mußte der Umfang der Tubulin-Genfamilien abgeschätzt werden, um eine grobe Orientierung über die mögliche Anzahl von Tubulin-Isotypen auf Transkript-Ebene zu erhalten. Zusätzlich war sicherzustellen, daß neben sehr häufig auftretenden Tubulin-Isotypen auch solche sehr geringer Abundanz isoliert werden können. Von den Tubulin-Sequenzen mußten isotypspezifische DNA-Gensonden abgeleitet werden, um so isotypspezifische Analysen zur Genexpression durchführen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien der Qualität p. A. wurden von Merck (Darmstadt) bezogen, daneben wurde verwendet:

Agarose	Qualex Gold, AGS, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bactoagar	Difco Lab., Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Boehringer, Mannheim
Caseinhydrolysat	Difco Lab., Detroit, USA
CTAB	Serva, Heidelberg
DAPI	Serva, Heidelberg
DTT	Serva, Heidelberg
DMSO	Serva, Heidelberg
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP <sup>1</sup>	ICN Biomedicals, Meckenheim
dNTPs	Genecraft, Münster
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs, Schweiz
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Gelatine	Fluka, Buchs, Schweiz
Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, USA
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Low melting Agarose (SeaPlaque, FMC)	Biozym, hess. Oldendorf
Maleat	Serva, Heidelberg
2-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
MOPS	Roth, Karlsruhe
Na-Acetat	Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> -EDTA	Serva, Heidelberg
Na <sub>3</sub> -Citrat · 2H <sub>2</sub> O	Fluka, Buchs, Schweiz
Na-Pyrophosphat	Fluka, Buchs, Schweiz
N-Lauroylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
Phenol (neutral)	Rotiphenol, Roth, Karlsruhe
PVP	Sigma, Deisenhofen
SDS (ultra pure)	Roth, Karlsruhe
Szintillationsflüssigkeit	Rotiszint 11, Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco Lab., Detroit, USA

---

<sup>1</sup> Tetra-Triethylammonium-Salz; spez. Aktivität >3000 Ci/mmol

## 2.2 Pflanzenmaterial

Handelsübliches mit Arbosan<sup>®</sup> gebeiztes Saatgut der Wintergerste *Hordeum vulgare* (L.) cv. Igri (Ackermann & Co., Irlbach) wurde auf Vermiculit in 10 x 10 cm Kunststofföpfen ausgesät (40-60 Getreidekörner pro Topf), mit Vermiculit in 10 - 15 mm Dicke bedeckt und in mit Leitungswasser gefüllte Kunststoffwannen gestellt. Keimung und Anzucht erfolgten im Klimakonstantraum bei 23°C±1°C bei einer Bestrahlungsdauer von 15 h mit einer Bestrahlungsstärke von ca. 18 Wm<sup>-2</sup> (Leuchtstoffröhren Osram L36 W/25 Weiss-Universal-White).

Pflanzenmaterial, mit dem Genexpressions-Analysen durchgeführt werden sollte, wurde nach etwa 9 d geerntet, entscheidend war nicht der genaue Erntezeitpunkt, sondern die Länge der zweiten Blätter, die zwischen 10 und 12 cm liegen sollte. Geeignete Pflanzen wurden vom Samenkorn getrennt und auf Eis gekühlt. Das freipräparierte zweite Blatt wurde dann gemäß Abb. 3, Kapitel 1.2 in Segmente getrennt, auf angefeuchtetem Filterpapier eisgekühlt aufbewahrt und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Das tiefgefrorene Pflanzenmaterial konnte über mehrere Monate bei -73°C gelagert werden.

## 2.3 Bakterienstämme und Phagen

Im Zusammenhang mit dem  $\lambda$ -Phagen-Vektorsystem Uni-ZAP<sup>TM</sup>XR/pBluescript SK(-) kamen die Wirtsstämme XL1-Blue MRF<sup>'</sup> und SOLR zum Einsatz. Beim  $\lambda$ -Phagen-Vektorsystem ZAP Express<sup>TM</sup>/pBK-CMV (geeignet für eukaryontische Expression) kamen ebenfalls XL1-Blue MRF<sup>'</sup>-Bakterien zum Einsatz, statt SOLR- wurden jedoch XOLR-Bakterien verwendet. Alle genannten Vektorsysteme und Bakterienstämme wurden bezogen von Stratagene, Heidelberg.

Eigenschaften der Bakterien- und Phagenstämme:

Der Stamm XL1-Blue MRF<sup>'</sup>, ein XL1-Blue-Derivat, besitzt keine Restriktionssysteme für unmodifizierte DNA-Sequenzen (Hsd oder *Eco* K System) und für methylierte DNA-Sequenzen (Mcr- und Mrr-System), weswegen dieser Stamm für die primäre Transfektion mit hemimethylierter Phagen-DNA benutzt werden kann. Außerdem ist er in der Lage, die für den Erfolg der f1-Helferphagen (Ex-Assist)-Infektion erforderlichen F<sup>'</sup>-pili an der Zelloberfläche auszubilden (siehe auch Kapitel 2.12) und läßt als Supressorstamm eine Vermehrung des f1-Helferphagens zu. Hingegen wird der Nicht-Supressorstamm SOLR bzw. XOLR für die *in vivo*-Excision des pBluescript SK (-) Phagemids verwendet. SOLR und XOLR

unterscheiden sich in ihrer Antibiotikaresistenz: SOLR ist Kanamycin-resistent, XOLR Tetracyclin-resistent. Zu beachten ist, daß das Vektorsystem pBK-CMV im Gegensatz zum Vektorsystem pBluescript SK (-) nach der *in vivo*-Excision eine Selektion auf Kanamycin statt Ampicillin erfordert.

#### Genotypen:

XL1-Blue MRF <sup>'</sup>	$\Delta(\text{mcrA})$ 183 $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})$ 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F <sup>'</sup> proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn 10 (Tet <sup>r</sup> )]
SOLR	e 14 $\Delta(\text{mcrA})$ 183 $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})$ 171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5(Kan <sup>r</sup> ) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 [F <sup>'</sup> proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15] Su <sup>-</sup> (nonsuppressing) $\lambda^r$ (lambda resistant)
XOLR	$\Delta(\text{mcrA})$ 183 $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})$ 173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F <sup>'</sup> proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn 10 (Tet <sup>r</sup> )] Su <sup>-</sup> (nonsuppressing) $\lambda^r$ (lambda resistant)

### 2.3.1 Anzucht

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit Bakterien wurden auf einer Sterilbank (Laminar-Air-Flow, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH) durchgeführt. Zum Animpfen von Agarplatten (siehe Kapitel 2.3.1.1) wurde von den -73°C Bakterien-Dauerkulturen mit der Impföse etwas Material entnommen (ohne die Dauerkultur aufzutauen), auf Selektionsmedium (siehe Tab. 1) ausgestrichen und im Brutschrank (B290, Heraeus, Hanau) ü.N. inkubiert. Flüssigkulturen (3 - 5 ml LB-Medium) wurden durch Entnahme einer einzelnen Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und ü.N. (14 - 16 h) im Horizontalschüttelwasserbad (1086, GFL) bei 37°C (150 Zyklen/min) inkubiert.

Nicht immer waren die oben beschriebenen Kulturbedingungen erfolgreich, um für Sequenzierungen Plasmid-DNA (pDNA) in ausreichender Qualität und Menge zu erhalten. Bei Schwierigkeiten wurde daher 10 - 11 ml TB-Medium angeimpft, die Kultur 14 - 16 h bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 2,3 bei 30°C inkubiert und die Plasmidisolierung mit einem modifizierten Protokoll gemäß Kapitel 2.6.6.2 I. durchgeführt.

Dauerkulturen wurden in LB-Medium vermehrt, nach Zugabe von 30 - 40 % Glycerin in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und konnten über Jahre bei -74°C gelagert werden.

Wirtstamm	Phagentitration	vor <i>in vivo</i> -Excision	nach <i>in vivo</i> -Excision
XL1-Blue MRF <sup>'</sup>	LB	LB-Tetracyclin (50 µg/ml)	/
SOLR	LB-Maltose	LB-Kanamycin (50 µg/ml)	LB-Ampicillin (100µg/ml)
XOLR	NZY	LB-Tetracyclin (50 µg/ml)	LB-Kanamycin (50 µg/ml)

Tab. 1: Übersicht über die Medien für die einzelnen Wirtsstämme.

### 2.3.1.1 Herstellung der Bakterienmedien

Alle Medien wurden hitzesterilisiert, die Zugabe der optional sterilfiltrierten Antibiotika erfolgte erst nach Abkühlung auf 50°C.

<b>LB-Medium:</b> (Luria-Bertani)	1 % 0,5 % 1 % →	Bacto-Trypton Bacto-Hefeextrakt NaCl pH 7
<b>LB-Agar Medium:</b>	1,5 %	LB-Flüssigmedium mit Bacto-Agar
<b>LB-Maltose:</b>	0,2 % 10 mM	LB-Flüssigmedium mit Maltose MgSO <sub>4</sub>
<b>TB-Medium:</b> (terrific broth)	1,2 % 2,4 % 0,4 % 10 % 10 %	Bacto-Trypton Bacto-Hefeextrakt Glyzerin KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,17 M; steril), zuzufügen nach der Sterilisation K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,72 M; steril), zuzufügen nach der Sterilisation
<b>NZY-Flüssigmedium:</b>	0,5 % 0,2 % 0,5 % 1 % →	NaCl MgSO <sub>4</sub> Hefeextrakt Caseinhydrolysat pH 7,5 mit NaOH
<b>NZY-Agar-Medium:</b>	1,5 %	NZY-Flüssigmedium mit Bacto-Agar
<b>NZY-Top-Agarose:</b>	0,7 %	NZY-Flüssigmedium mit Agarose
<b>SOB-Medium:</b>	2 % 0,5 % 0,05 % 2,5 mM 10 mM →	Bacto-Trypton Bacto-Hefeextrakt NaCl KCl MgCl <sub>2</sub> pH 7
<b>SOC-Medium:</b>	20 mM →	SOB-Medium mit Glucose pH 7

<b>TFB-Medium</b>	10 mM	MES (pH 6)
	45 mM	MgCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O
	10 mM	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O
	100 mM	KCl
	3 mM	Hexamin-CoCl <sub>3</sub>
<b>FSB-Medium</b>	10 mM	K-Acetat (statt MES)
	6 %	Glyzerin
		übrige Komponenten wie TFB-Medium

## 2.4 Oligonukleotid-Primer

Im folgenden werden alle zur Verfügung gestellten Primer aufgeführt. Die übrigen, während dieser Arbeit hergestellten Primer, sind in den entsprechenden Kapiteln erwähnt und im Anhang aufgeführt. Alle Primersynthesen wurden entweder bei MWG-Biotech, Ebersberg oder im Institut für Molekulargenetik der Universität Mainz durchgeführt.

	5'	3'
Vektorprimer		
M13 rev (R)	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	
M13 uni (U)	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	

### Allgemeine $\alpha$ -Tubulin Primer<sup>2</sup>

211	GA(C/T) AA(C/T) GA(A/G) GCN AT(A/T/C) TA(C/T) GA
212	GGN AA(A/G) TA(C/T) ATG GCN TG(C/T) TG
214	AA(C/T) TCN CC(C/T) TC(C/T) TCC ATN CC

### Allgemeine $\beta$ -Tubulin Primer<sup>2</sup>

235	AA(C/T) AA(C/T) TGG GCN AA(A/G) GGN CA(C/T) TA
236	GA(A/G) GA(A/G) TA(C/T) CCN GA(C/T) (A/C)GN ATG ATG
237	TT(A/G) TT(A/G/T) ATC CA(C/T) TCN AC(A/G) AA(A/G) TA
238	TCN GT(A/G) AA(C/T) TCC AT(C/T) TC(A/G) TCC AT

<sup>2</sup> Primersequenzen wurden zur Verfügung gestellt von Heiko Sawitzky, MPI für Zellbiologie, Ladenburg

## 2.5 Computergestützte Sequenzanalysen

- Sequenzvergleiche und Ableitung von Aminosäuresequenzen:  
Align<sup>Plus</sup> 2.0; Scientific & Educational Software.  
ClustalX 1.64b.
- Restriktionskarten und Ableitung von Aminosäuresequenzen:  
Clone Manager 4.0; Scientific & Educational Software.
- Ausgabe und Quantifizierung von Phosphoimaging-Daten radioaktiver Markierungen:  
Aida2.0; Raytest, Straubenhardt.
- Berechnung von Molekulargewicht und Isoelektrischen Punkt:  
WinPep; HENNIG (1999) WinGene/WinPep: User-friendly software for the analysis of aminoacid sequences. *BioTechniques* 26, 1170-1172; <http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/schaefer/lhennig/winpep.html>
- Editierung von Sequenzierungsrohdaten automatischer Sequenziergeräte:  
Chromas1.42; McCarthy, C. School of Biomolecular and Biomedical Science, Faculty of Science and Technology, Griffith University, Brisbane, Queensland, Australia;  
<http://trishul.sci.gu.edu.au/~conor/chromas.html>
- Gensequenzsuche in der Genbank:  
SearchGenbank, National Center for Biotechnology Information  
<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>
- Globale Sequenzvergleiche:  
National Center for Biotechnology Information, USA  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=0>  
Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA  
[http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/nucleic\\_acid-search.html](http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/nucleic_acid-search.html)
- Primerdesign:  
Lasergene; DNASTAR, Madison, USA. Option „Primerselect“ zur Überprüfung der Komplementarität von Oligonukleotiden.  
Primer3; Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research: [http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)
- Phylogenetische Sequenzanalysen:  
Phylogeny Interference Package (PHYLIP Version 3.5c); Joseph Felsenstein, University of Washington, USA.

## 2.6 Nukleinsäurepräparation

### 2.6.1 Phenolextraktion von Nukleinsäuren mit TE-gepuffertem Phenol

Zur Entfernung von Proteinrückständen, die sowohl bei der Nukleinsäureextraktion als auch bei anderen Experimenten in Nukleinsäurefraktionen anfallen konnten, wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Phenol/Chloroform/Isaomyllalkohol (Ph/Chl/IAA) im Verhältnis 50:48:2 extrahiert. Der Ansatz wurde kräftig geschüttelt; nach Zentrifugation (8.000x g) wurde die Oberphase entnommen und zur Entfernung des Phenols mit dem gleichen Volumen Chl/IAA 24:1 versetzt. Nach Durchmischen und erneuter Zentrifugation wurde die zweite Oberphase in eine neues Gefäß überführt. Die Arbeitsschritte erfolgten unter dem Abzug.

### 2.6.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können aus wässrigen Lösungen durch Zugabe monovalenter Kationen und Alkohol ausgefällt werden. Gefällt wurde entweder ethanolisch (2 - 3 Vol.) oder durch Zugabe von Propanol (0,7 Vol.). Falls die Lösung nicht schon vorher eine Salzkonzentration von mindestens 300 mM aufwies, wurde 0,1 Vol. Na-Acetat (3M) zugegeben. Anschließend wurden die Proben gründlich gemischt und zur Fällung 30 min bei RT (Propanolfällung) oder bei -20°C (ethanolische Fällung ) belassen. Wenn es das Volumen des Gefäßes zuließ, wurde vorzugsweise ethanolisch gefällt, da hierbei die Kopräzipitation von Salzen und Zuckern weniger zu befürchten ist (SAMBROOK et al. 1989). Nach Zentrifugation bei 4°C mit 12.000x g für 30 min wurde der Überstand entnommen und das Pellet noch zweimal mit 70 - 80 %igem abs. EtOH versetzt und zentrifugiert (dieser Vorgang wird im weiteren als „Waschen“ bezeichnet). Nach Lufttrocknung für 5 min bei RT konnte das Pellet in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) oder sterilisiertem zweifach destilliertem Wasser (sddH<sub>2</sub>O) gelöst werden. Die Lagerung erfolgte entweder bei -20°C in sddH<sub>2</sub>O oder bei 4°C in TE-Puffer.

### 2.6.3 Extraktion von Gesamt-RNA aus Blattmaterial

Bei diesem Isolationsprinzip (MacDONALD et al. 1987) wird in Gegenwart von Guanidinium-HCl (Gu-HCl), N-Laurylsarkosin und Phenol das zelluläre Protein des Blattmaterials denaturiert und nach der Phasentrennung die Gesamt-RNA durch selektive Präzipitation mit hochmolarem LiCl gewonnen. Diese Methode kommt für die Isolation von

Gesamt-RNA aus kleinen Blattsegmenten zum Einsatz, da sie sich sehr gut an unterschiedliche Ausgangsmengen von Frischmasse anpassen läßt. Zum Einsatz kam eine Kombination aus den Protokollen nach MEYER (1994) und VUGREK (1995).

#### Durchführung:

Das tiefgekühlte Blattmaterial (0,5 - 1,5 g) wurde in einem vorgekühlten Mörser in flüssigen N<sub>2</sub> zu Pulver zermahlen. Dieses Homogenat wurde dann in 30 ml-Teflonzentrifugenröhrchen (Nalgene, Rochester, Ny, USA) oder in 14 ml-PPN-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) mit Gu-HCl Puffer (5 ml/g FG) überführt und sofort gründlich geschüttelt. Dabei war strikt darauf zu achten, daß das Homogenat erst im Kontakt mit dem Gu-HCl Puffer auftaute, um einem Abbau der pflanzlichen RNA durch gewebeeigene RNasen vorzubeugen. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde das Homogenat mit 1 Vol. Ph/Chl/IAA pH 7,5 - 8 (50:48:2) durch kräftiges Schütteln gut vermischt. Nach kurzer Zentrifugation (5 min) mit 8.000x g bei RT (J2-21, Rotor 13-1, JS Beckman bzw. 202 MK, Rotor 12040, Sigma, Braun, Melsungen) wurde die obere, wässrige Phase in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Die Behandlung mit Ph/Chl/IAA wurde ein- bis zweimal wiederholt, bis nur noch wenig Interphase zu sehen war. Nach der Phasentrennung mittels Zentrifugation wurde die wässrige Phase in einem frischen Zentrifugenröhrchen mit 1 Vol. Chl/IAA (24:1) versetzt und gemischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die wässrige, RNA-haltige Phase in Röhrchen mit 0,5 Vol. 8 M LiCl (steril) mindestens 2h bei -74°C aus der Lösung ausgefällt. Das RNA-Präzipitat wurde mit 12.000x g (30 min, 4°C) pelletiert, zweimal in 70 %igem EtOH gewaschen und in 1 - 3 ml sddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach Erhitzen der RNA auf 70°C für 5 min und schnellem Abkühlen auf Eis wurde mit 2,5 Vol. abs. EtOH und 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 4,5) mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Nach 30 min Zentrifugation bei 12.000x g wurde das Pellet zweimal mit 70 %igem EtOH gewaschen und nach kurzem Trocknen in 0,5 bis 1 ml TE-Puffer (pH 8.0) oder sddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Statt Chloroform konnte bei allen entsprechenden Schritten auch das weniger toxische Bromchlorpropan (BCP) in gleichen Volumenanteilen wie Chloroform mit dem selben Erfolg eingesetzt werden, die Zugabe von IAA mußte dabei allerdings unterbleiben.

Sollte die RNA revers transkribiert werden, war nach der LiCl Fällung eine weitere Phenol-Chloroform Extraktion mit anschließender Chl/IAA-Behandlung nötig um inhibierende LiCl-Reste zu entfernen (Stratagene, cDNA Synthesis Kit Instruction Manual 1996).

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

#### 2.6.4 Extraktion von mRNA

Die poly(A)<sup>+</sup>-mRNA Extraktion wurde nach SAMBROOK et al. (1989) in Kombination mit den Herstellerangaben der oligo(dT)-Cellulose (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Die mRNA kann aufgrund ihres 3'-poly(A)-Terminus durch Affinitätschromatographie mittels oligo(dT)-Cellulose von den übrigen RNA-Spezies getrennt und angereichert werden (AVIV & LEDER 1972). Die poly(A)<sup>+</sup>-mRNA wurde für cDNA Synthese oder Northernblot-Hybridisierung verwandt.

##### Durchführung:

Für die Anreicherung von mRNA aus 1,5 mg Gesamt-RNA (gRNA) sind 150 mg oligo(dT)-Cellulose erforderlich, die in 5 ml Elutionspuffer in einer sterilen Säule (Poly Prep R Chromatography Column, Biorad, München) vorgequollen wurde. Mittels steriler Pasteurpipette wurde die oligo(dT)-Cellulose mit dem Puffer vermischt und nach 1 h durch neuen Elutionspuffer (4 - 5 ml) ersetzt. Nach Applikation von 10 ml 0,1 M NaOH wurde erneut Elutionspuffer zugegeben, bis sich ein pH von 7,0 einstellte. Anschließend wurde die Säule mit 40 ml Bindepuffer äquilibriert. Die gRNA wurde mit 10 ml Bindepuffer für 1,5 bis 2 min zum Denaturieren der Sekundärstrukturen auf 100°C erhitzt, schnell im EtOH-Eisbad abgekühlt und zur Bindung der mRNA auf die Säule aufgebracht. Der Säulendurchlauf wurde in einem mit Eis gekühlten Zentrifugenröhrchen aufgefangen, erneut erhitzt, auf Eis gekühlt und danach wieder auf die Säule aufgetragen. Dieser Bindevorgang (einschließlich der Denaturierung) wurde insgesamt mindestens fünfmal durchgeführt. Zur Entfernung der nicht gebundenen RNA-Spezies wurde das Gelbett danach mit mindestens 30 ml Bindepuffer gespült, bis im Durchlauf eine OD<sub>260</sub> von weniger als 0,02 erreicht war. Die Säule wurde auf 48°C erhitzt<sup>3</sup>, 1 ml Elutionspuffer zugegeben und nach 15 min konnte eluiert werden (Eluat 1). Nachdem nochmals 1 ml Elutionspuffer zugegeben und der Durchlauf aufgefangen wurde (Eluat 2) konnten beide Eluate vereinigt werden. Nach Zugabe von 2,5 Vol. abs. EtOH und 0,1 Vol. NaAcetat wurde mindestens 30 min bei -20°C gefällt und die mRNA konnte pelletiert werden (12.000x g, 4°C, 30 min). Das Pellet wurde zweimal mit 70 %igem EtOH gewaschen und nach kurzem Trocknen in 50 µl sddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

---

<sup>3</sup> Das Erhitzen wurde durch vorgewärmten Puffer gewährleistet, zusätzlich wurde die Säule von außen durch einen umwickelten Plastikschlauch über ein Wasserbad temperiert.

Bindepuffer:	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
	0,5 M	NaCl
	0,1 %	Sarkosyl (nach dem Autoklavieren zugeben)
Elutionspuffer:	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
	0,1 %	SDS (nach dem Autoklavieren zugeben)

### 2.6.5 Isolierung genomischer DNA aus Blattmaterial der Gerste

Genomische DNA aus dem ersten Blattsegment der Gerste (siehe Abb. 3, Kapitel 1.2) wurde über N-Cetyl-N, N, N-trimethylammonium-bromid (CTAB) (MURRAY & THOMPSON 1980, verändert nach DOYLE 1991) von STENGER (1997) isoliert und zur Verfügung gestellt.

### 2.6.6 Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

Mittels alkalische Lyse nach BIRNBOIM & DOLY (1979) wird erreicht, daß nach der Denaturierung durch SDS und NaOH nur die Plasmid-DNA (pDNA) durch Neutralisierung des Milieus in Lösung bleibt, Proteine und chromosomale Bakterien-DNA jedoch ausgefällt werden und sich pelletieren lassen.

#### 2.6.6.1 Isolierung ohne Säulenaufreinigung

Für eine Minipräparation wurden 1,5 ml Bakterienkultur ü.N. bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert, 30 s bei 16.000x g in einer Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) 1 min pelletiert und nach vollständiger Entnahme des Überstands in 100 µl Lösung I resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung II. Nach vorsichtigem Durchmischen (Invertieren des Gefäßes, nicht vortexen) wurde nach maximal 5 min 150 µl eiskalte Lösung III zugegeben. Nach 5 min auf Eis konnte das Lysat bei 16.000x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt werden. Nach Zugabe von 900 µl abs. EtOH wurde gemischt, die Nukleinsäuren bei -20°C 10 min gefällt, für 15 min bei 4°C mit 16.000x g pelletiert und der Überstand verworfen. Nun wurde das Pellet mit 70 %igem EtOH zweimal gewaschen, für 5 min getrocknet und in 20 - 50 µl TE-Puffer (pH 8) oder sddH<sub>2</sub>O gelöst.

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

Minipräparation einzelner Bakterienkolonien:

Sollte eine schnelle Charakterisierung von Transformanten ohne Flüssigkultur erfolgen, konnte auch eine einzelne Bakterienkolonie von der Agarplatte entnommen werden und gemäß dem oben aufgeführten Protokoll behandelt werden. Hierbei wurden lediglich die einzelnen Puffervolumina halbiert. Der Transformationserfolg konnte dann via PCR (siehe Kapitel 2.9.2) überprüft werden.

### 2.6.6.2 Säulenchromatographische Aufreinigung

Hier folgt der alkalischen Lyse eine Bindung der pDNA an eine Anionen-Austauschsäule mit DEAE-Matrix. Nach den Waschsritten wird die DNA mit einem stark salzhaltigen Puffer eluiert. Statt an eine DEAE-Matrix kann DNA auch in Gegenwart chaotroper Salze an eine Glasfasermembran (QIAprep Spin, Qiagen, Hilden) gebunden und nach den Waschsritten mit Wasser eluiert werden. Nur die zusätzlich chromatographisch aufgereinigte DNA war auch zur automatischen Sequenzierung durch LI-COR<sup>®</sup>- oder ABI<sup>®</sup>-Sequenzierautomaten geeignet. Die Produkte der verschiedenen Hersteller waren bezüglich Ausbeute und Qualität austauschbar. Je nach Anwendung wurden Säulen unterschiedlicher DNA-Bindekapazität gewählt und nach den Protokollen der Hersteller verfahren. Da die Puffer den Herstellerangaben entsprachen werden sie nicht gesondert aufgeführt.

Durchführung:

#### **I. Minipräparation mit Nukleobond AX 20-Säulen (Macherey-Nagel, Düren)**

Eine ü.N.-Kultur (2 - 5 ml) wurde pelletiert und in 400 µl Puffer S1 (4°C) resuspendiert. Während einer 5 minütigen Inkubation mit 400 µl Puffer S2 wurden die Zellen lysiert; durch Zugabe von 400 µl Puffer N3 wurde das Lysat präzipitiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis und 20 min Zentrifugation bei 4°C mit 12.000x g konnte der Überstand auf die mit 1 ml Puffer N2 äquilibrierte AX 20-Säule gegeben werden. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml Puffer N3 wurde mit 800 µl Puffer N5 eluiert. Durch eine zweite Elution konnte die Ausbeute erhöht werden. Das Eluat wurde mit Isopropanol gefällt, das Pellet zweimal gewaschen und nach kurzer Trocknung bei RT in 50 µl TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O gelöst.

**Modifiziertes Protokoll:**

Besonders bei SOLR- und XOLR-Bakterienstämmen konnte manchmal nicht in ausreichender Menge und Qualität Plasmid-DNA extrahiert werden. Durch modifizierte Anzuchtbedingungen (siehe Kapitel 2.3.1) in Kombination mit einem veränderten Plasmidextraktions-Protokoll konnte Abhilfe geschaffen werden. Dazu wurden 10 - 11 ml Bakteriensuspension wie oben beschrieben behandelt, aber die Puffervolumina S1, S2 und S3 verdoppelt, ein zusätzlicher Waschschrift eingeführt und generell zweimal eluiert.

**II. Minipräparation mit QIAprep Spin-Säulen (Qiagen, Hilden)**

Eine ü.N.-Kultur (1 - 5 ml) wurden pelletiert und in 250 µl Puffer P1 (4°C) resuspendiert. Während der Inkubation mit 250 µl Puffer P2 (5 min) wurden die Zellen lysiert; das Lysat wurde durch die Zugabe von 350 µl Puffer N3 präzipitiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 10.000x g konnte der Überstand auf die QIAprep Spin-Säulen gegeben werden und durch kurze Zentrifugation (30 - 60 s) durch die Glasfasermembran passagiert werden. Die Säule wurde zweimal mit 750 µl PE-Puffer zentrifugiert und Pufferreste durch erneutes Zentrifugieren ohne Pufferzugabe in einem leerem Auffanggefäß entfernt. Die Elution erfolgte durch Zentrifugation mit 50 - 100 µl TE-Puffer oder sddH<sub>2</sub>O.

**III. Maxipräparation mit Qiatip 500 (Qiagen, Hilden)**

Zunächst wurde eine Vorkultur ausgehend von einer Bakterienkolonie in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum für 6 - 8 h im Schüttelwasserbad inkubiert. Mit der Vorkultur wurden 100 ml Hauptkultur beimpft und weiter inkubiert. Nach 12 - 16 h wurde die Bakterienkultur in ein 250 ml Zentrifugengefäß überführt und für 15 min bei 6.000x g (4°C) pelletiert (Kühlzentrifuge J2-21, Beckman, Rotor JA 14). Nach vollständiger Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Corex-Zentrifugenröhrchen (30 ml) gegeben, 10 ml Puffer P2 zugegeben, mit Nescofilm (Nippon Kaisha Ltd., Osaka Japan) verschlossen, fünf- bis sechsmal invertiert und für höchstens 5 min bei RT belassen. 10 ml Puffer P3 wurde hinzugefügt und das Lysat nach Durchmischen für 20 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4°C mit 20.000x g (Kühlzentrifuge J2-21 Beckman, Rotor JS 13.1) wurde der Überstand durch einen mit Puffer QBT angefeuchteten Faltenfilter (Schleicher und Schüll, Dassel) auf die mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiatip 500-Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Gefällt wurde mit Isopropanol, danach das Pellet zweimal mit 70 %igem EtOH gewaschen und nach Trocknung in 0,5 ml sddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer aufgenommen. Die Säule konnte nach Äquilibration mit Puffer QBT für eine weitere Präparation mit der gleichen DNA innerhalb eines Tages wiederverwendet werden.

## 2.6.7 Aufreinigung von DNA-Gensonden

### I. Über „random priming“ radioaktiv markierte DNA-Sonden

Auch hier wird in Gegenwart chaotroper Salze die DNA an eine Matrix gebunden (QIAquick Spin Kit, Qiagen, Hilden). Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide nach der Markierungsreaktion (siehe Kapitel 2.8.4.1) wurde durchgeführt, um störenden Hintergrund und „hot spots“ nach der Hybridisierung zu minimieren. Außerdem konnte so die Strahlenbelastung in nachfolgenden Arbeitsgängen vermindert werden. Mit Ausnahme des Puffers EB (10 mM Tris-HCl, pH 8) wurden die Pufferzusammensetzungen von Qiagen nicht bekanntgegeben.

Durchführung:

10 Vol. bzw. 5 Vol. (zu reinigendes Fragment  $\geq 100$  bp) Puffer PN wurden zum Markierungsansatz gegeben, gemischt, auf die in einem 2 ml Eppendorfgefäß stehende Säule gegeben und 1 min bei 6.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach Austausch des Gefäßes wurde die Säule zweimal mit 500  $\mu$ l Puffer PE durch erneute Zentrifugation bei 6.000 rpm gewaschen und die Reaktionsgefäße jeweils ausgetauscht. Letzte Pufferreste wurden durch Zentrifugation (13.000 rpm, 3 min) der Säule auf einem leeren Gefäß ohne Zugabe von Puffer entfernt. Nun konnte die Säule auf ein leeres 1,5 ml Gefäß gesetzt werden und die gebundene DNA durch Zugabe von 200  $\mu$ l Puffer EB oder sddH<sub>2</sub>O mittels Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min) eluiert werden. Nach der Denaturierung bei 100°C (5 min) wurde der Ansatz auf Eis gestellt und stand zur Hybridisierung bereit.

### II. Über PCR markierte DNA-Sonden

Um außer Nukleotiden auch Primer, Primerdimere und andere niedermolekulare DNA-Fragmente  $\leq 100$  bp vom PCR-Produkt abzutrennen, wurde ebenfalls der „QIAquick Spin Kit“ verwendet. Die Änderung der Auftrennungseigenschaft wird durch einen anderen Bindepuffer erreicht (Puffer PB statt Puffer PN).

Durchführung:

Zum Reaktionsansatz wurden 5 Vol. Puffer PB pipettiert. Anschließend wurde ebenfalls nach oben beschriebenen Protokoll verfahren. Bei der Aufreinigung nicht-radioaktiver PCR-Produkte war ein einziger Waschschriff mit 750  $\mu$ l Puffer PE ausreichend. Eluiert wurde mit 50  $\mu$ l Puffer sddH<sub>2</sub>O oder Puffer EB.

### 2.6.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Oft war es notwendig - nach PCR-Reaktionen und Restriktionsansätzen - DNA bestimmter Molekülgröße aus einem Gemisch unterschiedlich großer DNA-Fragmente zu trennen. Dazu wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 2.7.2), die gewünschte DNA-Bande mit dem Skalpell aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und bis zur Aufreinigung bei 4°C in einem Eppendorfgefäß gelagert.

#### 2.6.8.1 Elektroelution mittels Dialyseschlauch

Ein Dialyseschlauch (Spectra/POR<sup>®</sup>, Spectrum Mech. Instruments, Los Angeles, USA) wurde durch Aufkochen (10 min) in einer Lösung aus Na-Bicarbonat (2 %, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) vorbereitet. Im Kühlschrank war er in sddH<sub>2</sub>O (mit 0,05 % Na-Azid) über Monate lagerbar. Vor und nach Gebrauch wurde er mit sddH<sub>2</sub>O gespült. Die herausgeschnittene Bande wurde in ein kurzes Stück Dialyseschlauch überführt, 200 µl 0,5x TBE-Puffer zugefügt, der Schlauch mit Gefriertütenclips verschlossen. Bei 4 - 5 V/cm (TBE-Laufpuffer, Schlauch-Längsachse quer zur Feldrichtung) wurde die DNA aus dem Gelfragment eluiert. Nachdem unter UV-Licht keine Ethidiumbromid-Emission mehr im Gelstück feststellbar war, wurde die Richtung des elektrischen Feldes für 30 s umgekehrt, um am Schlauch anheftende DNA wieder zu mobilisieren. Der DNA-haltige Puffer wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, die DNA wurde mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat und 2,5 Vol. abs. EtOH bei -20°C ü.N. gefällt, pelletiert, mit 70 %igem EtOH gewaschen und in einem geringen Volumen sddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### 2.6.8.2 Bindung an Silicamatrix-Suspension (Nucleotrap, Macherey-Nagel, Düren)

Einfacher und schneller in der Handhabung als die Elektroelution war die DNA-Rückgewinnung durch Bindung an eine Silicamatrix in Gegenwart chaotroper Salze. Außerdem konnte hier ein höherer Reinheitsgrad der DNA erzielt werden. Das hier verwendete System war zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten  $\geq 100$  bp geeignet.

Durchführung:

Pro 100 mg Agarose wurden 300 µl Puffer NT1 und pro 1 µg DNA 4 µl Silicamatrix-Suspension, mindestens jedoch 10 µl zusammengefügt und solange kräftig durchmischt (Vortex-Gerät), bis keine Gelstücke mehr sichtbar waren. Nach der Inkubation bei 50°C (10 min), unterbrochen von gelegentlichem Schütteln, wurde die Matrix durch Zentrifugation ( $\geq 12.000$  rpm, 30 s) pelletiert, der Überstand verworfen und die Matrix zweimal in 500 µl Waschlösung NT2 resuspendiert und

pelletiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Puffer NT3 wurden die Puffereste durch nochmaliges Zentrifugieren des Pellets entfernt. Nach Luftrocknung (10 min) wurde das Pellet in 50 µl 2 - 5 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8 - 8,5) aufgenommen und, unterbrochen von gelegentlichem Schütteln, 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Pelletierung stand der DNA-haltige Überstand sofort für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Die eingesetzten Puffer entsprachen den Herstellerangaben und werden nicht gesondert aufgeführt.

## 2.7 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Bei der Elektrophorese werden Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, da die Agarose-Gelmatrix kleineren Molekülen weniger Widerstand bietet als größeren. Um die Größe eines Moleküls zu bestimmen, werden DNA-Marker bekannter Größe mit aufgetragen. Über Ethidiumbromid-Fluoreszenz (siehe Kapitel 2.8.2) können Nukleinsäuren im Gel unter UV-Licht (Transilluminator TF-20.M-Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich) sichtbar gemacht werden. Fotografisch dokumentiert wurde mit einem Sofortbildkamerasystem (Polaroid MP4 Land Camera, Filmtyp 667, Polaroid, Offenbach). Drei verschieden groß dimensionierte Elektrophoreseeinheiten standen zur Verfügung: Zwei für Minigele 7 x 6 cm und 7 x 15 cm (Mini sub cell und Mini wide sub cell, Biorad, München); sowie eine für große Gele 14,5 x 15 cm. Je nach Einsatz wurde eine Spannung zwischen 1 und 6 V/cm angelegt. Als Spannungsquellen dienten Power Pac 300, Biorad, München und PHERO-sTab. 200, Biotec-Fischer, Reiskirchen).

### 2.7.1 DNA-Längenstandards

Alle DNA-Längenstandards wurden bezogen von MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot.

- $\lambda$ -DNA restringiert mit *Eco91* I (Fragmentgrößen von 117 bp bis 8454 bp)
- $\lambda$ -DNA restringiert mit *Eco130* I (Fragmentgrößen von 74 bp bis 19329 bp)
- $\lambda$ -DNA restringiert mit *Eco130* I und *Mlu* I (Fragmentgrößen von 74 bp bis 26282 bp)
- $\lambda$ -DNA restringiert mit *Hind* III (Fragmentgrößen von 125 bp bis 23130 bp)
- 100 bp ladder Plus (Fragmentgrößen von 100 bp bis 3000 bp)

### 2.7.2 Nicht denaturierende Gelelektrophorese von DNA

Je nach Größe des Gels und Größe der zu trennenden DNA-Fragmente (siehe Tab. 2) wurde die geeignete Menge Agarose (Qualex gold<sup>®</sup>, AGS, Heidelberg) in 30 ml, 60 ml oder 120 ml 0,5x TBE- oder 1x TAE-Puffer suspendiert und im Mikrowellenofen (Micro Chef FM 350, Moulinex) zur vollständigen Lösung gebracht. Verdampfte Wasseranteile wurden durch  $\text{ddH}_2\text{O}$  ersetzt und das Gel nach Abkühlung auf 50°C in den Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x Probenpuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei 60 bis 100 V (4 - 7 V/cm) elektrophoretisch aufgetrennt.

Für die Untersuchung von restringierter Plasmid-DNA und PCR-Produkten kamen in der Regel TBE-Minigele zum Einsatz, restringierte genomische DNA aus Gerste wurde bei verminderter Spannung 25 V (1,25 V/cm) für etwa 18 bis 20 h in großen (14,5 x 15 cm) 0,7 %igen TAE-Gelen aufgetrennt. In TAE-Puffer verläuft die Elektrophorese von doppelsträngiger DNA um etwa 10 % schneller als in TBE-Puffer (SAMBROOK et al. 1989). In das Anoden-Pufferreservoir der Elektrophoresekammer wurde zusätzlich Ethidiumbromid (1 µg/ml TAE- oder TBE-Puffer) gegeben. Die Elektrophorese wurde beendet, kurz bevor die Bromphenolblaufront das Gelende erreicht hatte. Bei einem 1 %igen Agarosegel entspricht die Mobilität von Bromphenolblau in etwa der DNA von 300 bp Länge.

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

**Tab. 2: Übersicht zur Gelstärke in Abhängigkeit von der Größe aufzutrennender DNA-Fragmente.**

1x TBE-Puffer:	89 mM	Tris
(10x konz. ansetzen)	89 mM	Borat
	2 mM	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$
	→	pH 8
1x TAE-Puffer:	40 mM	Tris
(50x konz. ansetzen)	5,71 %	Eisessig
	1 mM	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$
	→	pH 8
6x Probenpuffer	30 %	Glyzerin
	0,25 %	Xylencyanolblau (optional)
	0,25 %	gesättigtes Bromphenolblau
	0,4 mg/ml	Ethidiumbromid
		in 0,5x TBE- oder 1x TAE Puffer

### 2.7.3 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Da RNA häufig in Sekundärstrukturen vorliegt, mußten diese auch während der Elektrophorese dauerhaft entspannt werden. Deshalb wurde die RNA unter Einwirkung von Formaldehyd (FA) aufgetrennt (LEHRACH et al. 1977). Eingesetzt wurde ein nach SCHOCK (1995) und QIAGEN (1997) abgewandeltes Protokoll. Zur Abschätzung des Molekulargewichts diente die ribosomale RNA (rRNA) der RNA aus der Gerste. Die beiden größten Vertreter der rRNA, cytosolische 25 S- und 18 S rRNA konnten nach Vergleich mit *E. coli*-rRNA bekannter Länge als Marker für 4 und 2 kb lange einzelsträngige RNA verwendet werden (MEYER 1994).

#### Durchführung

Die folgenden Lösungen wurden mit  $\text{sddH}_2\text{O}$  angesetzt:

10x MOPS-Puffer:	200 mM	MOPS
	50 mM	Na-Acetat
	10 mM	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$
	→	pH 7 mit NaOH
	→	Sterilfiltrieren
1x FA-Elektrophoresepuffer:	100 ml	10x MOPS-Puffer
	20 ml	37 % Formaldehyd
	880 ml	$\text{sddH}_2\text{O}$
5x FA-Probenpuffer:	50 $\mu\text{l}$	gesättigtes Bromphenolblau
	720 $\mu\text{l}$	37% Formaldehyd
	3084 $\mu\text{l}$	Formamid
	4 ml	10x MOPS-Puffer
	2 ml	Glyzerin

Herstellung des 1,2 %igen FA-Gels (7 x 15 cm):

FA-Gel:	63,45 ml	$\text{sddH}_2\text{O}$
	0,9 g	Agarose

Nach dem Aufkochen verdampftes Volumenanteile mit  $\text{sddH}_2\text{O}$  ergänzen, auf 65°C abkühlen lassen und unter dem Abzug zugeben:

4,5 ml	37 % Formaldehyd
7,5 ml	10x MOPS-Puffer
0,5 $\mu\text{l}$	10 mg/ml Ethidiumbromid

Das erstarrte Gel wurde für 30 min bei 15 - 20 V (1 - 1,5 V/cm) in den Elektrophoresepuffer (1x FA) äquilibriert und zum Elektrophoresepuffer wurden noch 0,5  $\mu\text{l}$

Ethidiumbromid (10 mg/ml) gegeben. Alle Proben wurden mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  und 1/5 Vol. 5x FA-Probenpuffer auf das gleiche Endvolumen gebracht und zur Beseitigung der RNA-Sekundärstrukturen in für 5 min bei  $65^\circ\text{C}$  erhitzt. Nach schneller Abkühlung im Eisbad und anschließender Zentrifugation wurden die Proben aufgetragen und bei 65 V (4,6 V/cm) für 90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Ungleichmäßiges Auftrennungsverhalten (Treppeneffekt) der RNA konnte durch Pufferkühlung und Pufferzirkulation (Peristaltikpumpe, Peristaltic Pump P-1, Pharmacia, Freiburg) während der Elektrophorese vermieden werden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zweimal für 2 - 5 min mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen, um überschüssiges Formaldehyd zu entfernen, und mittels UV-Transilluminator die Qualität der RNA beurteilt.

## 2.8 Nukleinsäure-Nachweismethoden

### 2.8.1 Photometrische Bestimmung

Standardmäßig wurden Nukleinsäuren photometrisch quantifiziert. Die Methode beruht auf der Absorption (A) von UV-Licht durch die Nukleinsäuren in einem Wellenlängenbereich zwischen 250 und 270 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Ein  $A_{260}$ -Wert von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$  bzw. einer RNA-Konzentration von  $40 \mu\text{g/ml}$  (SAMBROOK et al. 1989). Da Verunreinigungen das Absorptionsverhalten beeinflussen, kann die Nukleinsäurequalität durch Erfassen eines Absorptionsspektrums zwischen 200 und 300 nm oder Messungen bei 230 nm (Absorptionsminimum), 260 nm (Absorptionsmaximum) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren in Proteinen) abgeschätzt werden. Eine reine Präparation liegt dann vor (SAMBROOK et al. 1989), wenn sich der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  ( $Q_{260/280}$ ) für DNA-Lösungen zwischen 1,8 und 1,9 und für RNA-Lösungen zwischen 1,9 und 2,0 bewegt. Jeweils niedrigere Werte sprechen für eine Verunreinigung mit Phenolen und/oder Proteinen. Werte für DNA  $\geq 2,0$  weisen auf einen hohen RNA-Anteil hin.

Durchführung:

Ein definiertes Volumen DNA- oder RNA-Lösung, meist 5 bzw. 4  $\mu\text{l}$  wurde mit 995 bzw. 996  $\mu\text{l}$  10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 gemischt und gegen den reinen Puffer als Referenz bei 260 nm in einer Quarzglasküvette gemessen (Spektralphotometer Typ U-1100, Hitachi). Für quantitative Bestimmungen wurden die Messungen in Puffer durchgeführt, da ansonsten durch Luft- $\text{CO}_2$  der pH-Wertes sinkt und dadurch das Absorptionsverhalten von DNA verändert wird (SAUER et al. 1998).

## **2.8.2 Ethidiumbromidfärbung**

An Nukleinsäuren gebundenes Ethidiumbromid (EthBr) emittiert nach Anregung mit UV-Licht (312 nm) sichtbares Licht einer Wellenlänge von 590 nm. Aufgrund der stöchiometrischen Interkalation des EthBr können Nukleinsäuren im Agarosegel quantifiziert werden.

### **2.8.2.1 Densitometrische Bestimmung**

Die Menge der EthBr-gefärbten Nukleinsäure wurde nach der Gelelektrophorese im Vergleich mit einem Mengenstandard bestimmt. Hierzu wurde das Gelphoto mit einem Flachbettscanner digitalisiert und die einzelnen Banden konnten mittels geeigneter Software (Aida2.0, Raytest, Straubenhardt) über ihre Fläche integriert und quantifiziert werden.

### **2.8.2.2 Ethidiumbromid-Platten-Assay**

Mit dieser Methode konnten insbesondere geringe Nukleinsäurekonzentrationen bestimmt werden. Agarose (0,8 %) wurde in TBE-Puffer (0,5x) geschmolzen, nach Abkühlen auf 50°C wurde EthBr (Endkonzentration 1 µg/ml) zugegeben und die Agarose-Lösung in Petrischalen (Ø 9 cm) gegossen. Nach dem Erstarren wurden zwei unabhängig voneinander hergestellte Konzentrationsreihen von 5 bis 200 ng aufgetragen (1 µl je Konzentrationsstufe). In die Nähe der vermuteten Konzentrationsstufe wurde die zu quantifizierende Nukleinsäurelösung aufgetragen und nach 5 min konnte die Nukleinsäurekonzentration unter UV-Licht durch Vergleich mit den Konzentrationsreihen abgeschätzt oder densitometrisch bestimmt werden.

## **2.8.3 Blotting von Nukleinsäuren**

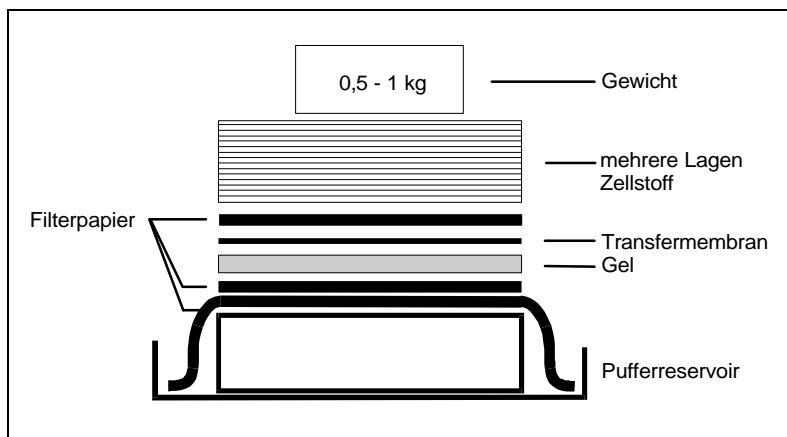
Um mittels Hybridisierung markierter DNA-Sonden Zielsequenzen nachweisen zu können, war es notwendig, diese zuvor auf geeigneten Membranen zu immobilisieren.

### **2.8.3.1 Northernblot**

Der Northernblot-Transfer erfolgte nach MEYER (1994). Nach der Elektrophorese und der Dokumentation wurde das Gel mit dem Skalpell auf den zu blottenden Bereich zurechtgeschnitten, eine Nylon-Transfermembran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) passender Größe wurde mit ddH<sub>2</sub>O benetzt und in 2x SSC gelegt. Das Filterpapier (GB 003, Schleicher und Schüll, Dassel) wurde mit 2x SSC getränkt, der Blot gemäß

Abb. 4 aufgebaut und das Pufferreservoir mit 50 mM NaOH gefüllt. Der Transfer der Nukleinsäuren auf die Membran erfolgte über 3 - 4 h. Danach wurde die Lage der Membran zum Gel markiert, die Membran für 2 min in 2x SSC gespült und für 2 min UV-Licht 254 nm ausgesetzt. Nach Trocknung konnten die RNA-Blots für mehrere Monate bei RT in Plastikboxen gelagert werden.

20x SSC:      3 M    NaCl  
                   0,3 M    Na-Citrat  
                   →    pH 7



**Abb. 4:** Darstellung des Aufbaus für einen Kapillarblot.

### 2.8.3.2 Dotblot

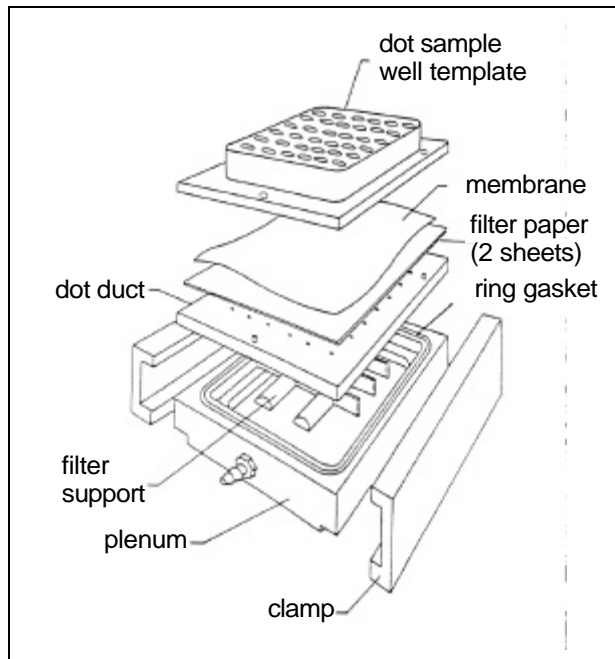
Das folgende Protokoll wurde nach MEYER (1994) durchgeführt. 20 µl RNA wurden zu 58 µl Denaturierungspuffer gegeben, gut gemischt, 10 min bei 65°C inkubiert und schnell im Eisbad abgekühlt.

Denaturierungspuffer:    700 µl    37% Formaldehyd  
                                   2 ml      Formamid  
                                   200 µl    20x SSC

Nach Zugabe von 2 Vol. 20x SSC, vollständigem Durchmischen und Zentrifugieren wurden die Proben auf Eis gestellt. Die Filterpapiere (GB 003, Schleicher und Schüll, Dassel) wurden wie die mit sddH<sub>2</sub>O benetzte Nylonmembran mit 20x SSC getränkt. Die Dotblot-Einheit (MilliBlot<sup>TM</sup>-V, Millipore, Eschborn) wurde entsprechend Abb. 5 montiert.

Alle Probenkammern wurden mit 500 µl 10x SSC gefüllt und der Puffer durch die Membran hindurch mit 100 mbar Unterdruck abgesaugt. Kurz vor Auftrag der Proben wurde dieser Vorgang nochmals wiederholt und danach die Kammern mit den Proben befüllt. Wieder wurde Unterdruck angelegt und die Kammern leergesaugt. Zum Schluß wurden die Kammern noch zweimal mit 10x SSC gewaschen und nach dem zweiten Waschschrift für 5 - 10 min trockengesaugt. Zur

Fixierung wurde die RNA für 5 min in 50 mM NaOH gelegt, dann für 2 min in 2x SSC gespült und 2 min mit UV-Licht bestrahlt. Die Membran konnte nach Trocknung mehrere Monate bei RT in einer Plastikbox gelagert werden.



**Abb. 5: Aufbau der Vakuumblot-Apparatur für Dotblots.**

### 2.8.3.3 Southernblot

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter DNA auf Membranen zur Immobilisierung für die nachfolgende Hybridisierung mit Gensonden wurde nach REED & MANN (1985) durchgeführt. Hierbei wird unter alkalischen Bedingungen per Kapillartransfer geblottet.

#### Durchführung:

Das Gel wurde nach der Dokumentation mit einem Skalpell auf die Größe des zu blottenden Bereiches reduziert. Eine mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  benetzte Membran (Hybond  $\text{N}^+$ , Amersham) wurde in Transferpuffer (0,4 N NaOH) äquilibriert. Der Blot wurde entsprechend Abb. 4 aufgebaut und dabei das Filterpapier (GB 003, Schleicher und Schüll, Dassel) mit Transferpuffer befeuchtet. Vor dem Blotting erfolgte noch ein Depurinierungsschritt zur Fragmentierung hochmolekularer DNA, um einen schnelleren Transfer zu gewährleisten (WAHL et al. 1979). Das Gel wurde in 0,25 N HCl gegeben und nach dem Farbumschlag des Bromphenolblau zu gelb für 10 min depuriniert. Danach wurde es für 2 min in  $\text{ddH}_2\text{O}$  geschwenkt und im Blotaufbau gemäß Abb. 4 für 3 - 4 h geblottet. Nach Ende der Transferzeit wurde die Lage der Membran zum Gel markiert und die Membran 10 min in 2x SSC gespült. Die Aufbewahrung erfolgte im Gegensatz zu den Northernblot-Membranen naß in 2x SSC durch Einschweißen im PP-Hybridisierungsschlauch, um einem Auftreten von „hot spots“ in der nachfolgenden Hybridisierung vorzubeugen.

## 2.8.4 Radioaktive Markierung von Gensonden

### 2.8.4.1 „Random primed“-Markierung

Als Matrizen-DNA wurden aufgereinigte Insertfragmente verwendet. Die Markierung mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP erfolgte nach der von FEINBERG & VOGELSTEIN (1984) entwickelten Methode des „random primed labeling“. Dabei dient eine Mischung synthetisch hergestellter oktamerer Oligonukleotide mit zufälliger Basenanordnung als Primer für die Synthese ca. 200 bp langer DNA-Fragmente. Durch Verwendung des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli* wird ein Abbau des Syntheseprodukts verhindert (KLENOW & HENNINGSEN 1970). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Markierungsmethode hauptsächlich beim Screening von cDNA-Bibliotheken und Southernblot-Experimenten eingesetzt.

Durchführung:

Eingesetzt wurde das „RadPrime DNA Labeling“-System (Gibco Life Technologies, Eggenstein). Die Matrizen-DNA (40 - 60 ng) wurde mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf 21  $\mu\text{l}$  ergänzt, denaturiert (95°C, 5 min) und auf Eis gestellt. Folgende Reagenzien wurden hinzugefügt und durchmischt:

Markierungsansatz:	1 $\mu\text{l}$	dCTP (0,5 mM)
	1 $\mu\text{l}$	dGTP (0,5 mM)
	1 $\mu\text{l}$	dTTP (0,5 mM)
	20 $\mu\text{l}$	Reaktionspuffer/Primermix (2,5x)
Im Isotopenlabor:	5 $\mu\text{l}$	[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP (3000 Ci/mmol)
	1 $\mu\text{l}$	Klenow-Fragment-Lösung

Nach der Synthese (37°C, 30 min) wurde die Sonden-DNA aufgereinigt (siehe Kapitel 2.6.7), ein Aliquot zur Bestimmung der Effizienz der radioaktiven Markierung (siehe Kapitel 2.8.5) entnommen, die Sonden-DNA denaturiert (95°C, 5 min) und ins Eisbad gestellt. Die DNA wurde entweder sofort zur Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

### 2.8.4.2 Radioaktive Markierung mittels PCR

Im Gegensatz zur „random primed labeling“-Methode können über die PCR-Amplifikation Zielsequenzen innerhalb von Klonierungsvektoren (ohne vorherige Restriktion, elektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung) radioaktiv markiert werden. Auch Zielsequenzen genomischer DNA sind zur gezielten PCR-Amplifikation von DNA-Sonden geeignet.

Da das markierte Nukleotid den limitierenden Faktor<sup>4</sup> darstellt, muß hierbei das herkömmliche PCR-Protokoll (siehe Kapitel 2.9.2) so abgewandelt werden, daß dem extremen Ungleichgewicht zwischen markierten (0,825 µM) und unmarkierten (200 µM) Nukleotiden einer Standard-PCR-Reaktion entgegengewirkt wird. Eine PCR-Amplifikation wird durch ein Ungleichgewicht von Nukleotiden ungünstiger als 1:30 inhibiert (MERTZ & RASTCHIAN 1994). Bis zu einem Verhältnis von bis zu 1:8 werden noch akzeptable Ausbeuten an PCR-Produkt erreicht, daher sollte der Anteil der drei nicht-markierten Nukleotide entsprechend auf jeweils 25 µM verringert werden (MERTZ & RASTCHIAN 1994). Das Ungleichgewicht kann gemildert werden durch die Zugabe nicht-markierten dATP zum limitierenden [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP, außerdem kann dann der Anteil des radioaktiven Nukleotids noch vermindert werden: Statt 0,825 werden nur 0,165 µM [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP (50 bzw. 10 µCi) zusammen mit 20 µM unmarkiertem dATP eingesetzt, von den drei übrigen Nukleotiden werden jeweils 200 µM eingesetzt (Dr. Hans Joos, Institut für Humangenetik, Justus Liebig-Universität, Gießen). Nachteilig ist hier allerdings die niedrigere spezifische Aktivität. In dieser Arbeit wurde daher ein Protokoll entwickelt, das die Vorzüge beider Methoden, Einsatz von möglichst wenig Aktivität (12,5 µCi) bei möglichst hoher spezifischen Aktivität, vereinigt. Auf diese Weise wurden isotypspezifische DNA-Sonden < 200 bp für Northernblot-Untersuchungen hergestellt. Matrizen-DNA dieser geringen Molekülgröße sollte nicht im „random priming“-Ansatz eingesetzt werden (technische Informationen, Gibco Life Technologies, Eggenstein).

#### Durchführung:

Im 25µl-Reaktionsansatz waren 12,5 µCi [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP (0,167 µM) und unmarkiertes dATP (20µM) enthalten, die übrigen Nukleotide wurden je nach Template-Länge (150 - 650 bp) im sechsfachen Überschuß (125 µM) oder nur im zweifachen Überschuß (40 µM bei 1,8 kb Template-Länge) zugegeben. Die spezifische Aktivität konnte ggf. durch Erhöhung des [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP-Anteils erhöht werden, in der Regel wurden 12,5 µCi eingesetzt. Weniger kritisch war die Menge der eingesetzten Template-DNA, hier wurden maximal bis zu 25 ng eingesetzt. Die PCR wurde mit 40 Zyklen (Tab. 3, Kapitel 2.9) durchgeführt. Entsprechend der Anzahl durchzuführender Markierungsreaktion wurde ein Vielfaches des folgenden Ansatzes (umrahmt) hergestellt.

---

<sup>4</sup> Im 20µl-Ansatz entsprechen 50µCi [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP (3000 Ci/mmol) einer Menge von 0,825 µM.

25 µl-Reaktion: (mit 12,5 µCi)	0,5 µl	(20 µM)	dATP (1 mM)
	0,3125 µl	(125 µM)	dCTP (10 mM)
	0,3125 µl	(125 µM)	dGTP (10 mM)
	0,3125 µl	(125 µM)	dGTP (10 mM)
	0,25 µl	(20 µM)	Primer 1 (100 µM)
	0,25 µl	(20 µM)	Primer 2 (100 µM)
	ad 6,25 µl		sddH <sub>2</sub> O
Im Isotopenlabor:	1,25 µl		[ $\alpha^{32}$ P]dATP (3000 Ci/mmol)
	5 µl	max. 25 ng	Template
	12,5 µl		Mastermix 2 (siehe Kapitel 2.9.2)

### 2.8.4.3 Digoxigenin-Markierung von DNA-Sonden und Detektion

Um den Umgang mit radioaktiven Isotope zu minimieren, wurden erste Versuche mit nicht-radioaktiven Nachweismethoden unternommen. Die Markierung erfolgte durch „random priming“ oder PCR, statt [ $\alpha^{32}$ P]dATP wurde jedoch Digoxigenin (DIG)-markiertes dUTP eingesetzt. Die nach der Hybridisierung an die Zielsequenz gebundene Sonde konnte über einen Anti-DIG-Antikörper detektiert werden, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Durch enzymatische Umsetzung eines Substrats kann je nach Substrat eine Farbreaktion oder Lichtemission erzeugt werden.

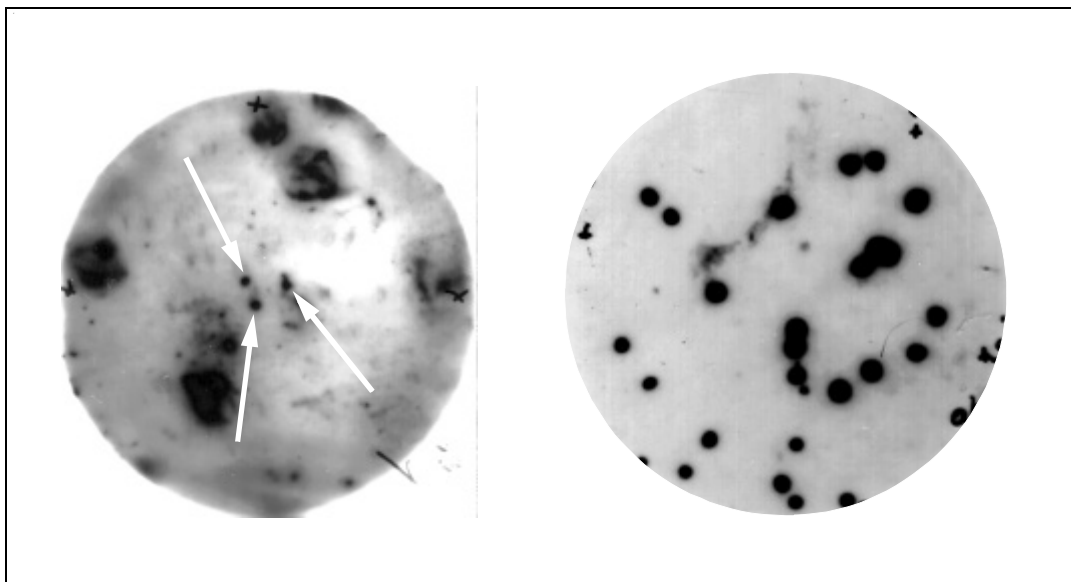
#### Durchführung:

Die DNA-Sonden wurden mit dem „DIG-DNA Labeling-Kit“ (Boehringer, Mannheim) bzw. mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ des gleichen Herstellers nach Arbeitsvorschrift hergestellt. Nach dem Denaturieren (65°C, 10 min) und Abkühlen auf Eis wurde die Effizienz der Markierung gemäß der Herstellerangaben über „Quantification Strips“ und „Control Strips“ mittels colorimetrischen Detektionsprotokoll überprüft. Die Sonde wurde in einer Konzentration von 20 ng/ml Hybridisierungspuffer eingesetzt, die Hybridisierung und Stringenzwaschung erfolgte wie in Kapitel 2.8.6.1 beschrieben mit dem Unterschied, daß der Hybridisierungspuffer mit 20 % (v/v) „blocking reagent“ ergänzt wurde (The DIG System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer, Mannheim).

Nach den stringenten Waschschritten wurden die Membranen in DIG-Waschpuffer bei 4°C gelagert oder sofort weiterbehandelt. Nach Äquilibration (1 min) in DIG-Waschpuffer und Blockierung (1 h) in Maleat-Puffer mit 1 % Blocking-Reagenz wurden die Membranen mit Antikörper (1:10.000) in Maleat-Puffer inkubiert (RT, 30 min). Überschüssige Antikörper wurden durch Inkubation mit DIG-Waschpuffer (zweimal 15 min) entfernt und 5 min in Detektionspuffer äquilibriert. Danach wurden 10 - 20 Tropfen Substratlösung (CSPD<sup>®</sup>-ready to use) auf die feuchte Membran getropft, diese in PP-Folie eingeschweißt, 10 min bei 37°C inkubiert und die Signale durch Röntgenfilm-Exposition für 10 - 60 min detektiert. Alle Puffer wurden

entsprechend den Herstellerangaben (Boehringer, Mannheim) hergestellt und werden nicht gesondert aufgeführt.

Probleme bereitete die genaue Quantifizierung über die „Control Strips“, außerdem war der Hintergrund oft derart stark, daß die Signale nur schlecht erkennbar waren (siehe Abb. 6). Daher wurde diese Detektionsmethode nur bei sekundären Screenings von cDNA-Bibliotheken angewandt. Die Vorteile lagen in der Vermeidung jeglicher Strahlenbelastung, im Zeitgewinn, Wiederverwendung und Lagerfähigkeit der auf diese Weise markierten Sonde. Weitere Optimierungsversuche mit genauerer Bestimmung der Markierungseffizienz und Variationen in der Blockierungsmethode vor der Antikörperinkubation könnten das Signal-Hintergrund-Verhältnis verbessern.



**Abb. 6: Signal- Hintergrundverhältnis zweier unabhängiger Plaquelifts aus einem sekundären Screening.**

Links: Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde mit positiven Signalen (Pfeile). Rechts: Hybridisierung mit radioaktiv-markierter Sonde, die deutlich sichtbaren positiven Signale sind nicht gesondert bezeichnet.

### 2.8.5 Flüssigszintillations-Zählung

Da in der vorliegenden Arbeit Expressionsanalysen mit verschiedenen, über PCR generierten DNA-Gensonden durchgeführt wurden, sollten die verschiedenen Hybridisierungsansätze auch Sonden vergleichbarer spezifischer Aktivität enthalten. Die Energie radioaktiver Zerfallsereignisse wird bei der Flüssigszintillations-Zählung durch die besondere Zusammensetzung des Szintillationscocktails in Lichtemission umgewandelt und kann durch einen Photomultiplier detektiert werden.

**Durchführung:**

Ein Aliquot des Markierungsansatzes (2 µl) wurde mit 498 µl TE-Puffer (pH 8) verdünnt, davon 5 µl auf ein Glasfaserfilter (GF 50, Glasfaser-Rundfilter, Schleicher & Schüll, Dassel) aufgetropft und der Filter dreimal in eiskaltem TCA-Puffer (10 % (w/v) Trichloracetat, 1 % (w/v) Na-Pyrophosphat) und einmal in abs. EtOH gewaschen. Der getrocknete Filter wurde in einem Minivial mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versehen und für 10 min in einem Flüssigszintillationszähler (Beckman LS 6000 SC, Beckman Instruments) mit den Geräteparametern für <sup>32</sup>P Zerfall gemessen.

**2.8.6 Hybridisierung von Nukleinsäuren**

Die auf die Membran übertragene und immobilisierten Nukleinsäure wird mit Sonden-DNA inkubiert. Über sequenzhomologe Basenpaarungen der Sonde mit spezifischen DNA-Fragmenten oder RNA-Transkripten können dann Gensequenzen nachgewiesen werden.

**2.8.6.1 Hybridisierung von Northernblots und Plaquelifts**

Hier wurde nach CHURCH & GILBERT (1984), modifiziert nach einem Protokoll von Biorad, München verfahren. Unspezifische Bindungen der Gensonden wurden durch hohen SDS-Gehalt im Puffer blockiert.

**Durchführung:**

Die Membranen wurden mindestens 15 min mit vorgewärmtem Hybridisierungspuffer benetzt und bei einer Hybridisierungstemperatur von 65°C prähybridisiert. Danach wurde der Puffer durch 5 - 6 ml frischen Hybridisierungspuffer, dem zuvor die denaturierte Sonden-DNA zugegeben wurde, ausgetauscht. Es erfolgte eine Inkubation im Hybridisierungs-ofen (Hybridization Oven, Appligene, Heidelberg) oder Schüttelwasserbad für 18 - 20 h. Wenige Membranen konnten nebeneinander im Hybridisierungsröhrchen inkubiert werden. Plaquelift-Membranen wurden bis zu einer Anzahl von 20 übereinander in einer Petrischale im Schüttelwasserbad hybridisiert. Für 20 Membranen (90 mm Ø) wurden 20 - 25 ml Puffer eingesetzt. Auf den Einsatz von Nylonnetzen wurde verzichtet, da sonst „hot-spot“-Effekten auftreten konnten. DIG-dUTP-markierte Sonden-DNA wurde in gleicher Weise eingesetzt, der Hybridisierungspuffer enthielt jedoch zusätzlich 20 % „Blocking-Reagent“ (DIG System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer, Mannheim).

Hybridisierungspuffer:	0,5 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	7 % (w/v)	SDS
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	→	pH 7,2 (mit 10 N NaOH eingestellt)

#### Waschbedingungen:

Zunehmende Stringenzbedingungen wurden über abnehmende SDS-Konzentrationen sowie die Dauer der Waschschrte gesteuert. Nach der Hybridisierung wurden die Plaquelift-Membranen in Waschlösung I (Hybridisierungsröhrchen 60 ml, große Glaspetrischalen 250 ml) überführt und bei Hybridisierungstemperatur jeweils 15 und 10 min gewaschen. Danach wurde einmal mit Waschlösung II (5 - 20 min) bei gleicher Temperatur gewaschen.

Membranen aus Northern- und Dotblots wurden stringenter behandelt: Mit Waschlösung I wurde jeweils 20 und 15 min und mit Waschlösung II zweimal 15 min bei Hybridisierungstemperatur gewaschen.

Nach der Waschprozedur wurden die Membranen feucht in PP-Hybridisierungsschläuche eingeschweißt und konnten exponiert werden (siehe Kapitel 2.8.7).

Waschlösung I:	40 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5 % (w/v)	SDS
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	→	pH 7,2 (mit 10 N NaOH eingestellt)

Waschlösung II:	40 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 % (w/v)	SDS
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	→	pH 7,2 (mit 10 N NaOH eingestellt)

### 2.8.6.2 Hybridisierung von Southernblots

Das oben beschriebene Hybridisierungsprotokoll wurde von LENNERZ (1997) und STENGER (1998) modifiziert, um neben einem geringeren Hintergrund auch eine ausreichende Signalstärke zu erhalten. Es wurden im Vergleich zu Northernblot-Hybridisierung unter weniger stringente Bedingungen hybridisiert und gewaschen, um auch potentiell stärker variable Isotypen nachweisen zu können.

#### Durchführung:

Die nach dem Blotten in 2x SSC aufbewahrte Membran wurde mindestens 48 h bei 37°C mit Southern-Hybridisierungspuffer im Hybridisierungsröhrchen prähybridisiert. Danach wurde der Puffer durch 10 ml frischen Hybridisierungspuffer, dem zuvor die radioaktiv markierte und denaturierte Sonden-DNA zugegeben wurde, ausgetauscht und für 20 - 24 h im Hybridisierungsofen bei 37°C inkubiert.

Southern-Hybridisierungspuffer:	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	7 % (w/v)	SDS
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	40 % (v/v)	Formamid
	5x	Denhardt-Lösung
	5x	SSC
	→	pH 7,2 (mit 10 N NaOH eingestellt)
Denhardt-Lösung:	1 % (w/v)	Ficoll 400
	1 % (w/v)	PVP
	1 %	BSA

#### Waschbedingungen:

Zunehmende Stringenzbedingungen wurden über abnehmende Salz- und SDS-Konzentrationen sowie durch Erhöhung der Temperatur gesteuert. Nach der Hybridisierung wurde zweimal mit Southern-Waschpuffer I gewaschen (RT, 15 min und 10 min) und einmal mit Southern-Waschpuffer II (55°C, 2 - 5 min). Danach wurden die Southernblot-Membranen feucht in PP-Hybridisierungsschlauch eingeschweißt und konnten exponiert werden (siehe Kapitel 2.8.7).

Southern-Waschpuffer I:	100 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5 % (w/v)	SDS
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	→	pH 7,2 (mit 10 N NaOH eingestellt)
Southern-Waschpuffer II:	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 % (w/v)	SDS
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	→	pH 7,2 (mit 10 N NaOH eingestellt)

## 2.8.7 Nachweis der Hybridisierungssignale

Hybridisierungen markierter Sonden-DNA mit auf Membranen immobilisierten Nucleinsäuren wurden entweder durch Röntgenfilmmexposition oder über „phosphoimaging“ dokumentiert.

### 2.8.7.1 Röntgenfilmmexposition

Auf Filterpapier oder Karton fixierte Membranen bzw. in Folie eingeschweißte Gele wurden in Autoradiographie-Kassetten gelegt, in der Dunkelkammer wurde der Röntgenfilm (Cronex 4, DuPont, Bad Homburg oder Kodak X-OMAT AR) positioniert und je nach Signalstärke wenige Stunden bis 14 d exponiert. Nachweise mittels enzymatischer Chemilumineszenz (siehe Kapitel 2.8.4.3) konnten schon nach wenigen Minuten Exposition bei RT

durchgeführt werden. Bei [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP-markierter DNA mußte zusätzlich mit einem hinter dem Röntgenfilm positionierten Verstärkerscreen (Cronex Lightning Plus, Dupont, Wilmington, USA) bei  $-74^\circ\text{C}$  exponiert werden.

### 2.8.7.2 Nachweis über „Phosphoimaging“ und Auswertung

Autoradiographische Auswertungen wurden auch mit einem Phosphoimager (BAS 1500, raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt) durchgeführt. Exponiert werden wieder verwendbare „Imaging Plates“ (IPs, BAS-MP 2025P) (MIYAHARA 1989), die einseitig mit  $\text{BaF}(\text{Br}):\text{Eu}^{2+}$ -Kristallen beschichtet sind. Durch einen Zusammenstoß mit  $\beta$ -Teilchen aus der Probe erfolgt an dieser Stelle der Schicht ein Übergang des Elektrons vom Grundzustand in den metastabilen Zustand, in dem es verbleibt. Durch Rotlichtanregung eines Laserstrahls erfolgt der Übergang in einen instabilen höheren Energiezustand, unter Blaulichtemission (Photo-stimulierte Lumineszenz, PSL) wird wieder der Grundzustand erreicht. Die Blaulichtemission wird mit einem Photomultiplier erfaßt. Ein Teil der Elektronen verbleibt noch im metastabilen Zustand, nach Weißlichtbestrahlung im „Eraser“ ist der Grundzustand wieder erreicht und die IP zur erneuten Exposition bereit. Im Gegensatz zur Röntgenfilm-Autoradiographie kann eine 100-fach höhere Sensitivität, verbunden mit einem weitaus größerem Linearitätsbereich (MORI & HAMAOKA 1994) erreicht werden.

Die Bildauflösung konnte zwischen 100 oder 200  $\mu\text{m}$  variiert werden, die Abstufung des Signalumfangs (Feinheit der Grauwertabstufung) konnte durch Einstellung der Farbtiefe auf 8 oder 12 Bit eingestellt werden. In der Regel wurde eine Auflösung von 200  $\mu\text{m}$  und eine Farbtiefe von 12 Bit gewählt. Meistens waren bereits nach 60 min Exposition mit der „imaging plate“ Signale dokumentierbar. Eine Überexposition war bei der Art der hier durchgeführten Markierung (Signalstärke ca. 50 cps) nicht zu befürchten. Zugunsten eines feinkörnigeren Bildhintergrunds wurden deshalb in der Regel die Expositionszeiten auf zwei bis drei Tage ausgedehnt. Da das Phosphoimager-System einen wesentlich höheren linearen Dynamikbereich als ein Röntgenfilm abdeckt, hatte dies keinen Einfluß auf quantitative Untersuchungen. Die Signale wurden als „photostimulated luminescence“ (PSL)-Daten ausgegeben, die über die software Aida2.0 densitometrisch analysiert werden konnten. PSL-Werte von Dotplot-Analysen wurden nach Subtraktion des Hintergrundsignals (Bkg.) als auf die Fläche bezogene Intensität (Int.-Bkg./Area [PSL/ $\text{mm}^2$ ]) dargestellt, da durch die Dotplot-Apparatur eine einheitliche Größe der Signalfächen vorgegeben war. Bei unterschiedlich großen Banden-Signalen wurde dagegen lediglich das Hintergrundsignal abgezogen (Int.-Bkg. [PSL]).

## 2.9 PCR-Anwendungen

### 2.9.1 Reverse Transkription von RNA

Mittels Reverser Transkription ist es möglich, RNA-Transkripte in cDNA umzuschreiben, die dann über PCR-Amplifikation weiter charakterisiert werden kann. Durch die Auswahl geeigneter Primer können entweder die gesamte Population der mRNA oder gezielt definierte mRNA-Sequenzbereiche revers transkribiert werden.

Durchführung:

Die cDNA-Synthese erfolgte nach einem Protokoll von Gibco Life Technologies, Eggenstein. Zunächst wurde die RNA zur Entfernung von Sekundärstrukturen für 10 min auf 70°C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Danach konnte der Reaktionsansatz mit Ausnahme der Reversen Transkriptase zugegeben werden. Nach einem Annealing-Schritt (42°C, 2 min) wurde die Reverse Transkriptase zugegeben und 1 h bei 42°C inkubiert. Nach Hitzedenaturierung (70°C, 15 min) und der optionalen Behandlung mit RNase H (Stratagene, Heidelberg; 1 U, 37°C, 20 min) wurde der Ansatz mit 20 µl sddH<sub>2</sub>O versetzt, um die Ionenkonzentration für anschließende Experimente zu verringern. Von diesem Ansatz kamen 2 - 5 µl für die PCR zum Einsatz.

Reaktionsansatz (rev. Transkription):	x µl	gRNA (5 µg) oder mRNA (0,5 µg)
(20 µl)	2 µl	sequenzspezifischer Primer (25 µM)
<u>oder statt sequenzspez. Primer:</u>	1 µl	Oligo d(T)-Primer (0,5 µg/µl)
	x µl	sddH <sub>2</sub> O (ad 20 µl)
	4 µl	5x Reaktionspuffer (rev. Transkription)
	2 µl	dTT (100 mM)
	1 µl	dNTP (10 mM)
	1 µl	RNase Out (1 U)
	1 µl	Superscript <sup>TM</sup> II (200 U/µl)

### 2.9.2 Polymerasekettenreaktion

Durch PCR (polymerase chain reaction) können geringe Mengen von Matrizen-DNA logarithmisch vervielfältigt werden. Zum Einsatz kommt eine hitzestabile *Taq*-Polymerase, die eine starke 5'-3'-Prozessivität besitzt, während 5'-3'- und 3'-5'-Exonukleaseaktivität fehlen. Die DNA-Amplifikation über PCR erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von MULLIS & FALOONA (1987) und SAMBROOK et al. (1989) mit geringfügigen Variationen. Die zyklische Reaktion läuft dabei in drei Temperaturschritten ab (siehe Tab. 3). Auf die Hitzedenaturierung folgt die sequenzspezifische Anlagerung der Primer (Annealing) und danach der Polymerisations- oder Elongationsschritt, durch den das freie 3'-OH-Ende des

gebundenen Primers von der Polymerase in 3'-Richtung unter Einbau der entsprechenden Nukleotide verlängert wird. In Kombination mit davorgeschalteter Reverser Transkription (RT-PCR) wurden so z. B. homologe DNA-Gensonden hergestellt.

#### Durchführung:

PCR-Reaktionen wurden im 50 µl bzw. 25 µl Ansatz durchgeführt. Zur besseren Handhabung wurde entsprechend der Anzahl durchzuführender Reaktionen jeweils ein Vielfaches an „Mastermix“ hergestellt. Der erste „Mastermix“ enthielt dNTP-Mix (je 200 µM) und die entsprechenden Oligonukleotide (20 - 40 µM), der zweite eine *Taq*-Polymerase (Biotherm, Genecraft, Münster) mit Reaktionspuffer. Auf Eis wurde Mastermix 1 noch Template-DNA (5 bzw. 2,5 µl) zugefügt, danach wurde Mastermix 2 zugegeben und der Ansatz durchmischt. Nachdem der PCR-Block auf 95°C vorgeheizt war konnten die Ansätze in den Block gestellt werden. Auf den Zusatz von Mineralöl konnte verzichtet werden, da PCR-Geräte mit beheizbarem Deckel zum Einsatz kamen (Primus 25, MWG-Biotech, Ebersberg; PTC-200 DNA-Engine, MJ-Research, Biozym, Hess. Oldendorf; Genius 96, techne, Thermo-DUX, Wertheim).

Mastermix 1: (für 50 µl)	15 µl	sddH <sub>2</sub> O
	4 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM=10mM)
	0,5 µl	Primer 1 (100 µM)
	0,5 µl	Primer 2 (100 µM)
Mastermix 2: (für 50 µl)	19,8 µl	sddH <sub>2</sub> O
	5 µl	10x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer
	0,2 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (1U; Biotherm, Genecraft, Münster)

Besonders Mastermix 2 sollte nicht mehr als 4 Tau- und Gefrierzyklen ausgesetzt werden, da sonst die Aktivität der *Taq*-Polymerase abnehmen kann.

Um falsch-positive PCR-Amplifikationen durch Kontaminationen mit klonierter DNA zu vermeiden, wurden besonders beim Pipettieren von Primer-Stammlösungen, Enzymstammlösung, dNTP-Mix und Mastermix Pipettenspitzen mit Filtereinsatz verwendet.

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

**Tab. 3: Typisches Beispiel eines PCR-Programms.**

Die Polymerisationszeiten richteten sich nach Länge der zu erwartenden Amplifikate (1 min/kb).

### 2.9.2.1 Auswahl der Oligonukleotid-Sequenzen („Primerdesign“)

Die Annealingtemperaturen wurden je nach Gehalt an Purin- bzw. Pyrimidinbasen der eingesetzten Primer zwischen 42°C und 65°C variiert. Bei kurzen Oligonukleotiden bis 18 bp Länge konnte als Schmelztemperatur pro G/C-Nukleotid 4°C und pro A/T-Nukleotid 2°C kalkuliert werden. Da die Annealingtemperatur jedoch nicht im linearen Verhältnis zur Länge der Oligonukleotide steht, mußte beim Einsatz längerer Primer auf alternative Algorithmen zurückgegriffen werden.

Entweder nach SAMBROOK et al. (1989):

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \times (\log_{10}[J^+]) + 0,4 (\% \text{ G} + \text{C}) - 600$$

$J^+$  = Konzentration monovalenter Kationen

oder, um die Länge des Primers besser berücksichtigen zu können, nach folgendem Algorithmus (MWG-Biotech, Ebersberg):

$$T_m = 69,35^\circ\text{C} + 0,41 (\% \text{ G} + \text{C}) - (650/L)$$

L = Länge des Primers

Bei degenerierten Primern wurde die jeweils niedrigere Schmelztemperatur der variablen Base angenommen. Für die PCR wurde eine Annealingtemperatur von  $T_m - 5^\circ\text{C}$  eingesetzt. Die oben dargestellten Berechnungsmöglichkeiten für  $T_m$ -Werte lieferten Anhaltspunkte, die tatsächlichen optimalen Annealingtemperaturen mußten gegebenenfalls empirisch ermittelt werden. Folgende Kriterien sollten beim „Primerdesign“ berücksichtigt werden:

- Vermeidung von mehr als 2°C Abweichung in der Annealingtemperatur zwischen den beiden Primern. Bei stark abweichenden G/C-Gehalten war eine Kompensation über die Länge der Oligonukleotide möglich
- Vermeidung von Homopolymerbereichen (> 4 Nukleotide)
- möglichst ausgeglichener G/C-Gehalt
- Vermeidung von internen „hairpin“-Sequenzen
- Vermeidung komplementärer Sequenzen, die zur Primerdimerisierung führen können

Hier war es auch möglich, via Internet Programme verschiedener Institute zu nutzen, die die oben beschriebenen Algorithmen und Kriterien zum Primerdesign zum großen Teil implementieren. Die Homologie von Primerpaaren zueinander wurde mit DNASTAR (Madison, USA) überprüft.

Zur Amplifikation bisher unbekannter Tubulin-kodierender cDNA Abschnitte aus *H. vulgare* mußten zunächst Genbanksequenzen verwandter Organismen gegeneinander abgeglichen werden, um konservierte Primerpositionen festzulegen. Gegebenenfalls wurden degenerierte Primer gestaltet, die zumeist in der dritten Codon-Position eine oder mehrere variable Basen trugen.

### 2.9.2.2 PCR mit $\lambda$ -Phagenpartikeln

Sollte Insert-DNA von  $\lambda$ -Phagenklonen z. B. aus einem primären Screening einer cDNA-Bibliothek durch PCR-Experimente charakterisiert werden, wurden die  $\lambda$ -Phagenpartikel vorbehandelt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Hierzu wurde Phagensuspension 1:15 mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  verdünnt, für 20 min bei 70°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt (FRIEDMANN et al. 1988, abgewandelt nach STENGER 1998). Von dieser Verdünnung wurden 5  $\mu\text{l}$  für die PCR eingesetzt.

## 2.10 Klonierung von DNA

### 2.10.1 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, doppelsträngige DNA sequenzspezifisch gemäß ihrer enzyspezifischen palindromischen Erkennungssequenzen zu schneiden. Deshalb wurden sie sowohl für die Herstellung von DNA-Gensonden, Vektorklonierungen als auch für die Charakterisierung von DNA-Fragmenten verwendet.

Eingesetzte Restriktionsenzyme:

<i>Bam</i> H I	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Bgl</i> II	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> 32I	(Isoschizomer zu <i>Eco</i> R V) MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> R I	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> R V	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Kpn</i> I	Stratagene, Heidelberg
<i>Dra</i> I	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Hind</i> III	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Nde</i> I	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Sal</i> I	AGS, Heidelberg
<i>Xba</i> I	Genecraft, Münster
<i>Xho</i> I	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; Stratagene, Heidelberg

#### 2.10.1.1 Restriktion von Plasmid-DNA

Die Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe des entsprechenden 10-fach konzentrierten Reaktionspuffers und zwei Enzymeinheiten (U) pro  $\mu\text{g}$  DNA. Der Restriktionsansatz (25  $\mu\text{l}$ ) wurde mindestens 1 h bei 37°C inkubiert und konnte sofort elektrophoretisch untersucht oder nach Hitzedenaturierung (70°C, 10 min) für weitere Untersuchungen verwendet werden. Da das in der Enzymstammlösung vorhandene Glycerin hemmende Wirkung besitzt, sollte das eingesetzte Volumen der Enzymstammlösung 1/10 des Gesamtvolumens der Reaktion nicht übersteigen. Verlangten die Reaktionsbedingungen den Einsatz von DTT, wurde frisch aufgetaute Stammlösung verwendet, da Gefrier- und Tauzyklen zu enzymhemmenden

Abbauprodukten führen können. Mehrfachrestriktionen waren auch möglich, sofern die Restriktionsbedingungen der einzelnen Enzyme übereinstimmten. Zur Charakterisierung von Plasmid-DNA wurden 0,1 bis 0,5 µg eingesetzt, präparative Restriktionen wurde mit ca. 10 µg DNA durchgeführt.

### 2.10.1.2 Restriktion von PCR-Produkten

Nach der Quantifizierung des Amplifikationserfolgs über Gelelektrophorese wurde ein Aliquot 1:2 mit sddH<sub>2</sub>O verdünnt und wie oben beschrieben und zur Restriktion eingesetzt.

### 2.10.1.3 Restriktion hochmolekularer genomischer DNA von Gerste

Hochmolekulare DNA kann in stark verdrillter Struktur vorliegen und deshalb für Restriktionsenzyme schwerer zugänglich sein. Es wurden daher 10 - 50 µg DNA mit 6 - 8 U Restriktionsenzym/µg DNA in einem Volumen von 200 µl restringiert. Außerdem wurde die Inkubationszeit auf 48 h verlängert (SCHOCK 1995 verändert nach LENNERZ 1997 und STENGER 1998) und jeweils eine Hälfte der einzusetzenden Enzymmenge zu Beginn der Inkubationszeit und die andere nach Ablauf von 24 h zugesetzt. Am besten restringierbar erwies sich DNA, die schon mehrere Wochen in TE-Puffer gelöst bei 4°C für aufbewahrt wurde (STENGER 1997).

### 2.10.2 Klonierungsvektor mit d(T)-Überhang

Der sogenannte T-Vektor wurde unter Verwendung von Vektor-DNA (z.B. pBluescript (+)<sup>®</sup>) in Anlehnung an MARCHUK et al. (1991) und HOLTON & GRAHAM (1991) hergestellt. Die Terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase ist dafür verantwortlich, daß PCR-Produkte immer am 3'-OH-Ende einen A-Überhang besitzen, da hierbei die dATP-Nukleotide stark bevorzugt werden (MARCHUK et al. 1991). Der komplementäre Überhang beim Vektor wird dadurch erzeugt, daß linearisierte Plasmid-DNA mit glatten Enden mit *Taq*-Polymerase inkubiert wird. Unter Zugabe von dTTP-Nukleotiden wird nur dieses Nukleotid an das 3'-OH-Ende des Vektors angehängt. Die dadurch mögliche A/T-Basenpaarung zwischen PCR-Produkt und T-Vektor kann in der anschließenden Ligationsreaktion genutzt werden.

Durchführung:

pBluescript (+)<sup>®</sup>-Vektor (30 µg) wurden mit 150 U *EcoR* V vollständig linearisiert. Um das Restriktionsenzym zu entfernen, wurde der Ansatz einer Phenolextraktion unterzogen, gefällt und in 30 µl sddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Danach wurde in 100 µl *Taq*-Polymerase-Puffer (1x) mit 2 mM dTTP und 30 U *Taq*-Polymerase für 2 h bei

72°C inkubiert und erneut phenolextrahiert. Die DNA wurde gefällt, das Pellet in einer Konzentration von 0,5 µg/µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und in Aliquots (1 - 2 µl) bei -20°C gelagert.

### 2.10.3 Ligation von DNA

Zur dauerhaften Vermehrung durch Bakterien wurden DNA-Fragmente zunächst in geeignete Plasmid-Vektoren ligiert. Bei Ligationen sollte die Insert-DNA im molaren Überschuß zur Vektor-DNA eingesetzt werden, um Vektorrezirkularisation und ein Übermaß nicht rekombinanter Klone zu vermeiden. In dieser Arbeit waren die zu ligierenden PCR-Fragmente stets kleiner als die Vektor-DNA, daher wurden in der Regel 1 - 2 µg Vektor-DNA mit 0,5 µg Insert-DNA ligiert.

Durchführung:

Standardligationsansatz:	x µl	Insert-DNA (1 µg)
	1 µl	10x Ligase-Puffer
	1 µl	rATP (10 mM)
	0,5 µl	Vektor-DNA (0,5 µg)
	1 µl	T4-Ligase (1U)
	x µl	ddH <sub>2</sub> O (ad 10 µl)

Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 14°C.

Alternativ konnten die DNA-Fragmente direkt im ausgeschnittenen Gelstück ligiert werden, insbesondere die kohäsiven Enden der DNA von Deletionsklonen konnten auf diese Weise mit wenig Zeitaufwand wieder zirkularisiert werden. Die Gelelektrophorese erfolgte hierzu in „Low melting Agarose“ und TAE-Puffer (1x). Das möglichst kleine DNA-haltige Gelstück wurde geschmolzen (68°C, 5 min), auf RT abgekühlt und der Ligationsansatz hinzupipettiert.

Ligationsansatz in Agarose:	x µl	Insert-DNA (2 µg)
	4 µl	10x Ligase-Puffer
	4 µl	rATP (10 mM)
	0,5 µl	Vektor-DNA (0,5 µg)
	1 µl	T4-Ligase (1U)
	x µl	ddH <sub>2</sub> O (ad 40 µl)

Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 14°C. Die Ligationsansätze konnten bei 4°C gelagert werden.

## 2.11 Transformation von Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA mußten diese von Bakterien aufgenommen werden (Transformation). Das Verfahren (SAMBROOK et al. 1989) basiert auf der  $\text{CaCl}_2$ -vermittelten Aufnahme von Plasmid-DNA durch Bakterien (MANDEL & HIGA 1970, COHEN et al. 1972).

### 2.11.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Diese Methode ermöglicht es, Transformationsraten von  $5 \times 10^6$  -  $2 \times 10^7$  Kolonien pro  $\mu\text{g}$  DNA zu erzielen (SAMBROOK et al. 1989). SOB-Medium (100 ml, siehe Kapitel 2.3.1.1) wurde mit einer Bakterienkolonie (XL1-Blue MRF') angeimpft. Nach Inkubation auf dem Schüttelwasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  bis zum Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 wurde die Kultur für 10 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  mit  $7.000 \times g$  (Kühlzentrifuge J2-21, Rotor JA 14, Beckman) in einem Zentrifugengefäß (250 ml) wurde der Überstand gründlich entfernt, 20 ml eiskaltes TFB-Medium (siehe Kapitel 2.3.1.1) (HANAHAN 1983) zugefügt und resuspendiert. Nun wurde für 45 min auf Eis inkubiert und in 30 ml Zentrifugenröhrchen 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  mit  $7.000 \times g$  (Kühlzentrifuge 202 MK, Rotor 12040, Sigma, Braun, Melsungen) zentrifugiert. Nachdem das Pellet durch Umdrehen des Gefäßes für 1 min getrocknet worden war, wurden 4 ml FSB-Medium (siehe Kapitel 2.3.1.1) hinzugegeben, 3 h auf Eis inkubiert, Aliquots (50 und  $200 \mu\text{l}$ ) hergestellt und diese in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren oder sofort weiterverwendet.

### 2.11.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die aufgetauten Bakterien (XLBlue MRF',  $200 \mu\text{l}$ ) wurden mit maximal 50 ng (in  $10 \mu\text{l}$  -  $20 \mu\text{l}$ ) der entsprechenden Plasmid-DNA für 30 min auf Eis transformiert. Durch den anschließenden Hitzeschock ( $42^\circ\text{C}$ , 90 s) wurde die mRNA-Produktion der Bakterien stark erhöht, wodurch sich ihre Vitalität verbessert (STRAUS et al. 1987). Nach weiteren 2 min auf Eis wurden  $800 \mu\text{l}$  SOC-Medium zugegeben, für 45 - 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, unterschiedliche Aliquots ausplattiert und ü.N. bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Selektion der Rekombinanten erfolgte über  $\alpha$ -Komplementation des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens (Blau/Weiß-Selektion) unter Zugabe von  $4 \mu\text{l}$  IPTG (200 mg/ml) und  $40 \mu\text{l}$  X-Gal (20 mg/ml DMF) auf LB-Selektiv-Agarplatten.

## 2.12 Herstellung von cDNA-Bibliotheken aus Gersten-mRNA

cDNA-Bibliotheken enthalten Sequenzen, die im Idealfall die gesamte mRNA eines bestimmten Entwicklungszustands des zu untersuchenden Gewebeabschnitts repräsentieren. Die mRNA Transkripte der Gerste aus 5 d alten etiolierten Keimlingen ohne Wurzeln, den Blattsegmenten 1 und 2 (siehe Abb. 3, Kapitel 1.2) wurden dazu in cDNA umgeschrieben und in ein geeignetes Vektorsystem kloniert werden.

Die Reverse Transkription startet mit der Hybridisierung des oligo d(T)-Primers an die Poly(A)<sup>+</sup>-Sequenz der mRNA-Transkripte. Der Primer trägt außerdem einen Sequenzabschnitt, der nach der Zweitstrangsynthese ein *Xho* I-Erkennungsmotiv aufweist. Am 5'-Ende der cDNA erfolgt eine Ligation über glatte Enden an einen Adapter, der eine *Eco*R I-Schnittstelle trägt. Die cDNA kann so gerichtet mit den Vektor-Armen des Phagenvektors ligiert und über *E. coli* (XL1-Blue MRF<sup>'</sup>) vermehrt werden.

Zur weiteren Untersuchung isolierter Phagenklone muß die Phagen-DNA nicht mehr subkloniert werden, sondern der die cDNA tragende Vektoranteil kann über die *in vivo*-Excision direkt aus dem rekombinanten  $\lambda$ -ZAP-Phagen genom als Phagemid ausgeschleust werden. Phagemide sind Vektoren, die sowohl Phagen-, als auch Plasmideigenschaften besitzen und bis zu 10 kb große Fremd-DNA-Fragmente aufnehmen können. Für diese Art der Ausschleusung ist eine Coinfektion von *E. coli* (XL1-Blue MRF<sup>'</sup>) mit  $\lambda$ -Phagen und f1-Helferphagen nötig. Mit dem Helferphagen kann die Menge der ausgeschleusten rekombinanten  $\lambda$ -Phagen-DNA um mehrere Größenordnungen erhöht werden. Proteine der Helferphagen können auf der rekombinanten  $\lambda$ -DNA die Initiations- und Terminationssequenz erkennen. An der Initiationssequenz setzt eines der Proteine einen Einzelstrangbruch, von dem aus die Einzelstrangsynthese startet und bis zur Terminationssequenz fortgeführt wird. Die einzelsträngige DNA wird durch weitere Genprodukte des Helferphagen zirkularisiert. Dies stellt den eigentlichen Schritt des früheren Subklonierens dar; alle Sequenzbereiche zwischen Initiations- und Terminationssequenz sind als Phagemid vorhanden, alle übrigen  $\lambda$ -Vektorbereiche außerhalb der Initiations- und Terminationssignale sind nicht mehr Bestandteil dieser zirkularisierten DNA.

Die durch die Zirkularisierung wieder aus dem Zusammenfügen von Initiations- und Terminationssequenz entstandene f1-origin-Sequenz erlaubt die Verpackung der zirkularisierten Einzelstrang-DNA in Phagemid-Partikel (ähnlich den f1-Phagenpartikeln), die dann aus den lysierten *E. coli* freigesetzt werden. Nachfolgende Erhitzung auf 70°C lysiert

selektiv  $\lambda$ -Phagen, die Phagemidpartikel können zur Infektion mit *E. coli* eingesetzt werden. Für diese Infektion werden Nicht-Suppressor-Stämme von *E. coli* eingesetzt. Da das Helferphagenom zusätzlich eine Amber-Mutation trägt, ist eine Vermehrung von noch im Ansatz vorhandenen Helferphagen in SOLR oder XOLR Bakterien nicht möglich. Das Einzelstrangphagemid wird lediglich noch in das Doppelstrangphagemid überführt.

#### Durchführung:

Die Konstruktion der cDNA-Bibliotheken wurde mit dem cDNA-Synthesystem und dem Uni-ZAP<sup>TM</sup> XR-Vektorsystem oder für eukaryontische Expression mit dem ZAP Express<sup>TM</sup> Vektorsystem (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Statt der Reversen Transkriptase von Stratagene wurde Superscript<sup>TM</sup> II (Gibco Life Technologies, Eggenstein) eingesetzt, da diese im Gegensatz zum Wildtyp aufgrund einer Punktmutation keine RNase H Aktivität aufweist und somit eine höhere Anzahl von vollständigen cDNAs ermöglicht. Alle nicht-enzymatischen Komponenten wurden vollständig aufgetaut, kurz geschüttelt, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Alle Arbeiten mit [ $\alpha^{32}$ P]dATP wurden im Isotopenlabor durchgeführt.

#### I. Erststrangsynthese:

In ein RNase-freies Reaktionsgefäß auf Eis wurden folgende Reagenzien pipettiert:

Erststrangsynthese:	5 $\mu$ l	10x Erststrangpuffer
	3 $\mu$ l	10 mM Methyl-dNTP-Mischung
	2 $\mu$ l	1,4 $\mu$ g/ $\mu$ l Linker-Primer
	x $\mu$ l	sddH <sub>2</sub> O ad 50 $\mu$ l
	1 $\mu$ l	RNase Block (40 U/ $\mu$ l)
	5 $\mu$ l	0,1 M DTT

Das Reaktionsgemisch wurde geschüttelt, kurz abzentrifugiert und auf Eis gestellt. 5  $\mu$ g mRNA wurden 5 min bei 65°C inkubiert und schnell im Eisbad abgekühlt, um Sekundärstrukturen zu beseitigen. Nach Zugabe der mRNA wurde die Anlagerung der Linker-Primer an die Poly(A)<sup>+</sup>-Sequenzen für 10 min bei RT abgewartet. Superscript<sup>TM</sup> II (5  $\mu$ l, 200 U/ $\mu$ l) wurde zugefügt, kurz gemischt und zentrifugiert. 1/10 dieses Ansatzes wurde in ein mit 0,5  $\mu$ l [ $\alpha^{32}$ P]dATP beschicktes Reaktionsgefäß gegeben und zusammen mit dem Hauptansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Parallel dazu wurde die gleiche Prozedur mit Marker-poly(A)<sup>+</sup>-RNA von 1,8 kb Länge durchgeführt. Dies war nötig, um den Erfolg der Erst- und Zweitstrangsynthese über Autoradiographie überprüfen zu können. Nach Ende der Inkubation wurden die beiden radioaktiven Kontrollansätze bei -20°C tiefgefroren, die beiden Ansätze mit umgeschriebener Gersten- bzw. Marker-Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA wurden auf Eis gestellt.

## II. Zweitstrangsynthese:

Zu jeweils 45  $\mu\text{l}$  der beiden nicht-radioaktiven Erststrang-Ansätze wurde auf Eis hinzupipettiert:

Zweitstrangsynthese:	20 $\mu\text{l}$	10x Zweitstrangpuffer
	6 $\mu\text{l}$	10 mM dNTP-Mix
	113,9 $\mu\text{l}$	sddH <sub>2</sub> O
	2 $\mu\text{l}$	[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP
	2 $\mu\text{l}$	RNase H (1U/ $\mu\text{l}$ )
	11,2 $\mu\text{l}$	DNA-Polymerase I (9U/ $\mu\text{l}$ )

Zur Synthese des komplementären Strangs wurden die Ansätze für 2,5 h bei 16°C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Die DNA-Polymerase verursacht Strangbrüche im RNA-Anteil des cDNA-mRNA Hybrides, die verbleibenden RNA-Reste können dann der DNA-Polymerase als Primer dienen.

## III. Prozessierung der cDNA-Enden:

Die nachfolgenden Schritte dienen dazu, die cDNA so zu modifizieren, daß ein gerichteter Einbau in die Vektor-Arme der  $\lambda$ -DNA möglich war.

### A) Glätten der cDNA-Enden:

Zum Reaktionsansatz der Zweitstrangsynthese wurden auf Eis folgende Reagenzien hinzupipettiert:

23 $\mu\text{l}$	blunting dNTP-Mix
2 $\mu\text{l}$	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase

Nach 30 min Inkubation bei 72°C wurden 200  $\mu\text{l}$  Phenol-Chloroform 1:1 zugegeben, 2 min zentrifugiert und die Oberphase ohne Interphase mit 1 Vol. Chloroform versetzt und nochmals zentrifugiert. Durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  NaAcetat und 400  $\mu\text{l}$  abs. EtOH wurde die Oberphase bei -20°C ü.N. gefällt.

### B) Ligation der *EcoR* I-Adaptoren:

Die DNA wurde bei 4°C für 30 min pelletiert (Tischzentrifuge Biofuge A Heraeus-Christ, 12.000 rpm), mit 70 %igem EtOH gewaschen und 5 min bei RT luftgetrocknet. Entgegen den Herstellerangaben (Stand 1996) wurde die DNA jedoch nicht gänzlich getrocknet, um so eine bessere Löslichkeit zu gewährleisten. Das Pellet wurde in 9  $\mu\text{l}$  *EcoR* I Adaptor-Lösung resuspendiert, bei 4°C für mindestens 30 min belassen und sodann 1  $\mu\text{l}$  für die Kontrolle der Zweitstrangsynthese entnommen. Zusammen mit den Kontrollen der Erststrangsynthese wurde der Erfolg dieser Synthesen durch elektrophoretische Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen eines alkalischen Agarosegels überprüft. Die Kontrollansätze wurden mit einem Volumen Alkaliladepuffer (25 mM NaOH, 20 % Glycerin, 4,6 % gesättigte Bromphenolblau-Lösung) versetzt und 2 h bei 100 V (5 V/cm) unter

Eiskühlung aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel kurz in frischem Laufpuffer geschwenkt, überschüssiger Puffer abgetupft, in einen Hybridisierungsschlauch eingeschweißt und die Größenverteilung der radioaktiv markierten DNA autoradiographisch dokumentiert.

Alkalisches Gel:	1 %	Agarose
	30 mM	NaOH
	2 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
Elektrophoresepuffer:	30 mM	NaOH
	2 mM	Na <sub>2</sub> EDTA

Folgende Reagenzien wurden für die Ligation zugegeben:

Ligationsansatz:	1 µl	10x Ligase Puffer
	1 µl	10 mM rATP
	1 µl	T4 DNA Ligase (4 U/µl)

Nach Mischen und kurzem Abzentrifugieren der Reagenzien wurde der Ansatz für 2 d bei 4°C belassen. Nach Hitzeinaktivierung (70°C, 30 min) wurde der Ansatz auf Eis gestellt und Kondenswasser abzentrifugiert.

#### C) Phosphorylierung der cDNA-Enden:

Für die Ligation wurden *EcoR* I-Adaptoren ohne reaktive 5'-Phosphatgruppen eingesetzt, um unspezifische Polymerbildungen der Adaptoren zu verhindern. Nach erfolgter Ligation der Adaptoren an die cDNA wurden diese Enden phosphoryliert, um die spätere Ligation in die Vektor-DNA zu ermöglichen.

Kinasierungsansatz:	1 µl	10x Ligase Puffer
	2 µl	10 mM rATP
	6 µl	sddH <sub>2</sub> O
	1 µl	T4 Polynukleotid-Kinase

Es wurde 30 min bei 37°C inkubiert, worauf wiederum eine Hitzeinaktivierung (70°C, 30 min) und das Abzentrifugieren von Kondenswasser folgte.

#### D) *Xho* I-Restriktion:

Dieser Schritt ermöglicht die Klonierung der cDNA in definierter Orientierung. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Xho* I wurde während der Erststrangsynthese durch den Linker-Primer eingeführt und ist, abgesehen vom *EcoR* I-Adaptor, der einzige nichtmethylierte Bereich der cDNA. Durch die Restriktion wird am 3'-Ende der cDNA die *Xho* I-Schnittstelle zugänglich und zusammen mit dem *EcoR* I-Überhang am 5'-Ende steht die cDNA zum gerichteten Klonieren zur Verfügung. Zum Kinase-Ansatz wurden 28 µl *Xho* I-Puffer und 3 µl *Xho* I (40 U/µl) gegeben und für 1,5 h bei 37°C inkubiert.

#### IV. Größenfraktionierung der DNA

Durch die Restriktion abgetrennte Linker-Primer-Fragmente und kurze cDNA-Moleküle wurden von der längeren cDNA durch Größenselektion mittels Sephacryl S-500 abgetrennt. Als Säule diente eine 1 ml-Spritze, die gemäß den Herstellerangaben in ein PP-Röhrchen (Typ 2059, Falcon) gehängt wurde, in dem wiederum ein Eppendorf-Gefäß zum Auffangen der Eluate plaziert worden war. Sedimentation des Säulenmaterials, Waschen und Elution wurden durch vorsichtiges Zentrifugieren, jeweils 2 min bei 400x g, (Tischzentrifuge Typ 03400 mit Ausschwingrotor, Heraeus) beschleunigt. Die Säule wurde gemäß der Arbeitsvorschrift gepackt; nach zweimaligen Auftrag von 300 µl STE-Puffer (1x) wurde der mit 5 µl STE-Puffer (10x) versetzte Ansatz aufgetragen. Nach Auffangen dieses Eluates erfolgten mit jeweils 60 µl STE-Puffer (1x) weitere Elutionsschritte. Insgesamt neun Fraktionen wurden aufgefangen, jedoch nur die ersten drei mit den längsten cDNA-Molekülen weiterverwendet. Diese Fraktionen wurden vereinigt und zur Entfernung der Kinase einer Phenol-Chloroform Extraktion unterzogen. Die Oberphase wurde zur Fällung mit 2 Vol. abs. EtOH versetzt und tiefgefroren. Verbliebene Kinase-Reste könnten sonst zu einer Religation der *Xho I-EcoR I* Vektor-Fragmente führen und somit einen hohen Hintergrund von nicht-rekombinanten Klonen hervorrufen.

#### V. Ligation der cDNA mit den Vektor-Armen des λ-Phagen

Die nach der Zentrifugation pelletierte cDNA wurde mit 80%igem EtOH gewaschen, 5 min bei RT luftgetrocknet und das noch feuchte Pellet in 3 µl bzw. 10,5 µl (bei mehr als 10 cps) gelöst. Da diese geringen DNA-Mengen nicht photometrisch erfaßbar sind, wurde die DNA-Konzentration mit Ethidiumbromid-Agaroseplatten-Assay bestimmt (siehe Kapitel 2.8.2.2). 100 ng cDNA/µg Vektor wurden eingesetzt. Da die ligierten cDNA-Vektor-Sequenzen lange Konkamere bilden und die Effizienz der nachfolgenden Verpackung in Phagenpartikel bei langen Konkameren am höchsten ist, sollten mechanische Beanspruchung und mehrere Gefrier- und Tauzyklen vermieden werden.

Ligationsansatz:	x µl	cDNA (100 ng)
	0,5 µl	10x Ligase-Puffer
	0,5 µl	10 mM rATP
	1µl	λ-Vektor-Arme (1 µg)
	x µl	sddH <sub>2</sub> O (ad 5 µl)
	0,5 µl	T4 Ligase (4 U/µl)

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 2 d bei 4°C inkubiert.

## VI. *In vitro*-Verpackung der rekombinanten Vektor-DNA in Phagenpartikel

Vom Ligationsansatz wurden 1 - 4  $\mu\text{l}$  zum Verpackungsextrakt (Gigapack R III Gold-Verpackungsextrakt), das alle zur Erzeugung intakter Phagenpartikel nötigen Komponenten enthielt, gegeben. Die *in vitro*-Verpackung erfolgte bei 22°C für 2 h. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  SM-Puffer und 20  $\mu\text{l}$  Chloroform wurde vorsichtig gemischt und Zellbruchstücke abzentrifugiert.

SM-Puffer:	100 mM	NaCl
	17 mM	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
	2,5 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	0,01 %	Gelatine
	→	autoklavieren

## VII. Titerbestimmung der rekombinanten Klone

Die Bestimmung der Anzahl rekombinanter Klone wurde über die  $\alpha$ -Komplementation (Blau/Weiß-Selektion) durchgeführt. Dazu wurde 1  $\mu\text{l}$  unverdünnter Verpackungsansatz und 1  $\mu\text{l}$  einer 1:10 Verdünnung zu 200  $\mu\text{l}$  *E. coli* (XL1-Blue MRF<sup>'</sup>) gegeben. Dieses Phagen-Bakterien-Gemisch wurde dann auf 3 ml Top-Agarose, die mit 0,5 M IPTG (15  $\mu\text{l}$ ) und 50  $\mu\text{l}$  X-Gal (250mg/ml DMF) versetzt worden war, ausplattiert. War die Zahl der nicht-rekombinanten Klone (blaue Lysishöfe) mindestens um den Faktor 10 niedriger als die der Rekombinanten (weiße Lysishöfe) und lagen insgesamt etwa  $1 \times 10^6$  pfu vor, konnte auch der Rest der Ligation verpackt werden und die primäre cDNA-Bibliothek amplifiziert werden. Über PCR wurden außerdem die durchschnittlichen Insertlängen der primären cDNA-Bibliothek mittels zufällig ausgewählter Lysishöfe bestimmt.

## VIII. Amplifikation der primären cDNA-Bibliothek

*In vitro* gebildete Phagenpartikel (primäre cDNA-Bibliothek) können instabil sein. Deshalb wird mit *in vitro* entstandenen Phagen noch ein Infektionszyklus in Wirtsbakterien durchgeführt (Amplifikation der cDNA-Bibliothek). Unter sterilen Bedingungen wurden zu 600  $\mu\text{l}$  Bakterien (XL1-Blue MRF<sup>'</sup>) ca.  $5 \times 10^4$  pfu der primären cDNA-Bibliothek gegeben und mit 6,5 ml Top-Agarose ausplattiert (siehe Kapitel 2.13.1). Das Wachstum bei 37°C wurde auf 6 - 9 h begrenzt, um eine Überrepräsentation von Klonen schnell wachsender Plaques zu vermeiden. Danach erfolgte die Überschichtung mit 8 ml SM-Puffer und langsames Schwenken (Taumelschüttler, Typ KL, E. Bühler) ü.N. bei 4°C, um die Phagen aus der Agarose herauszuschwemmen. Am folgenden Tag wurden die Überstände von den Platten entnommen und nochmals mit 2 ml SM-Puffer gespült. Nach Vereinigung der beiden Überstände und Zugabe von 5 % Chloroform konnten der Zellbruchstücke durch Zentrifugation (10 min, 500x g) entfernt werden. Die Überstände wurden abgenommen und nochmals mit 3 % Chloroform versetzt. Sie konnten bei 4°C gelagert werden. Ein Teil der Überstände wurde außerdem mit 7 % DMSO versetzt und war bei -73°C lagerfähig.

## 2.13 Screening von cDNA-Bibliotheken

### 2.13.1 Primärscreening

Um bestimmte in  $\lambda$ -Phagen klonierte cDNA über DNA-Sonden nachweisen und isolieren zu können, wurden die Phagen in geeigneter Verdünnung zusammen mit Wirtsbakterien auf einer Petrischale vereinzelt und inkubiert. Anschließend wurden die  $\lambda$ -Phagenklone auf Membranen übertragen (BENTON & DAVIS 1977), mit DNA-Sonden hybridisiert und exponiert. Die Signale auf dem Röntgenfilm führten dann zu den „positiven“ Klonen auf der Petrischale.

#### Durchführung:

Alle folgenden Arbeiten mit Bakterien wurden auf einer Sterilbank durchgeführt. Auf LB-Agarplatten mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin wurde *E. coli* (XL1-Blue MRF') aus einer Dauerkultur ausplattiert und über Nacht bei 37°C vermehrt (siehe Kapitel 2.3.1). Mit einer einzelnen Kolonie wurden 10 ml LB-Maltose-Medium in einem Erlenmeyer-Kolben (50 ml) überimpft und bei 37°C im Schüttelwasserbad für 4 - 6 h inkubiert. Durch die Maltosezugabe wird die Ausbildung des bakteriellen Maltoserezeptors induziert, der als Oberflächenstruktur auch bei der Anheftung des Phagen erkannt wird. Beim Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1,0 wurden die Bakterien 10 min mit 5.000x g pelletiert, in 5 ml sterilem 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt.

Vom Stamm XL1-Blue MRF' wurden 600  $\mu\text{l}$  mit  $5 \times 10^4$  Phagenpartikeln 15 min bei 37°C inkubiert, um eine gleichmäßige Adsorption der Phagenpartikel an die Bakterien zu erreichen. Das Phagen-Bakterien-Gemisch wurde zu 48°C vortemperierter Top-Agarose (6,5 ml) gegeben, gemischt und luftblasenfrei auf eine vorgewärmte  $\varnothing$  137 mm-NZY-Agarplatte ausgegossen, die 6 - 9 h bei 37°C inkubiert wurde. Zugunsten einer besseren Flächenausnutzung wurden zunehmend auch quadratische Petrischalen benutzt (siehe Tab. 4).

	Petrischale [mm]	NZY-Agar [ml]	NZY-Top-Agarose [ml]	Bakteriensuspension [ $\mu\text{l}$ ]
P	P137 $\varnothing$	50	6,5	600
P	120 x 120	50	5,5	600
S/T	90 $\varnothing$	20	3,0	200
S/T	100 x 100	40	4,5	300

**Tab. 4: Volumina der Medien und Bakteriensuspensionen in Abhängigkeit der Petrischalengröße.**

Alle Petrischalen wurden von Greiner, Frickenhausen bezogen mit Ausnahme der 100 x 100 mm Petrischalen (Sarstedt, Nürnberg). P=Primärscreening, S=Sekundärscreening, T=Tertiärscreening

Vor dem Plaquelift wurden die Platten mindestens 3 h im Kühlschrank belassen und außerhalb des Kühlschranks auf Kühllackus gestellt, um ein Ankleben der Top-Agarose an die Nylonmembran zu verhindern. Runde oder quadratisch zugeschnittene Nylonmembranen (Duralon-UV<sup>TM</sup>, Stratagene, Heidelberg) wurden für jeweils 2 min aufgelegt, die Lage der Membran auf der Agarplatte durch Einstiche mit einer Injektionsnadel markiert und die Membran vorsichtig mit einer Pinzette wieder entfernt. Danach wurde die Membran für 2 min in Denaturierungs-lösung, für 5 min in Neutralisierungslösung und für 1 min in Waschlösung gelegt, und gelegentlich leicht geschwenkt, um anhaftende Agarosereste zu entfernen. Die transferierten Nukleinsäuren wurden auf der noch feuchten Membran 2 min unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm (MinUVIS, Desaga, Heidelberg) fixiert, anschließend bei 50°C für 30 min getrocknet und bei RT gelagert. Durch Hybridisierung der Membran mit einer DNA-Sonde (siehe Kapitel 2.8.6.1) konnten „positive“ Klone identifiziert werden.

SM-Puffer:	100 mM	NaCl
	17 mM	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
Denaturierungs-Lösung:	1,5 M	NaCl
	0,5 M	NaOH
Neutralisierungs-Lösung:	1,5 M	NaCl
	0,5 M	Tris-HCl (pH 7,4)
Waschlösung:	0,2 M	Tris-HCl (pH 7,5)
	2x	SSC

Für die Plaquelifts, die mit Digoxigenin markierten Sonden hybridisiert werden sollten, kam ein leicht verändertes Protokoll zum Einsatz (The DIG System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer, Mannheim). Die Arbeitsschritte entsprachen den oben beschriebenen, die Inkubationsdauer in Denaturierungs-, Neutralisierungs- und Waschlösung wurden auf jeweils 5, 15 und 10 min verlängert. Außerdem variierte die Zusammensetzung von Neutralisierungs- und Waschlösung:

Neutralisierungs-Lösung:	1,5 M	NaCl
	1 M	Tris-HCl (pH 7,5)
Waschlösung:	2x	SSC

### 2.13.2 Weitere Screening-Runden

Phagenplaques, die durch Hybridisierung mit einer Gensonde als positiv identifiziert wurden, konnten aufgrund der asymmetrischen Markierung auf der Membran eindeutig auf der Agarplatte lokalisiert werden. Die Klone wurden ausgestochen und in 1 ml SM-Puffer überführt. Nachdem 20 µl Chloroform zugefügt und kräftig

geschüttelt wurde, konnte eine weitere Screening-Runde (Sekundärscreening) mit deutlich reduziertem Phagentiter (40 - 400 pfu pro Petrischale) auf kleineren Petrischalen stattfinden, um die positiven Klone zweifelsfrei zu vereinzeln. Bei Bedarf wurde eine dritte Screening-Runde (Tertiärscreening) angeschlossen. Auf diese Weise isolierte Phagen-DNA wurden mittels *in vivo*-Excision in Phagemide überführt.

## 2.14 *In vivo*-Excision

Um das Phagemid aus dem Phagen genom auszuschleusen (zum Prinzip siehe auch Kapitel 2.12), wurde nach dem leicht abgewandelten Protokoll von Stratagene, Heidelberg verfahren.

Durchführung:

Die Bakterienstämme XL1-Blue MRF' und SOLR (bzw. XOLR bei der cDNA-Bibliothek „Segment 2“) wurden frisch auf Agarplatten ausplattiert und ü.N. bei 37°C bebrütet (siehe Kapitel 2.3.1). Einzelne Kolonien wurden in Flüssigmedium vermehrt, pelletiert und mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600</sub> = 1 eingestellt. 200 µl XL1-Blue MRF' wurden zusammen mit 250 µl Phagenlösung und 1 µl Helferphagen (ExAssist, Stratagene, Heidelberg) für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 3 ml LB-Medium dem Ansatz zugegeben und für weitere 3 h im Schüttelwasserbad belassen. Nach Erhitzen auf 70°C für 20 min wurden 1 - 100 µl dieses Ansatz zu 200 µl SOLR- bzw. XOLR-Bakterien gegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte durch Ausstreichen von 200 µl auf LB<sub>amp</sub>- bzw. LB<sub>kan</sub>-Agarplatten (cDNA-Bibliothek Segment 2) und Inkubation bei 37°C über Nacht.

## 2.15 DNA-Sequenzierung

Für die während dieser Arbeit durch das Institut für Molekulargenetik, Universität Mainz (ABI<sup>®</sup>-Sequenzierautomaten) und MWG-Biotech, Ebersberg (LI-COR<sup>®</sup>-Sequenzierautomaten) durchgeführten automatischen Sequenzierungen wurde über Chromatographiesäulen aufgereinigte pDNA (siehe Kapitel 2.6.6.2) verwendet.

DNA-Sequenzierungen beruhen auf der von SANGER et al. (1977) entwickelten Didesoxy-Methode. In vier Parallelansätzen mit jeweils einem der vier Didesoxy-Nukleotiden wird der Sequenzierprimer enzymatisch verlängert und die Reaktion an einer bestimmten Stelle durch den Einbau eines Didesoxy-Nukleotids abgebrochen. Da außerdem ein radioaktives Nukleotid zugesetzt wird, können die unterschiedlich langen einzelsträngigen DNA-Fragmente nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung audioradiographisch ausgewertet werden. Nicht-radioaktive Sequenzierungen mit ABI<sup>®</sup>-Sequenzierautomaten beruhen auf Markierung der

DNA mit jeweils unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotiden in einem Ansatz und anschließendem Abtasten des Sequenziergels durch Laserstrahlen. Im Unterschied zu den ABI<sup>®</sup>-Sequenzierautomaten können mit den LI-COR<sup>®</sup>-Sequenzierautomaten 40 % längere Leselängen und mehr erreicht werden. Hierbei werden wie bei der radioaktiven Sequenzierung vier parallele Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt. Statt radioaktiver Nukleotide werden fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt.

## **2.16 Bestimmung des mitotischen Index**

Der mitotische Index (MI) beschreibt das Verhältnis mitotischer Zellen zu nicht mitotischen Zellen in Zellpopulationen oder Gewebeabschnitten. Die hierzu notwendigen Arbeiten führte Dipl. Biol. A. Rothauer durch. 1 mm-Segmente des zweiten Blattes der Gerste wurden hierzu in gesättigter Karminessigsäure für 30 s aufgeköcht, auf Objektträger überführt und vorsichtig unter dem Deckglas gequetscht. Mit dem nun sichtbaren kondensierten Chromatin konnte der MI über die Zahl der mitotischen Zellen mikroskopisch bestimmt werden.

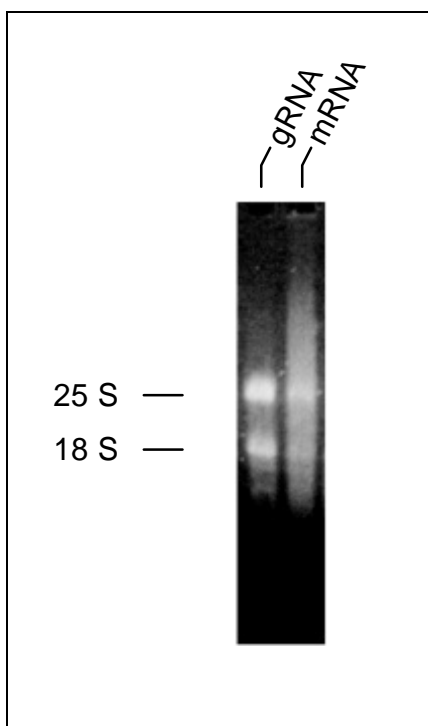
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Erstellung von cDNA-Bibliotheken aus Gersten-mRNA

Eine cDNA-Bibliothek aus dem gesamten Blattmaterial fünf Tage alter etiolierter Keimlinge wurde angelegt, um alle bei der Blattentwicklung auftretenden Tubulin-Isotypen erfassen zu können. Zwei weitere cDNA-Bibliotheken wurden jeweils aus den Segmenten 1 und 2 (siehe Abb. 3, Kapitel 1.2) erstellt, in denen mitose- oder cytokinespezifische Mikrotubuli (MT) vorkommen bzw. bandartige MT initiiert werden. Die möglicherweise nur in diesen Segmenten auftretenden Isotypen sollten so schneller gefunden werden.

##### 3.1.1 Isolation von poly(A)<sup>+</sup>-mRNA

Die Isolation von Gesamt-RNA (gRNA) aus Blattabschnitten des zweiten Blattes war hinsichtlich Ausbeute und Qualität mit den bisher beschriebenen Werten (MEYER 1994) vergleichbar. Je nach Blattabschnitt konnte eine Ausbeute von 0,2 bis 1,5 mg/g FG erzielt werden. Für eine erfolgreiche Herstellung von cDNA für cDNA-Bibliotheken war es nötig, vor allem den Anteil der ribosomalen RNA (rRNA) über oligo(dT)-Cellulose zu verringern. Die Ausbeute der messenger-RNA (mRNA) an der gRNA lag zwischen 1,5 % und 3 %, die ribosomalen Banden zeigten sich nach der Aufreinigung deutlich schwächer (siehe Abb. 7).

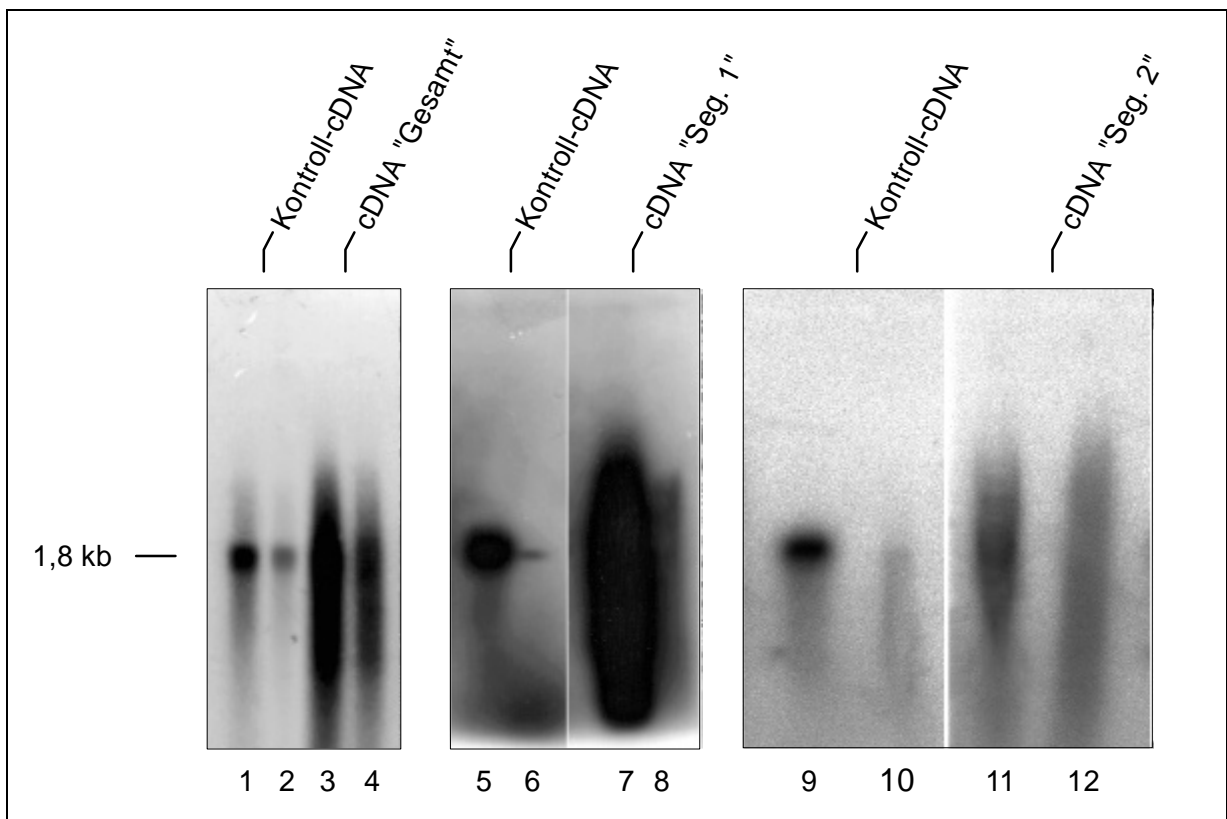


**Abb. 7: Erfolg der mRNA-Anreicherung.**

Vergleich von gRNA (Blattsegment 1) mit über oligo(dT)-Cellulose aufgereinigter mRNA. Pro Bahn wurden jeweils 1 µg RNA in einem 2 %igen nicht-denaturierenden TBE-Agarosegel aufgetrennt.

### 3.1.2 Die Synthese von cDNA und Verpackung in Phagenpartikel

Die cDNA-Sequenzen einer cDNA-Bibliothek sollten im Idealfall vollständige Transkripte repräsentieren. Deshalb wurde die Größe der Erst- und Zweitstrangsyntheseprodukte dokumentiert (siehe Abb. 8), da mit dem Protokoll nur dann weiterverfahren wurde, wenn auch hochmolekulare cDNA  $> 1,8$  kb nachgewiesen werden konnte. Außerdem wurde vor dem Screening der cDNA-Bibliotheken die Anzahl der rekombinanten Klone sowie die durchschnittliche Insert-Länge zufällig ausgewählter Klone bestimmt. Der Titer der primären cDNA-Bibliotheken lag zwischen  $0,3 \times 10^6$  und  $3,1 \times 10^6$  pfu/ml, der Anteil der nicht-rekombinanten Klone lag zwischen 3 und 9 % (zur Übersicht siehe Tab. 5) und somit im Rahmen der zu erwartenden Werte. Die durchschnittliche Klonlänge von 1,0 bis 1,1 kb entsprach denen in kommerziell erhältlichen cDNA-Bibliotheken (Stratagene, Heidelberg).



**Abb. 8: Alkalische Gele zur Kontrolle von Erst- und Zweitstrangsynthese.**

Links: cDNA aus mRNA des gesamten Blattmaterials. Mitte: cDNA aus mRNA vom Segment 1. Rechts: cDNA aus mRNA vom Segment 2. Die Produkte der Erststrangsynthese sind jeweils mit ungeraden Zahlen bezeichnet, die der Zweitstrangsynthese mit geraden. Die schwächeren Signale der Zweitstrangsynthese kamen durch das unterschiedliche Verhältnis von  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dATP}$  zu unmarkierten dNTP in Erst- und Zweitstrangsynthese zustande (cDNA Synthesis Kit, Instruction Manual, Stratagene Heidelberg, 1996). Die Kontroll-cDNA resultierte aus mRNA von 1,8 kb Länge. Expositionsdauer zwischen 80 und 120 min.

Spezifität der cDNA-Bibliotheken	Phagentiter prim. cDNA-Bibliothek [pfu/ml]	Anteil nicht-rekombinanter Klone	Klonlänge Ø	Phagentiter sek. cDNA-Bibliothek [pfu/ml]
Blatt „Gesamt“ (1*)	$0,3 \times 10^6$	3 %	1,0 kb	$2,2 \times 10^{10}$
Segment 1 (4*)	$1,1 \times 10^6$	9 %	1,1 kb	$0,6 \times 10^{10}$
Segment 1 (1*)	$0,3 \times 10^6$	9 %	1,1 kb	$0,4 \times 10^{10}$
Segment 2 (4*)	$3,1 \times 10^6$	5 %	1,0 kb	$0,4 \times 10^{10}$
Segment 2 (1*)	$2,3 \times 10^6$	6 %	1,0 kb	$0,2 \times 10^{10}$

**Tab. 5: Charakteristika der einzelnen cDNA-Bibliotheken.**

4 µg (4\*) bzw. 1 µg (1\*) der Ligationsreaktion wurden für die *in vitro*-Verpackung in λ-Phagenpartikel eingesetzt.

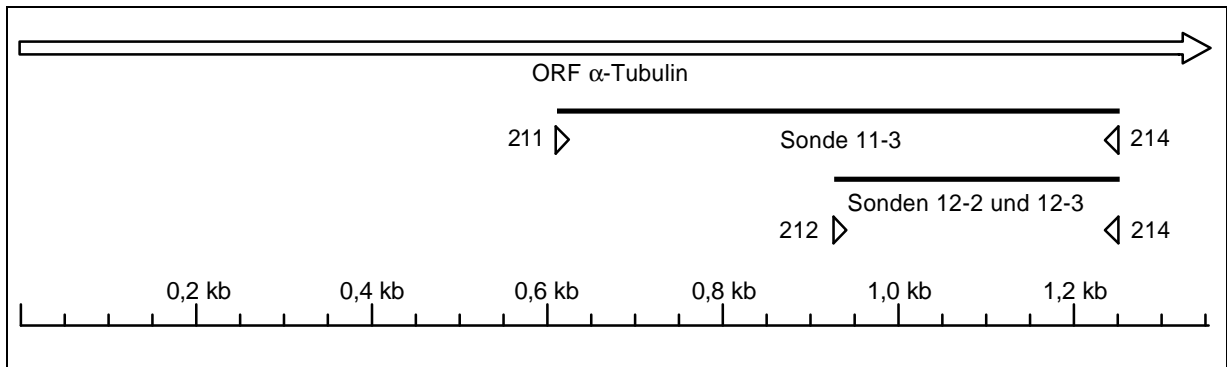
### 3.2 Isolierung von α-Tubulin-Sequenzen aus cDNA der Gerste

Proteinbiochemische Daten deuten an, daß vor allem die α-Tubulin-Signale im Entwicklungsgradienten auffällige Unterschiede zeigen. Besondere Aufmerksamkeit galt daher die Aufklärung der cDNA-Sequenzen des α-Tubulin, um so die Expressionsmuster auf Transkriptionsebene untersuchen zu können.

#### 3.2.1 Herstellung homologer α-Tubulin DNA-Sonden über PCR

Um ohne initiales Screening einer cDNA-Bibliothek mit heterologen DNA-Sonden homologe cDNA-Sequenzen des α-Tubulin zu erhalten, wurde mittels Reverser Transkriptions-PCR (RT-PCR) aus mRNA der Gerste gezielt α-Tubulin amplifiziert. Mit den von Heiko Sawitzky (MPI Ladenburg) zur Verfügung gestellten allgemeinen α-Tubulin-Primern konnten so verschiedene homologe α-Tubulin-Sonden (siehe Abb. 9) hergestellt werden.

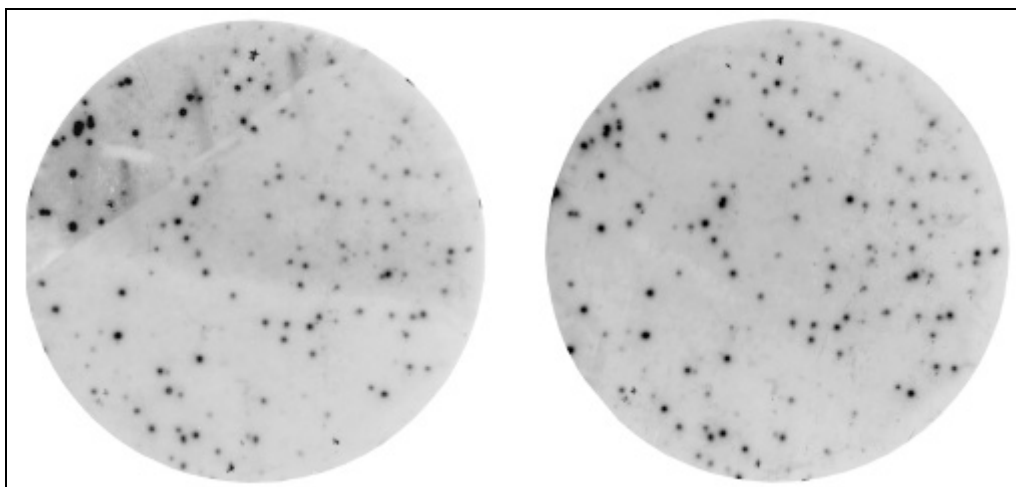
Die PCR-Reaktion mit der Primerkombination 212/214 ergab ein 325 bp-Amplifikat (siehe Abb. 9). Nach Ligation und Transformation konnten zwei Klone (12-2 und 12-3) isoliert werden, die zueinander eine DNA-Sequenzhomologie von 81 % aufwiesen. Klon 12-2 hatte mit 90 % die höchste Homologie zu einem α-Tubulin aus *Avena sativa* (ASATUBULP), Klon 12-3 hatte mit 95 % die höchste Homologie zu einem α-Tubulin aus *Triticum aestivum* (TAU76558). Mit der Primerkombination 211/214 wurde ein 641 bp-Fragment amplifiziert, das nach der Klonierung (Klon 11-3) als im Überlappungsbereich vollständig homolog zu 12-3 charakterisiert werden konnte. Auf die Darstellung der Sequenzen wird an dieser Stelle verzichtet, da keine Unterschiede zu den späteren cDNA-Klonen voller Länge vorhanden waren, die später aus der cDNA-Bibliothek isoliert wurden (siehe Kapitel 3.2.6).



**Abb. 9:** Lage der homologen  $\alpha$ -Tubulin-Sonden und Primer (Pfeilspitzen) zum kodierenden Bereich (ORF) bisher bekannter  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen höherer Pflanzen.

### 3.2.2 Screening der cDNA-Bibliothek nach Klonen hoher Abundanz

Um möglichst alle bei der Blattentwicklung relevanten Tubulin-Isotypen erfassen zu können, wurde zunächst die cDNA-Bibliothek „Blatt gesamt“ durchmustert. Vereinzelbare positive Signale waren hier nur dadurch zu erreichen, daß der Phagentiter auf  $1/5$  der üblichen Konzentration reduziert wurde. Nach dem Primärscreening von  $1 \times 10^4$  pfu konnten zwischen 70 und 120 positive Klone bestimmt werden (siehe Abb. 10), von denen ca. 20 bis 30 starke Signale ausgewählt wurden. Mit den Sonden 12-2 und 11-3 wurden jeweils ca.  $1 \times 10^4$  pfu hybridisiert. Die dabei isolierten 23 bzw. 34 Phagenklone aus der cDNA-Bibliothek „Blatt gesamt“ wurden durch weitere Screeningrunden vereinzelt und der *in vivo*-Excision unterzogen. Die ausgeschleusten Klone wurden dann mittels Restriktionsanalyse charakterisiert.

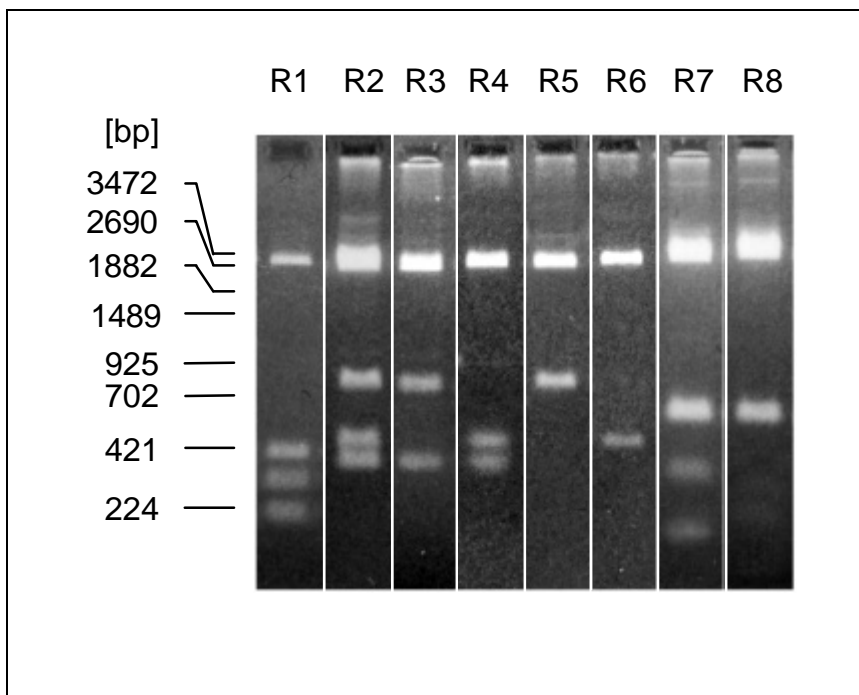


**Abb. 10:** Repräsentative Autoradiogramme von Plaquelift-Hybridisierungen.

Lift und Replika-Lift eines Plaquerasens mit ca.  $1 \times 10^4$  pfu der ersten Screeningrunde (Primärscreening), hybridisiert mit Sonde 11-3.

### 3.2.3 Charakterisierung der positiven cDNA-Klone durch Restriktionsanalyse

Die aus dem Screening mit der Sonde 12-2 stammenden 23 Klone wurden nach *in vivo*-Excision über Restriktionsanalysen mittels Mehrfachverdau (siehe Abb. 11) näher untersucht: Die Klone 1 bis 23 ließen sich nach 4 verschiedenen Restriktionsmustern, R1, R2, R7 und R8 (siehe Tab. 6) einordnen. Die aus dem Screening mit der Sonde 11-3 stammenden 34 Klone zeigten neben den schon bekannten Mustern R2 und R7 vier neue Restriktionsmuster, R3 bis R6.



**Abb. 11: Die repräsentativen Restriktionsmuster der isolierten  $\alpha$ -Tubulin-Klone.**

Restriktionsmuster R1 bis R8, Mehrfachverdau mit *Bgl* I, *EcoR* V, *Hind* III, *Nde* I, *Sal* I und *Xho* I (1,5 %iges Agarosegel).

Restriktionsmuster	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Anzahl Klone 12-2 Screening	1	3	/	/	/	/	10	9
Anzahl Klone 11-3 Screening	/	17	2	1	7	4	3	/

**Tab. 6: Einteilung der Klone in Gruppen gemäß gemeinsamer Restriktionsmuster.**

Aus jeder der acht Gruppen wurde jeweils ein Repräsentant sequenziert. Auf diese Weise konnten drei unterschiedliche, vollständige und neue Isotypen von  $\alpha$ -Tubulin charakterisiert werden: HVATUB1 (R1: Klon P1S1T9, 1617 bp), HVATUB2 (R2: Klon P1S5, 1708 bp) und HVATUB3 (R7: Klon 2\_07, 1692 bp) bzw. HVATUB3\* (Klon 2\_23 mit verkürztem 3'-Bereich, siehe Kapitel 3.2.6.3). Die cDNA-Sequenzen mit Sequenzvergleichen sind

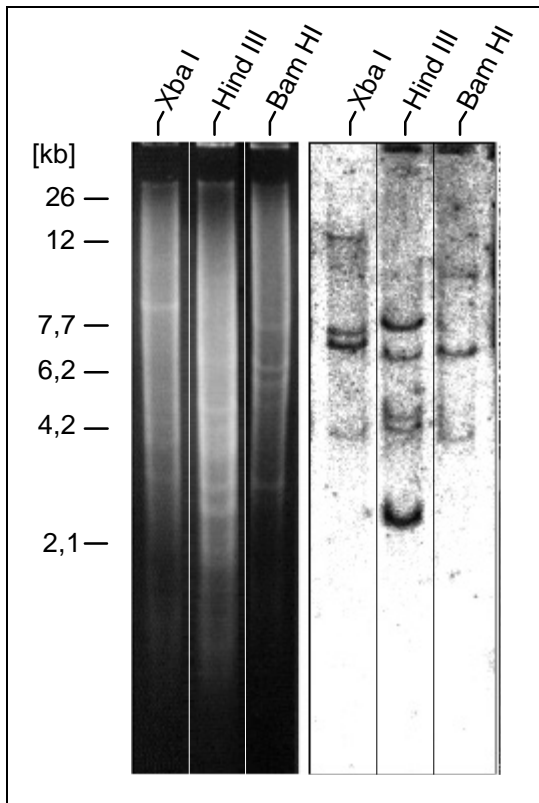
ausführlich in Kapitel 3.2.6 dargestellt. Die höchsten Homologien des kodierenden Bereichs zu den anderen  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen der Gerste und anderer Spezies sind im Kapitel 3.2.8 zusammengefaßt. Die Klone aus R3 bis R6 stimmten mit den R2-Klonen hinsichtlich der Sequenz überein, waren allerdings im 5'-Bereich unvollständig. Die R8-Klone entsprachen 5'-unvollständigen R7-Klonen. Insgesamt acht der 57 Klone ließen sich zu den Restriktionsmustern R5, R6 und R8 zuordnen und stellten sich aber nach Ansequenzieren als falsch-positiv heraus.

### **3.2.4 Abschätzung der Anzahl der $\alpha$ -Tubulin-Gene im Genom der Gerste durch Southernblot-Analysen**

Nachdem bisher drei Isotypen von  $\alpha$ -Tubulin isoliert werden konnten, wurde mittels Southernblot-Analysen die mögliche Gesamtzahl von  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen abgeschätzt, um die Erfolgsaussichten eines umfangreicheren Screenings von cDNA-Bibliotheken bewerten zu können.

Restringierte genomische DNA aus der Gerste wurde nach Elektrophorese und Transfer auf eine Membran mit homologen Tubulin DNA-Sonden hybridisiert, um anhand der auftretenden Banden die Anzahl vorhandener  $\alpha$ -Tubulin-Genorte abschätzen zu können. Die Matrizen-DNA für Sonden wurde aus möglichst konservierten Sequenzbereichen des kodierenden Bereichs gewählt, um auch potentielle, bisher unbekannte Isotypen abdecken zu können. Außerdem wurden die schon bekannten Sequenzinformationen genutzt, um Restriktionsenzyme auszuschließen, die innerhalb des Bindungsbereichs der jeweiligen Sonden schneiden können. Eine Überschätzung der Isotypenanzahl sollte so vermieden werden. Da die Intronsequenzen nicht bekannt waren, konnte dies jedoch nicht generell ausgeschlossen werden.

Genomische DNA (10 bis 50  $\mu$ g) wurde jeweils mit *Bam*H I, *Hind* III oder *Xba* I 48 h vollständig restringiert, elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abb. 12) und nach dem Transfer auf eine Membran mit einem Sondenmix (12-2 und 12-3) hybridisiert. Vier Banden wurden bei mit *Xba* I restringierter DNA detektiert (siehe Abb. 12 rechts): Die stärksten Signale zeigten die beiden Banden unterhalb 7,7 kb, die Banden bei 12 kb und 4 kb waren vergleichsweise schwach. Beim Restriktionsansatz mit *Hind* III konnten fünf Hybridisierungssignale nachgewiesen werden, am stärksten waren die Banden bei 7,4 kb und 2,1 kb, die Banden bei 6,5 kb, 4,6 kb und 4,2 kb zeigten die gleiche Intensität. Mit *Bam*H I restringierte DNA zeigte zwei schwache Banden bei 10,3 kb und 3,9 kb und eine stärkere bei 6,6 kb. Somit war mit weiteren  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen zu rechnen und ein weiteres Screening schien erfolgversprechend.



**Abb. 12: Abschätzung der Anzahl von  $\alpha$ -Tubulin-Genen im Gersten-Genom.**

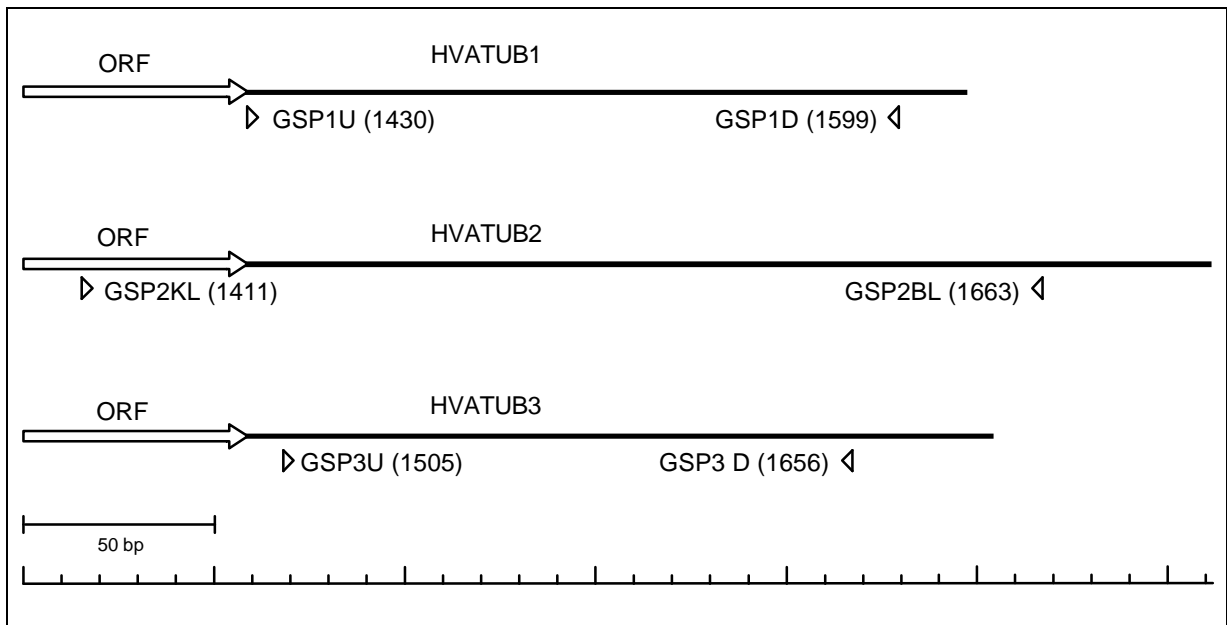
Links: Elektrophoretische Auftrennung genomischer DNA (40  $\mu$ g) von Gerste nach Restriktion mit *Xba* I, *Hind* III oder *Bam*HI (0,7 %iges Agarosegel). Rechts: Zugehöriger Southernblot, hybridisiert mit einem Sondenmix (12-2 und 12-3) spezifisch für den kodierenden Bereich von  $\alpha$ -Tubulin aus Gerste. Expositionsdauer 10 d.

### 3.2.5 Differenzierung $\alpha$ -Tubulin-positiver cDNA-Klone geringer Abundanz durch PCR

Um vor dem starken Hintergrund der schon bekannten Isotypen auch Klone sehr geringer Abundanz finden zu können, wurden alle weitere  $\alpha$ -Tubulin-positiven Klone nachfolgender Screenings einer „Negativ-Auslese“ über PCR unterzogen. Die nun vorhandenen Sequenzinformationen zu den drei Isotypen wurden genutzt, um aus dem nicht kodierenden 3'-Sequenzbereich isotypspezifische Primer abzuleiten. Nur  $\alpha$ -Tubulin-positive Klone, die nach der PCR mit 3'-spezifischen Primern keine Amplifikation zeigten, wurden weiter untersucht. Im Unterschied zur Analyse über Restriktion waren so auch im 5'-Bereich unvollständige, aber potentiell neue Isotypen charakterisierbar. Um in den ersten Blattsegmenten auftretende seltene Isotypen besser erfassen zu können, wurde das Screening auf die fraglichen cDNA-Bibliotheken („Segment 1“ und „Segment 2“) fokussiert. Außerdem sollten die  $\alpha$ -Tubulin-positiven Primärscreening-Klone bereits vor der zweiten Screeningrunde, *in vivo*-Excision und Plasmidpräparation auf unbekannte Isotypen untersucht werden, um den Zeit- und Materialaufwand zu minimieren.

Zunächst wurden von den nicht kodierenden 3'-Enden der bekannten  $\alpha$ -Tubulin cDNA-Klone Oligonukleotid-Sequenzen abgeleitet (zur genauen Sequenz, siehe Anhang), die zu in ihrer Länge deutlich unterscheidbaren PCR-Produkten führten (siehe Abb. 13). Dadurch sollte

erreicht werden, daß in einem einzigen Reaktionsansatz alle bekannten Isotypen getestet werden können. Diese Methode der Multiplex-PCR, bei der mehrere Primerpaare in einer PCR-Reaktion an jeweils unterschiedliche Matrizen-DNA binden können, schied jedoch aus, da es statt der erwarteten Amplifikationen nur zur Bildung von Primer-Dimerisierungsprodukten kam. Die  $\alpha$ -Tubulin cDNA-Klone mußten deshalb in konsekutiven PCR-Reaktionen mit den entsprechenden isotypspezifischen Primern getestet werden.



**Abb. 13: Positionen der isotypspezifischen  $\alpha$ -Tubulin-Primer.**

Dargestellt sind die letzten 60 bp des kodierenden Bereichs (ORF) und nicht kodierende 3'-Enden der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen aus Gerste. In Klammern ist die Position der Primer (Pfeilspitzen) angegeben. Die Größen der PCR-Amplifikate: HVATUB1-spezifisch: 170 bp. HVATUB2-spezifisch: 235 bp. HVATUB3-spezifisch: 160 bp.

Zusätzlich zum Screening der cDNA-Bibliothek „Blatt gesamt“ wurde die Suche nach neuen Isotypen auf die basalen Blattbereiche fokussiert. Durch Screening der cDNA-Bibliotheken „Segment 1“ und „Segment 2“ wurden bisher 163 positive Klone näher untersucht. Als HVATUB1 konnten 40 Klone charakterisiert werden, 15 Klone entsprachen HVATUB2 und 55 Klone konnten als HVATUB3 bestimmt werden. 16 Klone konnten mit allgemeinen  $\alpha$ -Tubulin-Primern als falsch-positiv charakterisiert werden. Als potentiell neue Formen kamen 37 der verbleibenden positiven Klone in Frage. Bisher konnten die ersten 25 durch Ansequenzieren wie folgt typisiert werden: Zwei Klone stellten bisher unbekannte Isotypen dar. Die beiden neuen Isotypen wurden als HVATUB4 und HVATUB5 bezeichnet, sie waren allerdings im 5'-Bereich unvollständig. Eine ausführliche Darstellung der cDNA-Sequenzen folgt in Kapitel 3.2.6.4 bzw. 3.2.6.5. Die höchsten Homologien des kodierenden Bereichs zu  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen anderer Spezies sind im Kapitel 3.2.8 (Tab. 10) zusammengefaßt. Von

den verbleibenden Klonen stellten 14 insgesamt fünf unterschiedliche Formen von HVATUB2 mit verkürztem nicht kodierendem 3'-Ende dar. Auch eine im nicht kodierenden 3'-Ende verkürzte Variante von HVATUB1 konnte isoliert werden. Möglicherweise stellen diese Formen multiple Polyadenylierungsvarianten dar. Tab. 7 gibt eine Übersicht über die Verteilung der verschiedenen  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen in den cDNA-Bibliotheken. Acht Klone mußten als falsch-positiv ausgeschlossen werden, die Untersuchung der letzten zwölf Klone steht noch aus.

Isotypen	cDNA-Bibliothek „Segment 1“	cDNA-Bibliothek „Segment 2“	cDNA-Bibliothek „Blatt-gesamt“
HVATUB1 (1600)	7	33	1
HVATUB1* (1586)	/	1	
HVATUB2 (1688)	9	6	28
HVATUB2* (1610)	1	/	
HVATUB2* (1630)	1	/	
HVATUB2* (1633)	/	1	
HVATUB2* (1634)	7	1	
HVATUB2* (1639)	1	/	
HVATUB3 (1675)	39	16	21
HVATUB3* (1626)	/	/	1
HVATUB4 (-)	1	/	
HVATUB5 (-)	/	1	
Falsch-positiv	14	10	8

**Tab. 7: Anzahl der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen und Formen mit verkürztem 3'-Ende in den cDNA-Bibliotheken.**

Mit \* bezeichnete Isotypen stellen die potentiellen Polyadenylierungsvarianten dar, in Klammern ist die Position des jeweiligen Polyadenylierungsstarts angegeben. Zur besseren Übersicht sind in der rechten Spalte zusätzlich die Ergebnisse aus den vorangegangenen Screeningrunden in der cDNA-Bibliothek „Blatt-gesamt“ zusammengefaßt.

### 3.2.6 Die cDNA-Sequenzen von *Hordeum vulgare* $\alpha$ -Tubulin

Den ausführlichen Sequenzdaten der einzelnen cDNAs ist ein Überblick über die Sequenzierungsstrategie vorangestellt. In den cDNA-Sequenzen sind die Positionen der Schnittstellen der wichtigsten Restriktionsenzyme eingetragen. Ein gerahmter Pfeil kennzeichnet den kodierenden Bereich. Einzelne cDNA-Klone sind als gerahmte Balken dargestellt und die durch die einzelnen Sequenzierungen abgedeckten Bereiche sind mit Pfeilen bezeichnet. Die benötigten sequenzspezifischen Primer sind mit den Synthesenamen (in Klammern) aufgeführt. Es konnten Leselängen von 0,4 bis über 1 kb erreicht werden. Alle zur Sequenzermittlung benötigten Primer (in Klammern) sind in Kapitel 2.4 bzw. im Anhang aufgeführt.

#### 3.2.6.1 Die *Hordeum vulgare* $\alpha$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVATUB1

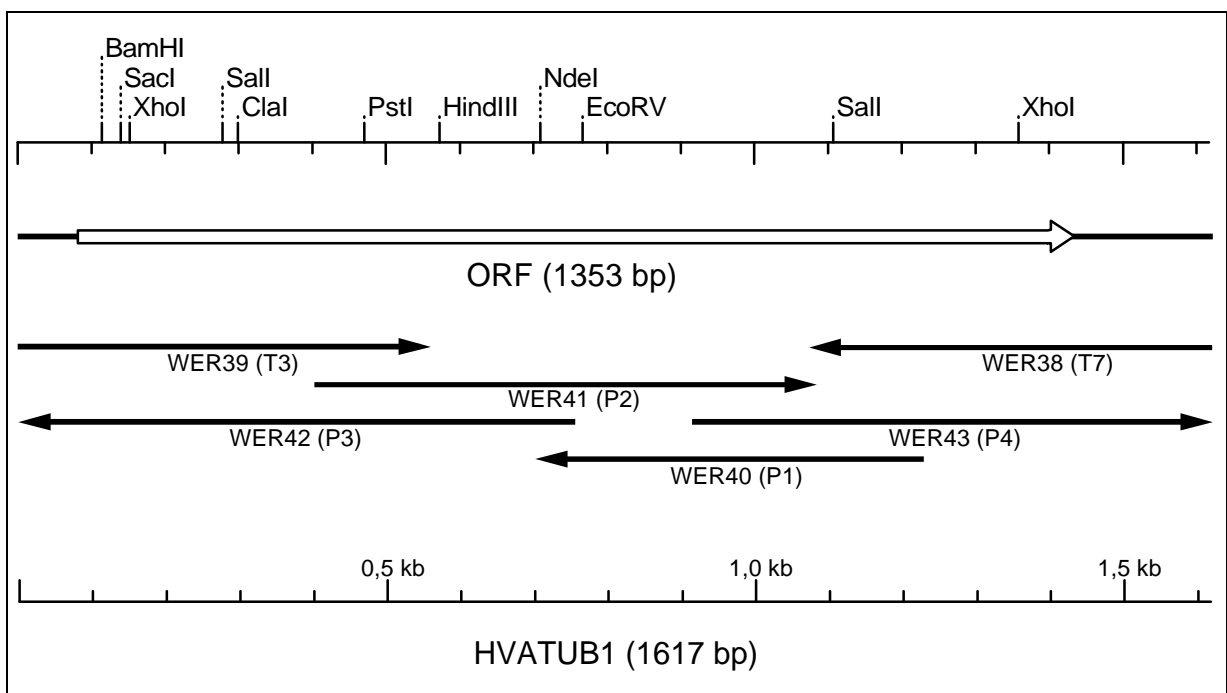


Abb. 14: Sequenzierungsstrategie von HVATUB1.

## Die cDNA-Sequenz von HVATUB1

Die für den *Hordeum vulgare*  $\alpha$ -Tubulin-Klon HVATUB1 ermittelte Sequenz umfaßte 1617 bp. Auf den kodierenden Bereich entfielen 1353 bp (siehe Abb. 14 und 15), auf den nicht kodierenden 5'-Bereich 77 bp und den nicht kodierenden 3'-Bereich ohne poly(A)-Ende 169 bp. Der nicht kodierende 3'-Bereich der kürzeren Variante umfaßte 154 bp. Die abgeleitete Aminosäuresequenz setzte sich aus 450 AS zusammen, hatte ein berechnetes Molekulargewicht von 49,6 kD und einen Isoelektrischen Punkt von 4,94.

```

1  GCCATTCTTT ACACCCAAGA AAGCCCGGAA GAGAAGGCGA GGGGCGAGGA GGAGGAGGAG
61  GAGGAGGAGG AGACGAGATG AGGGAGATCA TCAGCATCCA CATCGGCCAG GCCGGGATCC
      M R E I I S I H I G Q A G I

181  CCATGCCCAG TGACACCACG GTTGGGGTTG CACACGATGC GTTCAACACG TTCTTCAGTG
      T M P S D T T V G V A H D A F N T F F S

241  AGACCGGTGC GGGCAAGCAC GTGCCGAGGG CCATCTTCGT CGACCTTGAG CCCACTGTCA
      E T G A G K H V P R A I F V D L E P T V

301  TCGATGAGGT GCGCACCGGT GCCTACCGCC AGCTCTTCCA CCCGGAGCAG CTCATCTCTG
      I D E V R T G A Y R Q L F H P E Q L I S

361  GGAAGGAGGA TGCCGCCAAC AACTTCGCCC GTGGCCACTA CACTGTTGGA AAGGAGATCG
      G K E D A A N N F A R G H Y T V G K E I

421  TAGATCTATG TCTGGATCGT GTACGCAAAT TGGCAGACAA TTGCACCGGG CTGCAGGGAT
      V D L C L D R V R K L A D N C T G L Q G
481  TCTTGGTGTT CAATGCTGTC GGTGGTGGAA CTGGATCAGG ACTGGGTTCT CTGTTGTTGG
      F L V F N A V G G G T G S G L G S L L L

541  AGCGCCTCTC GGTTGATTAT GGCAAGAAAT CTAAGCTTGG ATTCACCATT TACCCTTCCC
      E R L S V D Y G K K S K L G F T I Y P S

601  CACAGGTCTC AACAGCTGTT GTAGAACCAT ACAACAGTGT CCTCTCCACT CACTCTTTGC
      P Q V S T A V V E P Y N S V L S T H S L

661  TTGAGCACAC CGACGTTGCG GTCCTCCTAG ATAACGAGGC TATCTATGAC ATATGCCGGA
      L E H T D V A V L L D N E A I Y D I C R

721  GGTCTCTTGA CATTGAGAGG CCAACCTACA CCAACTTGAA CAGGCTGATA TCACAGATCA
      R S L D I E R P T Y T N L N R L I S Q I

781  TATCTTCTCT TACCACCTCC CTGAGGTTTG ATGGTGCCAT CAATGTGGAT GTCACAGAGT
      I S S L T T S L R F D G A I N V D V T E

841  TCCAGACCAA CCTTGTCCTT TACCCACGTA TCCATTTTCA GCTTTCGTGC TATGCCCTTG
      F Q T N L V P Y P R I H F M L S S Y A P

901  TTATCTCTGC CGAGAAGGCT TACCATGAGC AGCTCTCTGT GCCTGAAATC ACCAATGCTG
      V I S A E K A Y H E Q L S V P E I T N A

961  TCTTTGAGCC CTCAAGCATG ATGGCCAAGT GTGACCCTAG GCATGGAAAA TATATGGCCT
      V F E P S S M M A K C D P R H G K Y M A

1021 GCTGCTTGAT GTACCGTGGT GATGTTGTTT CCAAGGATGT CAATGCCGCG GTAGCAACCA
      C C L M Y R G D V V P K D V N A A V A T

1081 TCAAAAACCA GAGAACTGTC CAGTTCGTGC ACTGGTGCCC TACCGGGTTC AAGTGTGGCA
      I K T K R T V Q F V D W C P T G F K C G

```

```

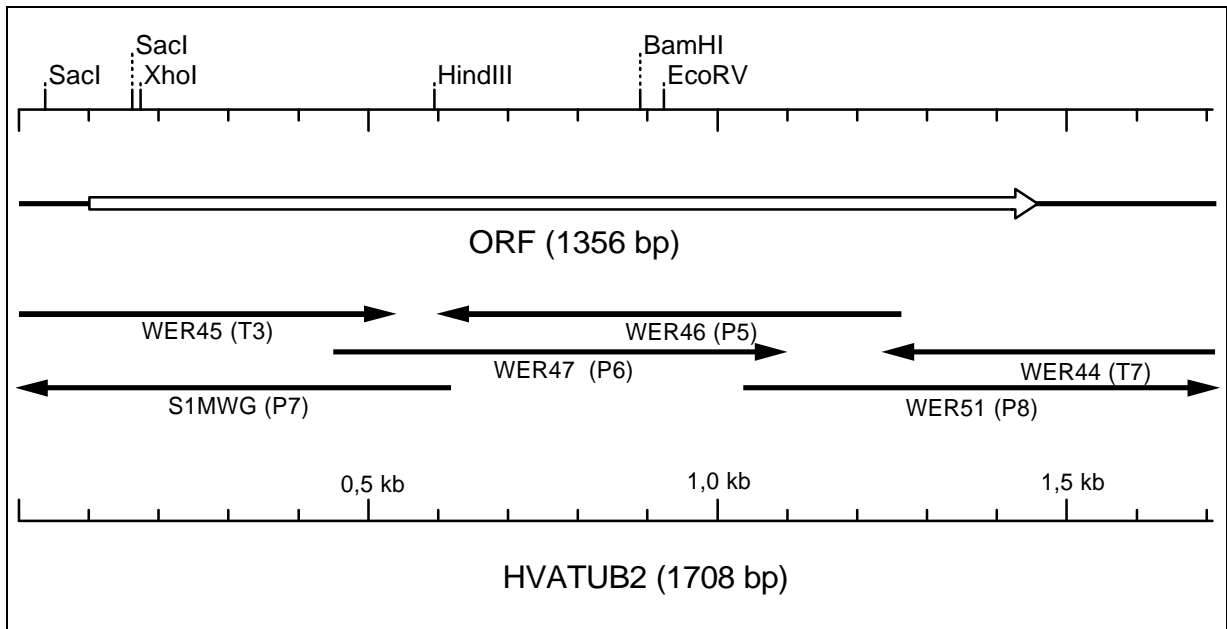
1141 TCAACTACCA GCCACCTTCC GTCGTCCCCG GAGGTGACCT GGCAAAGGTT CAGCGCGCCG
      I N Y Q P P S V V P G G D L A K V Q R A
1201 TGTGCATGAT CAGCAACAAC ACCGCTGTCG CCGAAGTGTT CTCGCGCATC GACCACAAGT
      V C M I S N N T A V A E V F S R I D H K
1261 TCGACTTGAT GTACGCCAAG CGTGCCTTCG TGCACTGGTA CGTCGGCGAG GGAATGGAGG
      F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E
1321 AAGGTGAGTT CTCGGAGGCT CGTGAGGACT TGGCCGCCCT CGAGAAGGAC TACGAGGAAG
      E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E
1381 TTGGCGCCGA AGGCGCGGAC GACGAGGGCG ACGAGGGCGA TGACTACTAA GTAGCTGGTT
      V G A E G A D D E G D E G D D Y Stopp
1441 AATAAGGTAG TTGGCTGGTT AATGATTGGC TTTGATCTGT ATACTCGGTA ATTTGGTTCC
1501 GTTGCATTAC ATATTGATTG CTGTTATGCG TGTTCCTTT CCTGTAATGT ACTGAAGATG
1561 TTGTTAGGGT GGCCATGATT GTTGATACCC CATTTCACA AAAAAAAAAA AAAAAA

```

**Abb. 15: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz von HVATUB1.**

Die Position der 11-3-Sonde ist unterstrichen, die der 12-2- bzw. 12-3-Sonde doppelt unterstrichen, das HVATUB1-spezifische PCR-Amplifikat (Primerkombination GSP1D/GSP1U) gestrichelt unterlegt. Start und Ende des bei der potentiellen Polyadenylierungsvariante fehlenden 3'-Bereiches sind durch „-“ gekennzeichnet. TG-reiche Regionen im 3'-Ende sind grau unterlegt.

### 3.2.6.2 Die *Hordeum vulgare* $\alpha$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVATUB2



**Abb. 16: Sequenzierungsstrategie von HVATUB2.**

## Die cDNA-Sequenz von HVATUB2

Die für den *Hordeum vulgare*  $\alpha$ -Tubulin-Klon HVATUB2 ermittelte Sequenz (siehe Abb. 16 und 17) umfaßte 1708 bp. Auf den kodierenden Bereich entfielen 1356 bp, auf den nicht kodierenden 5'-Bereich 99 bp und den nicht kodierenden 3'-Bereich ohne poly(A)-Ende 232 bp. Die nicht kodierenden 3'-Bereiche der potentiell variabel polyadenylierten Transkripte umfassten 183 bp, 178 bp, 177 bp, 174 bp und 154 bp und sind in Abb. 18 gegenübergestellt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz setzte sich aus 451 AS zusammen, hatte ein berechnetes Molekulargewicht von 49,7 kD und einen Isoelektrischen Punkt von 4,86.

```

1  GGAAAGGCGT  C TTCGTACTC  GCCTCTCTCC  GCGCACACGA  GCTCTCGCCC  CCTTCCTCCA
61  ACCCATCTCG  CCAGCGGCGC  AGCCCAACCA  CCCGCCACAA  TGAGGGAGTG  CATCTCGATC
                                     M R E C I S I

121  CACATCGGCC  AGGCCGGCAT  CCAGGTCGGA  AACGCGTGCT  GGGAGCTCTA  CTGCCTCGAG
      H I G Q A G I Q V G N A C W E L Y C L E

181  CATGGCATTC  AGCCTGATGG  TCAGATGCCC  GGTGACAAGA  CCGTTGGGGG  AGGTGATGAT
      H G I Q P D G Q M P G D K T V G G G D D

241  GCTTTC AACA  CCTTCTTCAG  CGAGACTGGT  GCTGGGAAGC  ACGTCCCCCG  TGCAGTCTTT
      A F N T F F S E T G A G K H V P R A V F

301  GTTGATCTTG  AGCCTACTGT  GATTGATGAG  GTGAGGACTG  GTGCTTACCG  CCAGCTCTTC
      V D L E P T V I D E V R T G A Y R Q L F

361  CACCCTGAGC  AGCTTATCAG  TGGCAAGGAG  GATGCAGCCA  ACAACTTCGC  CCGTGGTCAT
      H P E Q L I S G K E D A A N N F A R G H

421  TACACCATTG  GCAAGGAGAT  TGTTGATCTG  TGCCTTGACC  GTATCAGGAA  GCTGTCCGAC
      Y T I G K E I V D L C L D R I R K L S D

481  AACTGCACTG  GTCTCCAGGG  CTTCTTGTGC  TTCAATGCTG  TTGGAGGTGG  AACTGGCTCT
      N C T G L Q G F L V F N A V G G G T G S

541  GGCCTTG GTT  CTCTTCTCCT  AGAGCGTCTC  TCTGTTGACT  ATGGAAAGAA  GTCCAAGCTT
      G L G S L L L E R L S V D Y G K K S K L

601  GGGTTACACAG  TGTACCCATC  TCCCAGGTG  TCCACCTCTG  TTGTTGAGCC  ATACAACAGT
      G F T V Y P S P Q V S T S V V E P Y N S

661  GTCCTGTCCA  CCCACTCCCT  CTTGAGCAC  ACCGATGTCT  CTATCCTGCT  TGACAATGAG
      V L S T H S L L E H T D V S I L L D N E

721  GCCATCTATG  ACATCTGCCG  CCGCTCCCTT  GACATTGAGC  GCCCAACATA  CACCAACCTC
      A I Y D I C R R S L D I E R P T Y T N L

781  AACAGGCTTG  TTTCTCAGGT  CATATCATCA  CTGACTGCTT  CCCTGAGGTT  TGACGGTGCT
      N R L V S Q V I S S L T A S L R F D G A

841  CTGAATGTTG  ATGTGAATGA  GTTCCAAACC  AACCTGGTGC  CCTACCCAAG  GATCCACTTC
      L N V D V N E F Q T N L V P Y P R I H F

901  ATGCTTTTCT  CCTATGCCCC  AGTGATATCA  GCAGAGAAGG  CTTACCATGA  GCAGCTGTCT
      M L S S Y A P V I S A E K A Y H E Q L S

961  GTTGCCGAGA  TCACCAACAG  TGCATTTCGAG  CCTTCCTCCA  TGATGGCCAA  GTGTGACCCC
      V A E I T N S A F E P S S M M A K C D P

1021  CGCCATGGCA  AGTACATGGC  CTGCTGTCTC  ATGTACCGTG  GGGATGTCGT  GCCCAAGGAC
      R H G K Y M A C C L M Y R G D V V P K D

```

```

1081  GTCAACGCTG CTGTGGCCAC CATCAAGACC AAGCGCACTA TCCAGTTTGT TGACTGGTGC
      V N A A V A T I K T K R T I Q F V D W C
1141  CCCACTGGCT TCAAGTGGG TATCAACTAC CAGCCACCTG GTGTCGTCCC AGGGGGCGAC
      P T G F K C G I N Y Q P P G V V P G G D
1201  CTTGCCAAGG TCCAGAGGGC TGTGTGCATG ATCTCCAACT CCACCAGTGT TGTTGAGGTC
      L A K V Q R A V C M I S N S T S V V E V
1261  TTCTCCCGCA TCGACCACAA GTTTGACCTG ATGTACGCCA AGCGTGCCTT TGTCCACTGG
      F S R I D H K F D L M Y A K R A F V H W
1321  TATGTGGGTG AGGGTATGGA GGAGGGAGAG TTCTCTGAGG CCCCTGAGGA CCTTGCTGCC
      Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A
1381  CTGGAGAAGG ACTATGAAGA AGTTGGTGCT GAGTTCGACG ATGGTGAGGA TGGTGACGAG
      L E K D Y E E V G A E F D D G E D G D E
1441  GGTGATGAGT ACTAGAGCCT GCCTCCTGGT GCTTTCCCAA GGCCTACTAC TGCTATCCTA
      G D E Y STOPP
1501  TGATCTGCCC AAGCGGCTTT ATCTGTTATC TGTCTGTTT AATGTTTGTCT TTGTGGTGT
1561  TGTTTTACAA CCTGTTGTGT TGTAAGAACA TATTGGTCTG TCTGAACCTA ATGTTATGTG
1621  CATGCGGTTA TCTATGCCTT GGCCTCTGTC TCCATTTTCC TGTTTCAATA TGTGTTACTA
1681  TCTGGTTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA
    
```

**Abb. 17: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz von HVATUB2.**

Die Position der 11-3-Sonde ist unterstrichen, die der 12-2 bzw. 12-3-Sonde doppelt unterstrichen, das HVATUB2-spezifische PCR-Amplifikat (Primerkombination GSP2BR/GSP2BL) gestrichelt. **TG-reiche** Regionen im 3'-Ende sind grau unterlegt. Das mögliche **Polyadenylierungssignal** ist fett hervorgehoben, die potentiellen variablen Polyadenylierungsstarts sind mit „-“ gekennzeichnet, die nicht kodierenden 3'-Bereiche jeder einzelnen potentiellen Polyadenylierungsvariante sind zur besseren Übersicht gesondert in Abb. 18 dargestellt.

1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
*	*	*	*	*	*	*	*
TAATGTTATGTGCATGCGGTTATCTATGCCTTGGCCTCTGTCTCCATTTTCTGTTTCAATATGTGTTACTATCTGGTT(A) <sub>21</sub>							
..... (A) <sub>21</sub>						Klon	75-0-5
..... (A) <sub>18</sub>						Klon	4.5-5-10
..... (A) <sub>19</sub>						Klon	71-0-5
..... (A) <sub>30</sub>						Klon	60-0-5
..... (A) <sub>30</sub>						Klon	79-0-5
..... (A) <sub>20</sub>						Klon	6-0-5
..... (A) <sub>18</sub>						Klon	65-0-5
..... (A) <sub>18</sub>						Klon	69-0-5
..... (A) <sub>19</sub>						Klon	76-0-5
..... (A) <sub>22</sub>						Klon	9-5-10
..... (A) <sub>28</sub>						Klon	57-0-5
. (A) <sub>21</sub>						Klon	32-0-5
*	*	*	*	*	*	*	*
1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680

**Abb. 18: Gegenüberstellung der 3'-Regionen der potentiellen HVATUB2-Polyadenylierungsvarianten.** in der ersten Zeile ist die am häufigsten aufgetretene Form von HVATUB2 ab Position 1609 bp aufgeführt.

### 3.2.6.3 Die *Hordeum vulgare* $\alpha$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVATUB3

Zur Ermittlung der vollständigen cDNA-Sequenz wurde außer dem Klon 2\_07 zusätzlich der *Bam*H I-Deletionsklon von 2\_07 (D2\_07) und der im 5'-Ende um 340 bp kürzere, aber sonst vollständig sequenzhomologe Klon 2\_09 herangezogen (siehe Abb. 19).

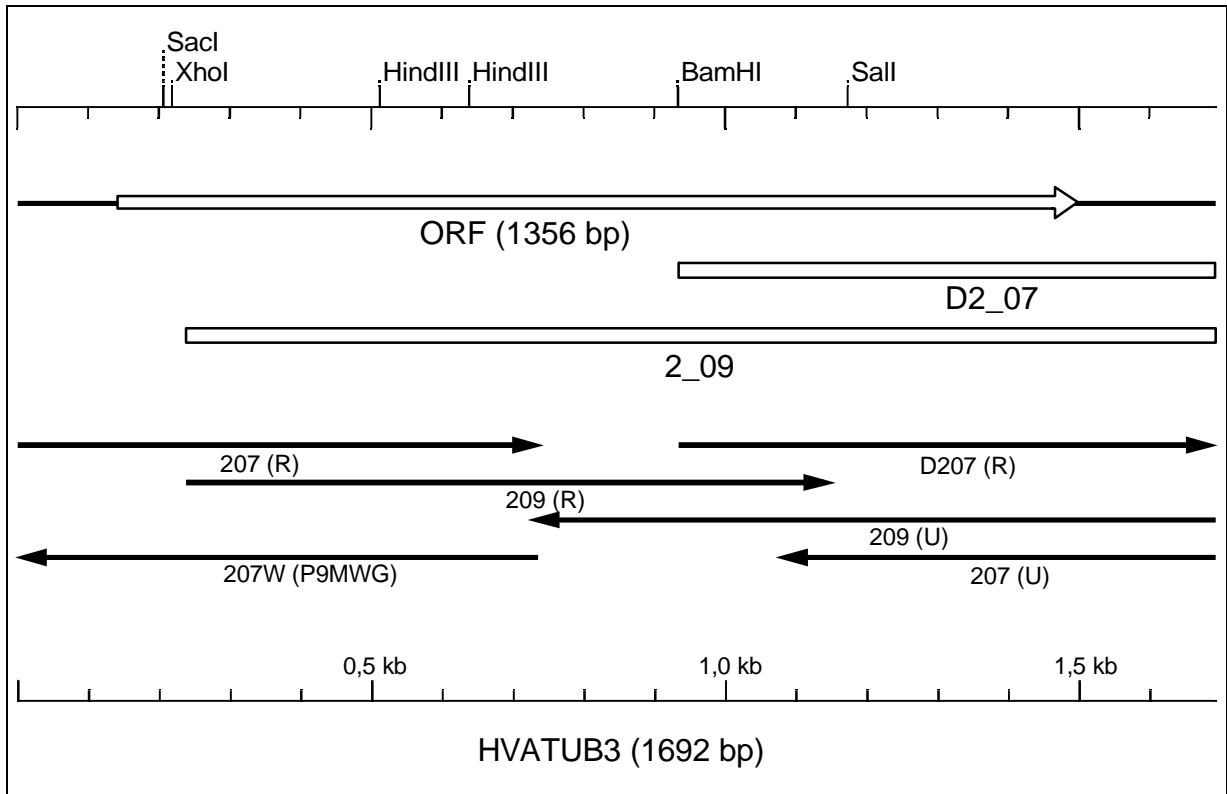


Abb. 19: Sequenzierungsstrategie von HVATUB3.

Die cDNA-Sequenz von HVATUB3

Die für den *Hordeum vulgare*  $\alpha$ -Tubulin-Klon HVATUB3 ermittelte Sequenz umfaßte 1692 bp (siehe Abb. 19 und 20). Auf den kodierenden Bereich entfielen 1356 bp, den nicht kodierenden 5'-Bereich 143 bp und den nicht kodierenden 3'-Bereich ohne poly(A)-Ende 173 bp. Der nicht kodierende 3'-Bereich des potentiell variabel polyadenylierten Transkripts umfaßte 127 bp. Die abgeleitete Aminosäuresequenz setzte sich aus 451 AS zusammen, hatte ein berechnetes Molekulargewicht von 49,7 kD und einen Isoelektrischen Punkt von 4,87.



```

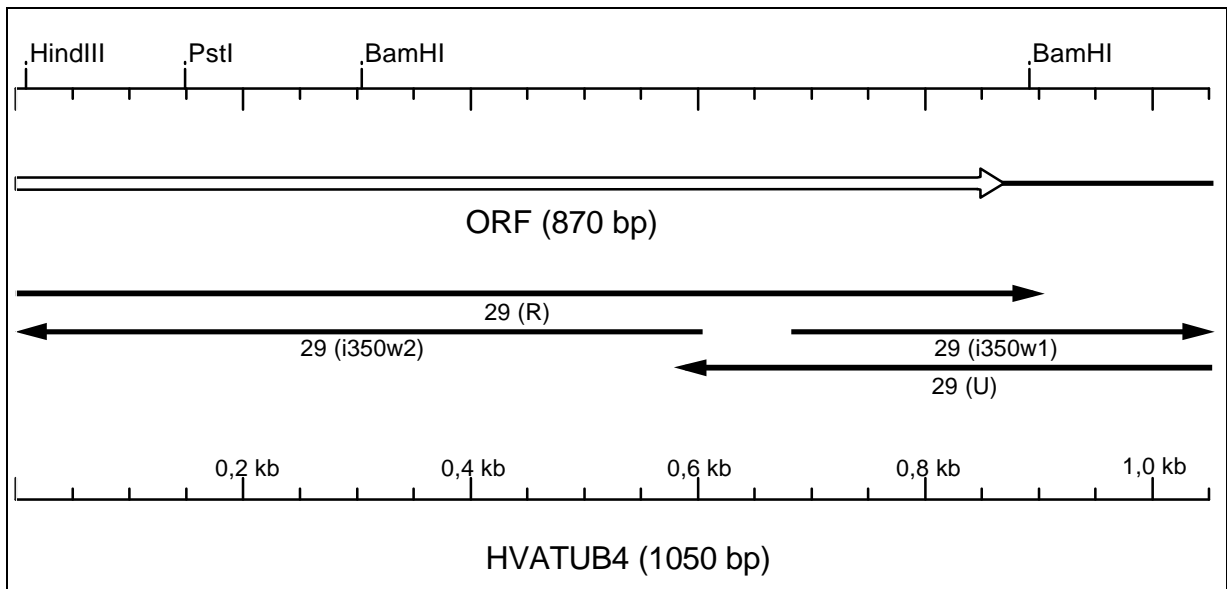
1441  AGGAAGTTGG CGCCGAGTTC GACGAGGGCG AGGACGGTGA TGAGGGCGAC GAGTACTAGA
      E E V G A E F D E G E D G D E G D E Y STOPP
1501  AGCCTGCCTC CTGGGGTGCT GCTGCCACCC TGTGATCTGC CCGAGTGGCT TTATCTGTTT
1561  GAATGCTTGC TTTGCTTTGT GGTGTTGGT TTACAACCGT GTTGTAAGAG CCTGTGGTAT
1621  GTTTGAACCC TGTCGCACCT TGGTTAATAT GCATGTTATC TGGTTTGCCT ACACAAAAAA
1681  AAAAAAAAAA AA

```

**Abb. 20: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz von HVATUB3.**

Die Position der 11-3-Sonde ist unterstrichen, die der 12-2- bzw. 12-3-Sonde doppelt unterstrichen, das HVATUB3-spezifische PCR-Amplifikat (Primerkombination GSP3BL/GSP3BR) gestrichelt. Das mögliche Polyadenylierungssignal ist fett hervorgehoben. TG-reiche Regionen im 3'-Ende sind grau unterlegt. Anfang und Ende des bei der potentiellen Polyadenylierungsvariante fehlenden Bereiches sind mit „-“ gekennzeichnet.

### 3.2.6.4 Die *Hordeum vulgare* $\alpha$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVATUB4



**Abb. 21: Sequenzierungsstrategie von HVATUB4.**

Die cDNA-Sequenz von HVATUB4

Der im 5'-Bereich unvollständige *Hordeum vulgare*  $\alpha$ -Tubulin-Klon HVATUB4 umfaßte 1050 bp (siehe Abb. 21 und 22), auf den kodierenden Bereich entfielen 870 bp und auf den nicht kodierenden 3'-Bereich ohne poly(A)-Ende 161 bp. Aus der unvollständigen Sequenz konnten 289 C-terminale Aminosäuren abgeleitet werden, aufgrund der Unvollständigkeit der Transkripts wurde auf eine Berechnung von Isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht verzichtet.

```

1  AAGAAGTCCA AGCTTGGGTT CACCGTGTAC CCATCTCCTC AGGTGTCAAC CTCTGTGGTT
   K K S K L G F T V Y P S P Q V S T S V V
61  GAGCCCTACA ACAGTGTGCT GTCCACCCAC TCTCTGCTGG AGCACACTGA TGTCTCAATC
   E P Y N S V L S T H S L L E H T D V S I
121 CTGCTCGATA ACGAGGCCAT CTACGACATC TGCAGGCGCT CCCTGGACAT TGAGAGGCCC
   L L D N E A I Y D I C R R S L D I E R P
181 ACCTACACCA ACCTGAACCG CCTCGTCTCT CAGGTTATCT CATCTCTGAC CACCTCCCTG
   T Y T N L N R L V S Q V I S S L T T S L
241 AGGTTTGATG GTGCCCTGAA CGTGGACGTG ACCGAGTTCC AGACCAACCT TGTGCCGTAC
   R F D G A L N V D V T E F Q T N L V P Y
301 CCTAGGATCC ACTTCATGCT CTCGTCCTAC GCGCCGGTCA TCTCGGCGGA GAAGGCGTAC
   P R I H F M L S S Y A P V I S A E K A Y
361 CACGAGCAGC TGTCGGTGTC GGAGATCACC AACAGCGCGT TCGAGCCGTC GTCCATGATG
   H E Q L S V S E I T N S A F E P S S M M
421 GCCAAGTGTG ACCCTCGCCA CGGCAAGTAC ATGGCGTGCT GCCTCATGTA CCGGGGCGAC
   A K C D P R H G K Y M A C C L M Y R G D
481 GTGGTGCCCA AGGACGTGAA CGCGGCCGTT GCCACCATCA AGACCAAGCG CACCATCCAG
   V V P K D V N A A V A T I K T K R T I Q
541 TTCGTGGACT GGTGCCCCAC GGGGTTCAAG TGCGGCATCA ACTACCAGCC GCCCACTGTG
   F V D W C P T G F K C G I N Y Q P P T V
601 GTGCCCCGCG GCGACCTGGC CAAGGTGCAG AGGGCCGTCT GCATGATCTC CAACTCCACC
   V P G G D L A K V Q R A V C M I S N S T
661 AGCGTCGTCG AGGTCTTCTC CCGCATTGAC CACAAGTTCG ACCTCATGTA CGCCAAGCGC
   S V V E V F S R I D H K F D L M Y A K R
721 GCCTTCGTCC ACTGGTACGT GGGCGAGGGC ATGGAGGAGG GCGAGTTCTC GGAGGCCCGT
   A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R
781 GAGGACCTGG CCGCCCTGGA GAAGGACTAC GAGGAGGTCG GCGCAGAGGG CGGCGACGAC
   E D L A A L E K D Y E E V G A E G G D D
841 GAGGATGGCG AGGAGGACGA CGACTACTGA TCTGCTCGTC CGCTCGACGG AGGATCCGTC
   E D G E E D D D Y STOPP
901 TCCTCTGCCG CCTATCTTTA ACTACATGTT GCTTTGCCGT CCTGTTTTGG GGTGAGGTTG
961 TAAGCCATCG GTGCTTTCTA TGTCGCTGTT GAACTGCATC ATTAGTACTT CGTGGAACAA
1021 GTATCTCGCT TAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

**Abb. 22: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz von HVATUB4.**

Die Position der 11-3-Sonde ist unterstrichen, die der 12-2- bzw. 12-3-Sonde doppelt unterstrichen, das mögliche **Polyadenylierungssignal** ist fett hervorgehoben und TG-reiche Regionen im 3'-Ende sind grau unterlegt. Das HVATUB4-spezifische PCR-Amplifikat (Primerkombination GSP4EL/GSP4ER) ist gestrichelt unterlegt.

### 3.2.6.5 Die *Hordeum vulgare* $\alpha$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVATUB5

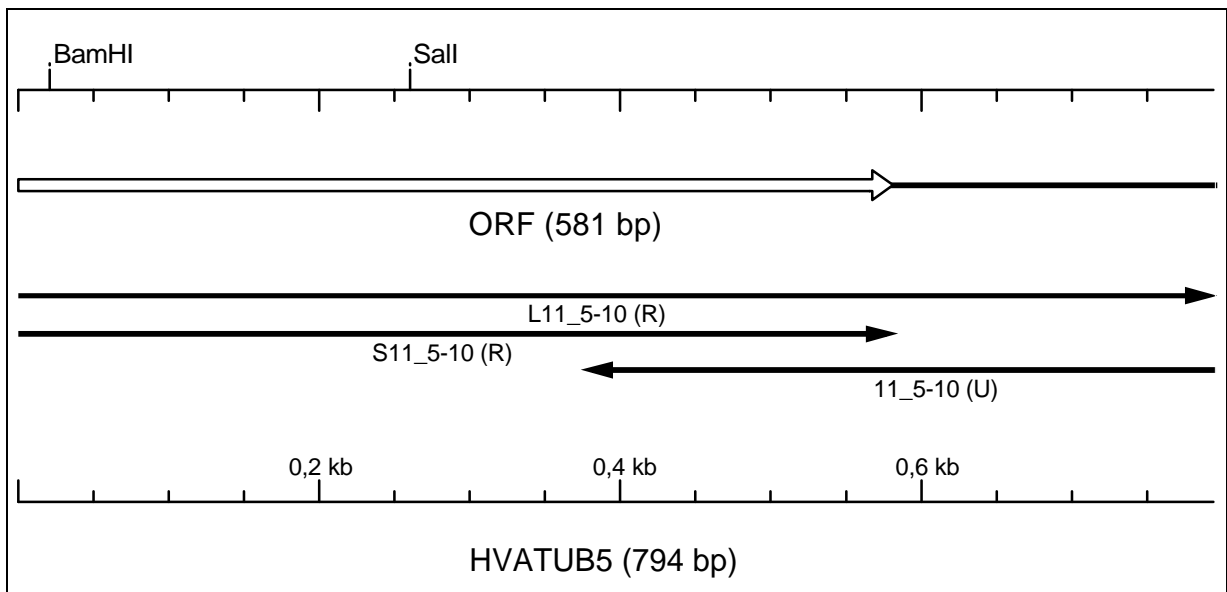


Abb. 23: Sequenzierungsstrategie von HVATUB5.

Die cDNA-Sequenz von HVATUB5

Der im 5'-Bereich unvollständige *Hordeum vulgare*  $\alpha$ -Tubulin-Klon HVATUB5 umfaßte 794 bp (siehe Abb. 23 und 24), auf den kodierenden Bereich entfielen 581 bp und auf den nicht kodierenden 3'-Bereich ohne poly(A)-Ende 188 bp. Aus der unvollständigen Sequenz konnten 192 C-terminale Aminosäuren abgeleitet werden, aufgrund der Unvollständigkeit der Transkripts wurde auf eine Berechnung von Isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht verzichtet.

```

1  CCAACCTGGT GCCGTACCCG AGGATCCACT TCATGCTCTC CTCCTACGCG CCCATCATCT
   N L V P Y P R I H F M L S S Y A P I I
61  CCGCGGAGAA GGCCTTCCAC GAGCAGCACT CTGTCCCCGA GATCACCAAC ACCGTGTTCCG
   S A E K A F H E Q H S V P E I T N T V F
121 AGCCGTCGAG CGTCATGGCC AAGTGCAGCC CCCGGCACGG CAAGTACATG GCGTGCTGCC
   E P S S V M A K C D P R H G K Y M A C C
181 TCATGTACCG CGGCGACGTC GTGCCAAGG ACGTCAACTC CGCCGTCCAC TCCATCAAGA
   L M Y R G D V V P K D V N S A V H S I K
241 CCAAGAGGAC CGTGCAGTTC GTCGACTGGT GCCCGACTGG GTTCAAGTGC GGGATAAACT
   T K R T V Q F V D W C P T G F K C G I N
301 ACCAGCCGCC GACGGTGGTT CCGGGAGGGG ACCTGGCCAA GGTGCGGCGG GCGGTGTGCA
   Y Q P P T V V P G G D L A K V R R A V C
361 TGATCAGCAA CAACACGGCG GTGGCCGAGG TCTTCTCGCG CATCGACCGC AAGTTCGACC
   M I S N N T A V A E V F S R I D R K F D

```

```

421  TCATGTACGC CAAGCGCGCG TTCGTGCACT GGTACGTCGG GGAAGGGATG GAGGAGGGGG
      L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G
481  AGTTCTCGGA GGCCAGGGAG GACCTGGCCG CGCTGGAGAA GGACTACGAG GAGGTCCGAG
      E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G

541  CTGAGGGTGA AGACGACGAC GACGAAGTTG ATGAGTACTG AGTTGATCGG TCGTGCTTAA
      A E G E D D D D E V D E Y STOPP

601  TTGGGTGGC AGTGTGTGC ACTTCTATGC CGTTCCTTCT TCTCTGTCCC TGTTTTGCTG
661  TTGCATCTGT GATGTTCGGT GGTTAGCAGA GTAAAAAACT TGTCAGATTG ATTCGTATGC
721  TCTGACGGTT CAGTGCCACA TAATAATGAA CGAAGAGTTT TTGTACTGTA AAAAAAAAAA
781  AAAAAAAAAA AAAAA

```

**Abb. 24: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz von HVATUB5.**

Der Bindungsbereich der 11-3-Sonde ist unterstrichen und der der 12-2- bzw. 12-3-Sonde doppelt unterstrichen dargestellt. Das mögliche **Polyadenylierungssignal** ist fett hervorgehoben und **TG-reiche** Regionen im 3'-Ende sind grau unterlegt. Das HVATUB5-spezifische PCR-Amplifikat (Primerkombination GSP5CL/GSP5CR) ist gestrichelt.

Zur Untersuchung der isotypspezifischen Genexpression konnte die bereits jetzt bekannte Sequenzinformation der nicht kodierenden 3'-Bereiche aller fünf  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen genutzt werden (siehe Kapitel 3.5.1.2). Die entsprechenden vollständigen cDNA-Sequenzen von HVATUB4 und HVATUB5 könnten durch ein erneutes cDNA-Bibliothek-Screening mit 5'-nahen HVATUB4- und HVATUB5-spezifischen Gensonden, über eine genomische Bibliothek oder durch 5'-RACE (rapid amplification of cDNA-ends) ermittelt werden.

### 3.2.7 Die Basenverteilung in den cDNA-Sequenzen HVATUB1 bis HVATUB5

Die Basenverteilung in den untersuchten cDNA-Sequenzen wurde anhand des Gehalts der Purinbasen (A/T) dargestellt. Für die kodierenden Bereiche der  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen konnte ein Gehalt von durchschnittlich knapp 45 % ermittelt werden (siehe Tab. 8). Die nicht kodierenden 5'-Bereiche waren mit durchschnittlich 32 % ärmer an Purinbasen. Der A/T-Gehalt der nicht kodierenden 3'-Regionen ohne Poly(A)-Sequenz war gegenüber allen anderen Regionen deutlich höher.

	A/T-Gehalt [%]		
	5'-nicht kodierend	kodierend	3'-nicht kodierend
HVATUB1	39,0	44,9	59,2
HVATUB2	32,3	45,3	57,3
HVATUB3	25,9	43,7	50,9
HVATUB4	/	/	49,7
HVATUB5	/	/	56,4

**Tab. 8: Basengehalte kodierender und nicht kodierender Regionen bei  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen aus Gerste.**

Bei HVATUB4 und HVATUB5 sind nur die nicht kodierenden 3'-Bereiche aufgeführt, da die 5'-Bereiche nur teilweise bekannt sind.

### 3.2.8 Sequenzvergleiche der $\alpha$ -Tubulin-Isotypen der Gerste

Bei einem Sequenzvergleich (siehe Abb. 25) auf Basis der abgeleiteten Aminosäuren mit HVATUB2 als Referenz zeigten HVATUB2, HVATUB3 und HVATUB4 (soweit die Sequenz bis jetzt bekannt) die größten Übereinstimmungen, HVATUB1 und HVATUB5 (soweit die Sequenz bis jetzt bekannt) wichen stärker ab. Die größten Unterschiede zeigten sich in den letzten 11 bis 13 AS des C-Terminus.

HVATUB2	1	MRECISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIQPDGQMPGDKTVGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFDLEPTVIDEVRT
HVATUB3	1	.....
HVATUB4	1	-----
HVATUB1	1	...I.....NQ..T..S.T...VAH.....I.....
HVATUB5	1	-----
HVATUB2	81	GAYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLSDNCTGLQGFLVFNVAVGGGTGSGLGSLLLERLSVD
HVATUB3	81	.T.....A.....
HVATUB4	1	-----
HVATUB1	81	.....V.....V..A.....
HVATUB5	1	-----
HVATUB2	161	YGKSKLGFVYVSPQVSTSVVEPYNSVLSTHSLLEHTDVSILLDNEAIYDICRRSLDIERPTYTNLNLVSVQVISSLTA
HVATUB3	161	.....AV.....
HVATUB4	1	--.....T
HVATUB1	161	.....I.....A.....AV.....I..I...T
HVATUB5	1	-----
HVATUB2	241	SLRFDGALNVDVNEFQTNLVPYPRIHFLSSYAPVISA EKAYHEQLSVAEITNSAFEPSSMMAKCDPRHGKYMACLMYR
HVATUB3	241	.....
HVATUB4	79	.....T.....S.....
HVATUB1	241	.....I...T.....P...AV.....
HVATUB5	1	-----I...F...H..P...TV...V.....
HVATUB2	321	GDVVPKDVNAAVATIKTKRTIQFVDWCPTGFKCGINYPGGVVPGGDLAKVQRAVCMISNSTSVVEVFSRIDHKFDLMYA
HVATUB3	321	.....S.....
HVATUB4	159	.....T.....
HVATUB1	321	.....V.....S.....N.A.A.....
HVATUB5	64	.....S..HS.....V.....T.....R.....N.A.A.....R.....
HVATUB2	401	KRAVHWHYVGEEMEEGEFSEAREDLAALAEKDYEEVGAEFDDGEDGDEGDEY
HVATUB3	401	.....E.....
HVATUB4	239	.....GG.D...E.D.D.
HVATUB1	401	.....GA.D...D.
HVATUB5	144	.....GE.--D..V...

**Abb. 25: Sequenzvergleich der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen aus Gerste auf Basis der abgeleiteten Aminosäuren.**

Nur von der Referenzsequenz abweichende Aminosäuren sind angegeben, fehlende Positionen bzw. durch das alignment bedingte Lücken sowie die noch nicht bekannten aminoterminalen Sequenzbereiche sind durch Striche dargestellt.

Bei einem auf den bisher bekannten Sequenzbereich beschränkten alignment der fünf  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen liegt die geringste Übereinstimmung, bezogen auf die abgeleitete Aminosäuresequenz, bei 88 % (siehe Tab. 9). HVATUB2 und HVATUB3 hatten die höchste Homologie zueinander, die größte Abweichung von allen anderen  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen der Gerste wies HVATUB5 auf.

	HVATUB1	HVATUB2	HVATUB3	HVATUB4	HVATUB5
HVATUB1		80 (80)	81 (83)	(81)	(80)
HVATUB2	92 (94)		94 (93)	(85)	(79)
HVATUB3	93 (94)	99 (99)		(88)	(81)
HVATUB4	(94)	(96)	(95)		(84)
HVATUB5	(92)	(88)	(89)	(89)	

**Tab. 9: Homologiewerte [%] der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen der Gerste.**

Oberhalb der Diagonalen: Vergleich der kodierende Bereiche von HVATUB1 bis HVATUB5. Unterhalb der Diagonalen: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Die Homologiewerte in Klammern verweisen auf Vergleiche der auf die Länge des unvollständigen Klon HVATUB5 abgeglichenen Sequenzen. Die schraffierten Zellen verweisen auf die Vergleiche zwischen HVATUB2, HVATUB3 und HVATUB4.

Ein Sequenzvergleich des C-terminalen Bereichs auf Aminosäureebene der Isotypen mit HVATUB2 als Referenz zeigte bei allen Isotypen eine vollständige Homologie zwischen der Position 394 und 438 (siehe Abb. 26). Ab Position 439 beginnt der hypervariable C-Terminus, dessen Sequenz sich zwischen den Isotypen deutlich unterschied. In diesem Bereich zeigten die Isotypen HVATUB2 und HVATUB3 mit nur einem Aminosäureaustausch die größte Gemeinsamkeit. Dagegen wich HVATUB4 von diesen mit sechs veränderten Positionen innerhalb einer Sequenzfolge von 13 Aminosäuren beträchtlich ab. Die Isotypen HVATUB1 und HVATUB5 wiesen außerdem im hypervariablen C-Terminus eine bzw. zwei Aminosäuren weniger auf. Alle  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen der Gerste besitzen an Position 447 Glutaminsäure, an Position 449 Asparaginsäure und ein terminales Tyrosin.

	394↓	439↓
HVATUB2	VEVFSRIDHKFDLAMYAKRAVFVHWYVGEEMEEGEFSEAREDLAALDKDYEEVGAEFDDGEDGDEGDEY	
HVATUB3	.....	.....E.....
HVATUB4	.....	.....GG.D...E.D.D.
HVATUB1	A.....	.....GA.D.-.....D.
HVATUB5	A.....R.....	.....GE.--.D..V...

**Abb. 26: Vergleich des C-terminalen Bereichs.**

Die Aminosäuresequenzen von HVATUB1 bis HVATUB5 wurden gegenübergestellt, dargestellt sind die letzten 67 Aminosäuren (bezogen auf HVATUB2). Der Sequenzbereich zwischen den Pfeilen ist vollständig homolog, bei Position 439 beginnt der Bereich des hypervariablen C-Terminus. Fehlende AS-Positionen sind durch Striche dargestellt.

Bei einem Vergleich der kodierenden Sequenzbereiche der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen von Gerste mit anderen Pflanzenspezies war die Homologie zu Isotypen monokotyler Pflanzen jeweils am höchsten (siehe Tab. 10). Außerdem ist die Homologie zu den nächstverwandten  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen anderer Spezies (soweit bekannt) oft höher, als das bei einem Vergleich der Isotypen untereinander innerhalb der Spezies *H. vulgare* der Fall ist (siehe Tab. 10). Diese Tendenz war auch beim Vergleich der abgeleiteten AS-Sequenzen festzustellen.

verglichene Sequenzen	Homologie DNA [%]	Homologie Protein [%]
HVATUB1 / ASATUBULP ( <i>A. sativa</i> )	93	97
HVATUB2 / TAU76558 ( <i>T. aestivum</i> )	95	100
HVATUB3 / TAU76558 ( <i>T. aestivum</i> )	94	99
HVATUB4 / AF008120 ( <i>E. indica</i> )	(89)	(95)
HVATUB5 / ZMALTUB3 ( <i>Z. mays</i> )	(85)	(85)

**Tab. 10: Vergleich der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen der Gerste mit den jeweils ähnlichsten Sequenzen anderer Spezies.**

Homologiewerte [%] der kodierenden Bereiche und abgeleiteter Aminosäuresequenzen. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die bisher bekannten Sequenzbereiche. Bei HVATUB4 und HVATUB5 ist ein Vergleich wegen der fehlenden vollständigen Sequenzinformation nur beschränkt aussagefähig.

Auch die nicht kodierenden isotypspezifischen 3'-Sequenzen zeigten zwischen den Isotypen der Gerste eher weniger Gemeinsamkeit als zu den ähnlichsten anderer Spezies. HVATUB2, HVATUB3 und HVATUB4 lassen zusammen mit  $\alpha$ -Tubulin aus Weizen (TAU76558) noch ein alignment zu (siehe Abb. 27), wobei HVATUB4 am stärksten abweicht. HVATUB1 und HVATUB5 differieren für dieses alignment zu stark. Nur für HVATUB1 ist noch ein sinnvoller Vergleich möglich, allerdings nur mit einer  $\alpha$ -Tubulin-Sequenz der Spezies Reis (nicht gezeigt).

```

      1470                                     1550
      *                                     *
TAU76558 --GCCTGCCTCCTGGTGCTTTCCCAAGGCTTGCTACTGCTATCCTATGATCTGCCCGAGTGGCTTTATCTGTTATCTGTCTGTTTGAACG
HVATUB2  A-.....G.A.....A.C.....T.
HVATUB3  AA.....G.....G.....C.C.....G.....AA.C.....C
HVATUB4  --T.-----CGT.....C.ACGGA.GATC.G.C.CC.....CC.AT.....A.---.CA...TGC...CCGT

      1560                                     1620
      *                                     *
TAU76558 TTTGCTTTGTGGTGTGTTGTTTACAACCTGTTGTTGTTGAAGAACCTT---GTATCTTTGAACCTGC---TTT---GCA-----
HVATUB2  .....A.ATTG..C.G.C.....AA---.G.TATGT...TGCGGTTA
HVATUB3  .....TG...G.....G...GTG-...G.....G.C-----
HVATUB4  CC..T...G.....-A.G..GTA.G..ATCG...C.T.---.TA.---.CG..G.TG.A...ATCA..A-----T.-----

      1630                                     1650
      *                                     *
TAU76558 -----CCTTGG-----TTAATATGCATG-CTATCTGGTTATC-----T
HVATUB2  TCTATG.....CCTCTGTCTCCATTTTCCTGTT.C.....TG.TA.....
HVATUB3  -----T.....TG.CTACAC
HVATUB4  -----T.C.T-----GG..C.A.-----C.C.-----

```

**Abb. 27: Alignment der nicht kodierenden 3'-Bereiche von HVATUB2, HVATUB3 und HVATUB4.** Als Referenz ist der entsprechende Sequenzbereich aus TAU76558 von Weizen angegeben.

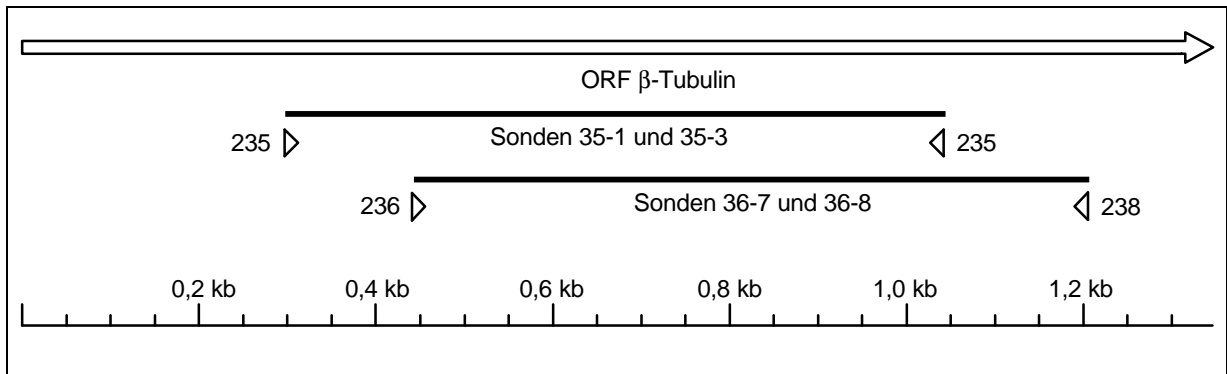
### 3.3 Isolierung von $\beta$ -Tubulin-Sequenzen aus cDNA der Gerste

Proteinbiochemische Daten deuten an, daß  $\beta$ -Tubulin-Signale im Entwicklungsgradienten in höherer Anzahl vorhanden sind und auch keine so auffälligen Unterschiede in ihrer Zusammensetzung zeigen, wie es bei  $\alpha$ -Tubulin der Fall ist. Trotzdem wurde exemplarisch untersucht, ob auch zur Isolierung von  $\beta$ -Tubulin-Sequenzen der bei  $\alpha$ -Tubulin durchgeführte Weg gangbar ist, um für spätere Untersuchungen über erste Sequenzdaten von  $\beta$ -Tubulin zu verfügen.

#### 3.3.1 Herstellung homologer $\beta$ -Tubulin DNA-Sonden über PCR

Um möglichst schnell über Sequenzinformationen im homologen System verfügen zu können, wurde auch hier der Weg über die RT-PCR eingeschlagen. Mit den von Heiko Sawitzky (MPI Ladenburg) zur Verfügung gestellten allgemeinen  $\beta$ -Tubulin-Primern konnten verschiedene homologe Sonden für  $\beta$ -Tubulin (siehe Abb. 28) hergestellt werden.

Die Primerkombination 235/237 führte zu einem 746 bp-Fragment, die Primerkombination 236/238 zu einem 761 bp-Fragment. Nach Klonierung der PCR-Produkte konnten vier Klone 35-1, 35-3, 36-7 und 36-8 isoliert und sequenziert werden. Die Klone 35-3 und 36-8 wiesen im Überlappungsbereich eine DNA-Sequenzhomologie von 100 % auf. Höchste Homologie bestand mit 97 % zu einem  $\beta$ -Tubulin aus *Triticum aestivum* (TAU76745). Zu diesen waren die Klone 35-1 und 36-7 nur noch zu 88 % bzw. 83 % homolog. Klon 35-1 hatte die höchste Homologie mit 95 % zu einem anderen  $\beta$ -Tubulin-Isotyp aus *Triticum aestivum* (TAU76896). Klon 36-7 hatte die höchste Homologie mit 91 % zu einem dritten  $\beta$ -Tubulin-Isotyp aus *Triticum aestivum* (TAU76895). Die Sequenzen entsprachen in ihren Überlappungsbereichen bis auf Klon 36-7 den später gefundenen cDNA-Bibliothek-Klonen (siehe Kapitel 3.3.3). Es standen nun drei verschiedene homologe DNA-Sonden für  $\beta$ -Tubulin zum Screening von cDNA-Bibliotheken zur Verfügung.



**Abb. 28:** Lage der homologen  $\beta$ -Tubulin-Sonden und Primer (Pfeilspitzen) zum kodierenden Bereich (ORF) bisher bekannter  $\beta$ -Tubulin-Sequenzen höherer Pflanzen.

### 3.3.2 cDNA-Bibliothek Screening mit $\beta$ -Tubulin-Gensonden

Jeweils  $1 \times 10^4$  pfu der cDNA-Bibliothek „Blatt-gesamt“ wurden zunächst mit den DNA-Sonden 35-1 und 35-3 nach  $\beta$ -Tubulin durchgemustert. Bisher konnten drei neue Isotypen von  $\beta$ -Tubulin beschrieben werden: Klon HV35-3\_P1S1, bezeichnet als HVBTUB1 hatte die höchste Homologie (97 %, kodierender Bereich) zu einem  $\beta$ -Tubulin aus *Triticum aestivum* (TAU76745). Klon 35-1\_P1S1 trug im 5'-Bereich nicht die vollständige Sequenzinformation, wurde bezeichnet als HVBTUB2 und hatte die höchste Homologie (96 %, kodierender Bereich) zu einem anderen  $\beta$ -Tubulin aus *Triticum aestivum* (TAU76896). Die ausführlichen Sequenzdaten sind im Kapitel 3.3.3 dargestellt. Die  $\beta$ -Tubulin-Sonde 36-7 wurde bisher noch nicht zum Screening eingesetzt und erhielt die Bezeichnung HVBTUB3.

### 3.3.3 Die cDNA-Sequenzen von *Hordeum vulgare* $\beta$ -Tubulin

Den ausführlichen Sequenzdaten der einzelnen cDNAs ist ein Überblick über die Sequenzierungsstrategie vorangestellt. In den cDNA-Sequenzen sind die Positionen der Schnittstellen der wichtigsten Restriktionsenzyme eingetragen. Die durch die einzelnen Sequenzierungen abgedeckten Bereiche sind mit Pfeilen bezeichnet. Die benötigten sequenzspezifischen Oligonukleotide (zur genauen Sequenz siehe Kapitel 2.4 bzw. Anhang) sind mit den Synthesenamen (in Klammern) bezeichnet.

### 3.3.3.1 Die *Hordeum vulgare* $\beta$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVBTUB1

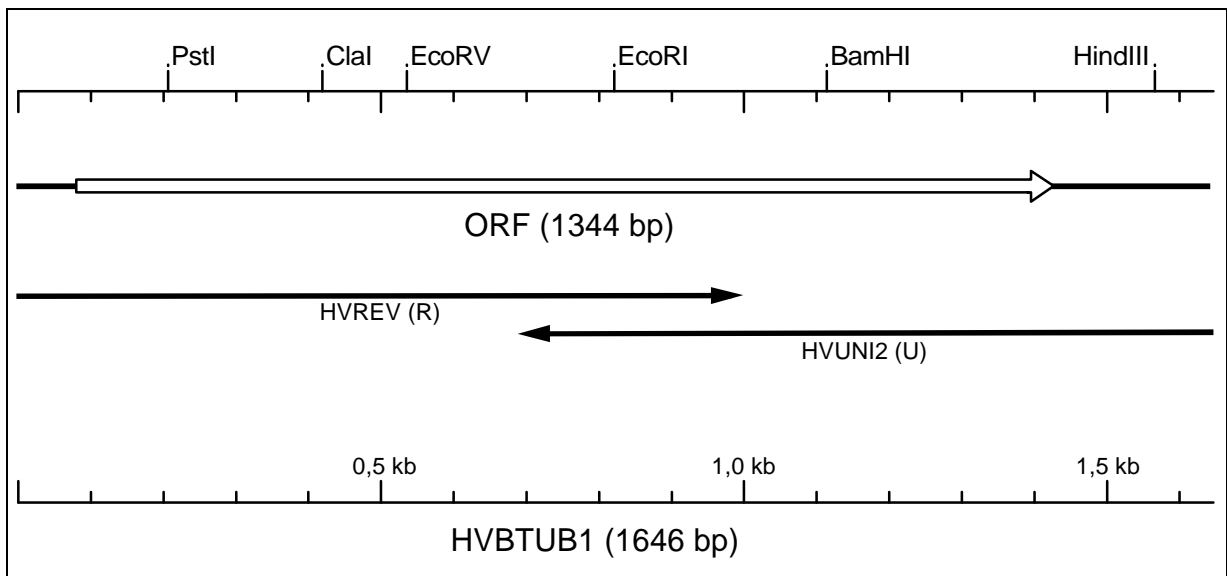


Abb. 29: Sequenzierungsstrategie von HVBTUB1.

Die cDNA-Sequenz von HVBTUB1

Der *Hordeum vulgare*  $\beta$ -Tubulin-Klon HVBTUB1 umfaßte 1646 bp (siehe Abb. 29 und 30), auf den kodierenden Bereich entfielen 1344 bp, auf den nicht kodierenden 5'-Bereich 83 bp und auf den nicht kodierenden 3'-Bereich ohne poly(A)-Ende 194 bp. Die abgeleitete Aminosäuresequenz setzte sich aus 447 AS zusammen, hatte ein berechnetes Molekulargewicht von 50,2 kD und einen Isoelektrischem Punkt 4,64.

```

1  ACCACACCCC CTCCTACTCC CCCCGCTCTC CCTCTCGCCG CCGACTGTTC TCGTTGCGCG
61  AACCATCTCA TACCTCGGCG AAGATGAGGG AGATCCTGCA CATCCAGGGT GGGCAATGTG
      M R E I L H I Q G G Q C
121  GCAACCAGAT CGGTGCCAAG TTCTGGGAGG TGGTGTGTGA TGAGCATGGC ATTGACCCAA
      G N Q I G A K F W E V V C D E H G I D P
181  CTGGGCGCTA CACCGGTACC TCTGACCTGC AGTTGGAGCG TGTCAATGTC TACTACAATG
      T G R Y T G T S D L Q L E R V N V Y Y N
241  AGGCCTCCTG TGGTCGCTTT GTGCCCCGTG CAGTTCTTAT GGACCTTGAG CCGGGTACCA
      E A S C G R F V P R A V L M D L E P G T
301  TGGACAGTGT CCGCACTGGG CCTTATGGGC AGATCTTCCG CCCTGACAAC TTTGTCTTTG
      M D S V R T G P Y G Q I F R P D N F V F
361  GGCAATCTGG TGCTGGTAAC AACTGGGCCA AGGGCCACTA CACCGAGGGT GCTGAGCTTA
      G Q S G A G N N W A K G H Y T E G A E L
421  TCGATTCTGT TTTGGATGTT GTGAGGAAGG AGGCTGAGAA CTGTGACTGT CTGCAAGGAT
      I D S V L D V V R K E A E N C D C L Q G

```

481 TCCAAGTATG CCACTCCCTT GGTGGTGGTA CTGGATCTGG CATGGGTACC CTGTTGATAT  
 F Q V C H S L G G G T G S G M G T L L I

541 CTAAAAATCAG GGAGGAGTAC CCTGACCGCA TGATGCTGAC GTTCTCAGTG TTCCCCTCAC  
 S K I R E E Y P D R M M L T F S V F P S

601 CAAAAGTATC TGACACTGTG GTTGAGCCAT ACAATGCAAC TCTCTCAGTC CATCAGTTGG  
 P K V S D T V V E P Y N A T L S V H Q L

661 TTGAGAATGC TGATGAGTGC ATGGTTCTTG ACAACGAGGC TCTCTATGAC ATCTGTTTCA  
 V E N A D E C M V L D N E A L Y D I C F

721 GGACTCTTAA GCTGACCACA CCTAGCTTTG GGGACTTGAA CCATCTAATC TCTGCTACCA  
 R T L K L T T P S F G D L N H L I S A T

781 TGAGTGGAGT CACATGCTGC CTGAGGTTCC CTGGTCAGCT GAATTCGGAC CTCCGGAAGC  
 M S G V T C C L R F P G Q L N S D L R K

841 TGGCAGTGAA CCTTATCCCC TTCCCCTCGCC TCCACTTCTT CATGGTGGGC TTTGCTCCAT  
 L A V N L I P F P R L H F F M V G F A P

901 TGACATCCCG TGGGTCTCAG CAGTACCGTG CCCTCACGGT CCCAGAACTC ACCCAGCAA  
 L T S R G S Q Q Y R A L T V P E L T Q Q

961 TGTGGGATGC CAAGAACATG ATGTGCGCCG CCGATCCTCG CCATGGCCGT TACCTCACCG  
 M W D A K N M M C A A D P R H G R Y L T

1021 CCTCTGCCAT GTTCCGTGGT AAGATGAGCA CAAAGGAGGT TGATGAGCAG ATGATCAACG  
 A S A M F R G K M S T K E V D E Q M I N

1081 TCCAGAACAA GAACTCGTCC TACTTCGTGG AGTGGATCCC CAACAACGTG AAGTCCAGCG  
 V Q N K N S S Y F V E W I P N N V K S S

1141 TCTGTGACAT CCCGCCGACA GGGCTCTCGA TGGCGTCCAC CTTCTGTCGGC AACTCGACCT  
 V C D I P P T G L S M A S T F V G N S T

1201 CCATCCAGGA GATGTTCCGG AGGGTGAGCG AGCAGTTCAC TGCCATGTTT AGGAGGAAGG  
 S I Q E M F R R V S E Q F T A M F R R K

1261 CTTTCTTGCA TTGGTACACT GGCGAAGGCA TGGACGAGAT GGAGTTCACC GAGGCCGAGA  
 A F L H W Y T G E G M D E M E F T E A E

1321 GCAACATGAA CGACCTCGTC TCAGAGTACC AGCAGTACCA GGATGCCACT GCCGACGAGG  
 S N M N D L V S E Y Q Q Y Q D A T A D E

1381 AGGGCGAGTA CGAGGATGAG GATCAGGAGG CCGAGGACGA CATGTAAGGA GGGGGAGGTC  
 E G E Y E D E D Q E A E D D M STOPP

1441 TGTGTGGTGC TTTGCTGGGT GGGGGTTCTA GGGGCAGAGT TTGATCTGTT TGGTGCTTTG  
 1501 TTATGAATCT GTTTATCATC GCAACTACCG CTTGTACGCC ACCGCCATTC TTCCTGCCTT  
 1561 TCCTAAGCTT TGTATTTTCC ATGTTATGGC ACCTTCTGGG TATTGTATCA CTTGATGCCG  
 1621 TAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA

**Abb. 30: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz von HVBUB1.**

Die Lage der 35-3-Sonde ist unterstrichen dargestellt. Mögliche **Polyadenylierungssignale** sind fett hervorgehoben und **TG-reiche** Regionen im 3'-Ende sind schattiert.

### 3.3.3.2 Die *Hordeum vulgare* $\beta$ -Tubulin cDNA-Sequenz HVBTUB2

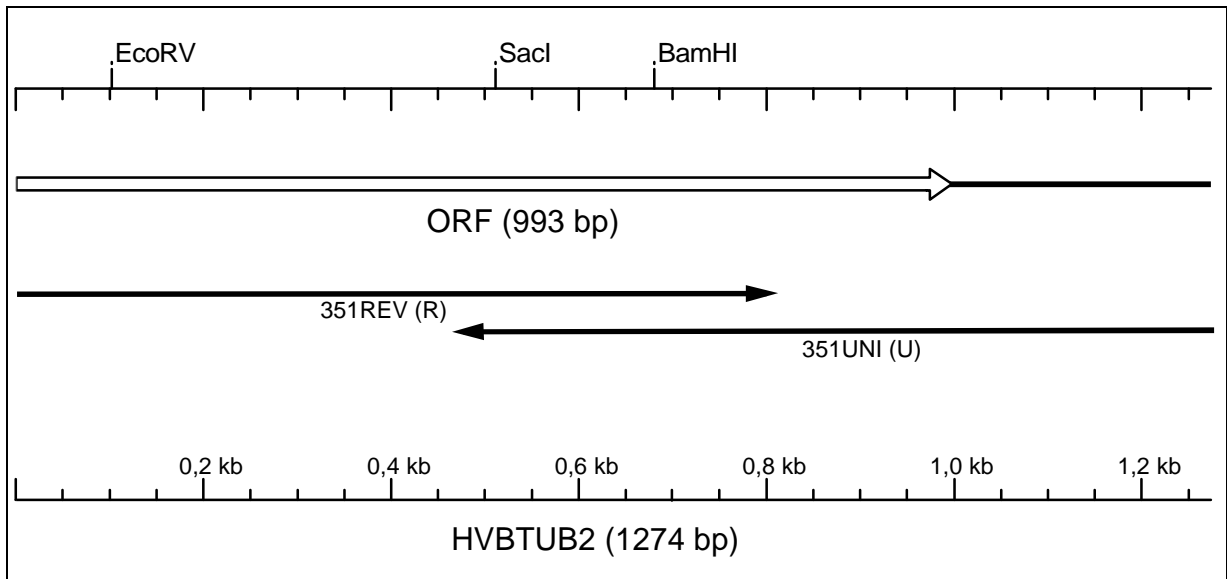


Abb. 31: Sequenzierungsstrategie von HVBTUB2.

Die cDNA-Sequenz von HVBTUB2

Der im 5'-Bereich unvollständige *Hordeum vulgare*  $\beta$ -Tubulin cDNA-Klon HVBTUB2 umfaßte 1274 bp (siehe Abb. 31 und 32), auf den kodierenden Bereich entfielen 994 und auf den nicht kodierenden 3'-Bereich ohne poly(A)-Ende 262 bp. Aus der Sequenz konnten 330 C-terminale Aminosäuren abgeleitet werden, aufgrund der Unvollständigkeit der Transkripts wurde auf eine Berechnung von Isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht verzichtet.

```

1  TGACGTTGTC AGGAAGGAGG CTGAGAACTG TGACTGCCTT CAAGGTTTCC AAGTATGCCA
   D V V R K E A E N C D C L Q G F Q V C
61  CTCTCTTGGT GGTGGTACTG GATCAGGCAT GGGGACACTT TTGATATCAA AGATCAGGGA
   H S L G G G T G S G M G T L L I S K I R
121 GGAGTACCCA GACCGCATGA TGTAAACATT CTCTGTTTTT CCTTCACCGA AAGTATCTGA
   E E Y P D R M M L T F S V F P S P K V S
181 TACTGTGGTT GAGCCTTACA ATGCCACTCT TTCGGTCCAT CAGTTGGTTG AGAATGCAGA
   D T V V E P Y N A T L S V H Q L V E N A
241 TGAGTGCATG GTTCTTGACA ACGAGGCCCT TTATGACATC TGTTTCAGGA CTCTTAAGCT
   D E C M V L D N E A L Y D I C F R T L K
301 GACCACTCCC AGCTTTGGAG ATTTGAACCA TTTGATCTCT GCCACCATGA GTGGAGTGAC
   L T T P S F G D L N H L I S A T M S G V
361 CTGCTGCCTG AGGTTCCCTG GCCAGCTGAA CTCCGACCTC CGGAAGCTGG CAGTGAACCT
   T C C L R F P G Q L N S D L R K L A V N
421 GATCCCCTTC CCACGTCTCC ACTTCTTCAT GGTGGGGTTC GCGCCCCTGA CCTCCC GCGG
   L I P F P R L H F F M V G F A P L T S R

```

```

481  CTCCCAGATG TACCGCTCCC TCACCGTCCC GGAGCTCACC CAACAAATGT GGGACTCCAA
    G S Q M Y R S L T V P E L T Q Q M W D S
541  GAACATGATG TGCGCCGCGG ACCCCCGCCA CGGCCGCTAC CTCACTGCCT CGGCCATGTT
    K N M M C A A D P R H G R Y L T A S A M
601  CCGTGGCAAG ATGAGCACCA AGGAGGTGGA CGAGCAGATG ATCAACGTGC AGAACAAGAA
    F R G K M S T K E V D E Q M I N V Q N K
661  CTCATCCTAC TTCGTGGAGT GGATCCCCAA CAACGTCAAG TCGAGCGTGT GCGACATCGC
    N S S Y F V E W I P N N V K S S V C D I
721  GCCGAGGGGC CTGTCCATGG CGTCCACCTT CATCGGCAAC TCCACGTCCA TCCAGGAGAT
    A P R G L S M A S T F I G N S T S I Q E
781  GTTCCGGCGT GTGAGCGAGC AGTTCACGGC CATGTTCCGG CGCAAGGCCT TCCTTCACTG
    M F R R V S E Q F T A M F R R K A F L H
841  GTACACGGGC GAGGGCATGG ACGAGATGGA GTTCACCGAG GCCGAGAGCA ACATGAACGA
    W Y T G E G M D E M E F T E A E S N M N
901  CCTCGTCGCC GAGTACCAGC AGTACCAGGA CGCCACCGCC GACGAGGAGG AGGAACTGTA
    D L V A E Y Q Q Y Q D A T A D E E E E L
961  CGAGGACGAG GACGACCCG ACCTTCAGGA GTAGGGAGGG GCGAGGTCTG TTCTTGGTCG
    Y E D E D D A D L Q E STOPP

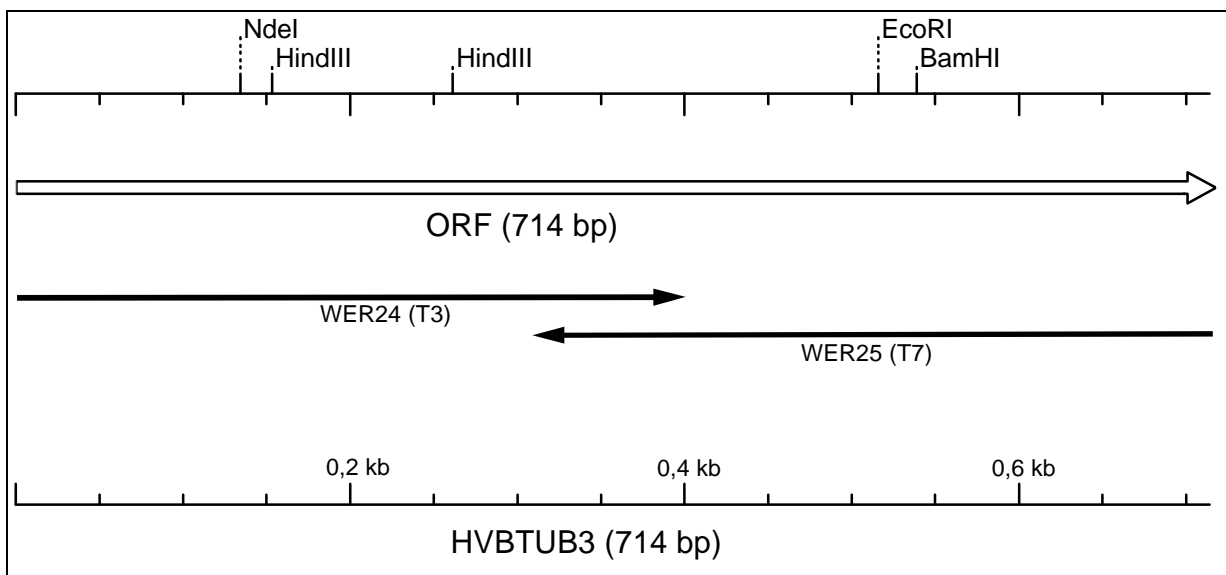
1021 TCGTGCTCAG GGTCAGGGGG CTATTTCTGA TGGCTCCCTG TCGCTGCTAG TAGTTTGTAT
1081 GTTGCGGTTT GGGTGTGACG GGGCTGCCCC CATCTTCGGG GAGTCGTGGA CTTGTTGCTT
1141 GTGTAGTTG CATTGTCAG AGTTAATTTG GTAGTCAGTT TGTGGCGGT GAACTTGAAT
1201 ATCTAGCAGG TTGTAATGT GGCTCGTTCT GAATCCCAAG GAATGTTTGC TGTTTGAAAA
1261 AAAAAAAAAA AAAA

```

**Abb. 32: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz von HVBTUB2.**

Die Lage der 35-1-Sonde ist unterstrichen, mögliche **Polyadenylierungssignale** sind fett hervorgehoben und **TG-reiche** Regionen im 3'-Ende sind schattiert.

### 3.3.3.3 Die *Hordeum vulgare* b-Tubulin cDNA-Sequenz HVBTUB3



**Abb. 33: Sequenzierungsstrategie von HVBTUB3.**

### Die cDNA-Sequenz von HVBTUB3

Der aus der PCR-Reaktion mit der Primerkombination 236/238 stammende unvollständige *Hordeum vulgare*  $\beta$ -Tubulin cDNA-Klon HVBTUB3 umfaßte 714 bp (siehe Abb. 33 und 34). Aus der unvollständigen Sequenz konnten 238 Aminosäuren abgeleitet werden. Wegen der Unvollständigkeit des PCR-Klons wurde auf eine Berechnung von Isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht verzichtet.

```

1  CTGACCTTCT CTGTCTTCCC ATCACCAAAG GTCTCAGACA CCGTGGTTGA GCCATACAAT
   L T F S V F P S P K V S D T V V E P Y N

61  GCTACGCTTT CCGTTCACCA ACTCGTTGAG AACGCTGATG AGTGTATGGT GCTTGACAAT
   A T L S V H Q L V E N A D E C M V L D N

121 GAAGCTCTGT ACGACATATG CTTCCGCACA CTAAAGCTTG CCACCCCTTC GTTTGGTGAC
   E A L Y D I C F R T L K L A T P S F G D

181 CTGAACCATC TTATCTCTGC TACCATGAGT GGTGTCACAT GCTGTCTGAG GTTCCCTGGA
   L N H L I S A T M S G V T C C L R F P G

241 CAACTCAACT CTGATCTTCG CAAGCTTGCT GTGAATCTCA TCCCGTTCCC CCGCCTCCAC
   Q L N S D L R K L A V N L I P F P R L H

301 TTCTTCATGG TCGGCTTTGC CCCGCTGACG TCGCGCGGGT CACAAATGTA CCGTGTCTCTC
   F F M V G F A P L T S R G S Q M Y R A L

361 ACTGTCCCTG AGCTGACCCA GCAAATGTGG GATGCCAAGA ACATGATGTG CGCCGCCGGA
   T V P E L T Q Q M W D A K N M M C A A G

421 CCCAGGCATG GCCGCTACCT CACTGCCTCG GCCATGTTCC GTGGGAAGAT GAGTACCAAG
   P R H G R Y L T A S A M F R G K M S T K

481 GAAGTGGATG AGCAGATGCT GAACGTCCAG AACAAGAATT CATCCTACTT CGTGGAGTGG
   E V D E Q M L N V Q N K N S S Y F V E W

541 ATCCCAACA ATGTCAAGTC AAGCGTGTGT GACATCCCGC CCACGGGCCT GAAGATGTCCG
   I P N N V K S S V C D I P P T G L K M S

601 TCCACGTTTC TCGGCAACTC CACGTTCGATC CAGGAGATGT TCCGCCGCGT GAGCGAGCAG
   S T F V G N S T S I Q E M F R R V S E Q

661 TTCACCGCCA TGTTCAGGAG GAAGGCCTTC TTGCACTGGT ACACAGGCGA GGGC
   F T A M F R R K A F L H W Y T G E G

```

**Abb. 34: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz von HVBTUB3 ohne Primersequenzen.**

### 3.3.4 Die Basenverteilung der cDNA-Sequenzen HVBTUB1 bis HVBTUB3

Der Gehalt der Purinbasen (A/T) in den  $\beta$ -Tubulin-Sequenzen war den Werten der  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen ähnlich: Bei HVBTUB1 wurden im kodierenden Bereich 45,3 % bestimmt, sowie 34,9 % und 51 % im nicht kodierenden 5'- bzw. 3'-Bereich ohne Poly(A)-Sequenz. Bei HVBTUB2 lag der Gehalt an Purinbasen im nicht kodierenden 3'-Bereich bei 49,2 %.

### 3.3.5 Sequenzvergleiche der $\beta$ -Tubulin-Isotypen aus Gerste

Ein Vergleich (siehe Abb. 35) auf Basis der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigt (soweit die Sequenz bis jetzt bekannt) die größte Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen HVBTUB1 und HVBTUB2, letztere war im C-Terminus um eine AS kürzer.

HVBTUB1	1	MREILHIQGGQCGNQIGAKFWEVVCDEHGIDPTGRYTGTSDLQLERVNYYNEASCGRFVPRAVLMDLEPGTMDSVRTGP
HVBTUB2	1	-----
HVBTUB3	1	-----
HVBTUB1	81	YGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDSVLDVVRKEAENCDCLOQGFQVCHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYP
HVBTUB2	1	-----
HVBTUB3	1	-----
HVBTUB1	161	DRMMLTFSVFPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENADECMVLDNEALYDICFRTLKLTTPSFGLNHLISATMSGVTCCCL
HVBTUB2	44	.....
HVBTUB3	1	-----
HVBTUB1	241	RFPGQLNSDLRKLAVNLIPFRLHFFMVGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMWDANKMMCAADPRHGRYLTASAMFRGK
HVBTUB2	124	.....M..S.....S.....
HVBTUB3	77	.....M.....G.....
HVBTUB1	321	MSTKEVDEQMINVQNKNSSYFVEWIPNNVKSSVCDIPPTGLSMASSTFVGNSTSIQEMFRRVSEQFTAMFRKAFLHWYTG
HVBTUB2	204	.....A.R.....I.....
HVBTUB3	157	.....L.....K.S.....
HVBTUB1	401	EGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATADEEAGE-YEDEDQEAEDDM
HVBTUB2	284	.....A.....E.L.....-D.DLQE
HVBTUB3	237	-----

**Abb. 35: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen HVBTUB1, HVBTUB2 und HVBTUB3.**

Nur von der Referenzsequenz abweichende Aminosäuren sind angegeben, fehlende Aminosäuren bzw. durch das alignment bedingte Lücken sowie die noch nicht bekannten Sequenzbereiche sind gestrichelt dargestellt.

Bei einem alignment, das sich auf den bisher bekannten Sequenzbereich beschränkt, ließen sich nur bezüglich der kodierenden Bereiche auf Nukleinsäure-Ebene (soweit bekannt) größere Unterschiede differenzieren: Die Sequenzen von HVBTUB1 und HVBTUB2 zeigten hierbei die größte Übereinstimmung (siehe Tab. 11). Ein alignment der nicht kodierenden 3'-Regionen ist hier nicht sinnvoll, da die Sequenzen zu wenig Übereinstimmung zeigen.

	HVBTUB1	HVBTUB2	HVBTUB3
HVBTUB1		88	83
HVBTUB2	96		84
HVBTUB3	96	97	

**Tab. 11: Homologiewerte der  $\beta$ -Tubulin-Sequenzen aus Gerste.**

Verglichen wurden die kodierende Bereiche (oberhalb der Diagonalen) von HVBTUB1, HVBTUB2 und HVBTUB3 und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen (unterhalb der Diagonalen). Die Gegenüberstellung wurde abgeglichen auf die kürzeste Sequenz (HVBTUB3).

### 3.4 Isolierung einer $\gamma$ -Tubulin cDNA-Sequenz aus Gerste

$\gamma$ -Tubulin spielt als Initiator der räumlich definierten Nukleation der Mikrotubuli möglicherweise auch im Entwicklungsgradienten des Gerstenblattes eine wichtige Rolle bei der Organisation der kortikalen Mikrotubuli. Daher war neben den Untersuchungen zum  $\alpha$ -Tubulin auch die Aufklärung der cDNA-Sequenz des  $\gamma$ -Tubulin bei der Gerste ein Schwerpunkt in der vorliegenden Arbeit.

#### 3.4.1 Herstellung homologer $\gamma$ -Tubulin DNA-Sonden über PCR

Um möglichst schnell über Sequenzinformationen im homologen System verfügen zu können, wurden über RT-PCR zunächst Teilsequenzen von  $\gamma$ -Tubulin aus Gerste amplifiziert, die nach Klonierung und Sequenzierung als homologe DNA-Sonden dienten.

Aus einem konservierten Sequenzbereich des  $\gamma$ -Tubulin von monokotylen Pflanzen wurden Primersequenzen mit geringem Degenerationsgrad abgeleitet, die zugleich wenig Homologie mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin aufwiesen. Mit der Kombination GU1/GD3 konnte ein 656 bp großes Fragment (G3A), mit der Kombination GU2/GD3 ein 621 bp großes Fragment (G6S) amplifiziert werden (siehe Abb. 36). Beide Klone waren im Überlappungsbereich vollständig sequenzhomolog und hatten die größte Ähnlichkeit (89 %) mit  $\gamma$ -Tubulin aus *Oryza sativa* (AF036957). Die Sequenzen entsprachen in ihren Überlappungsbereichen der später isolierten cDNA-Sequenz und sind im Kapitel 3.4.6 dargestellt.

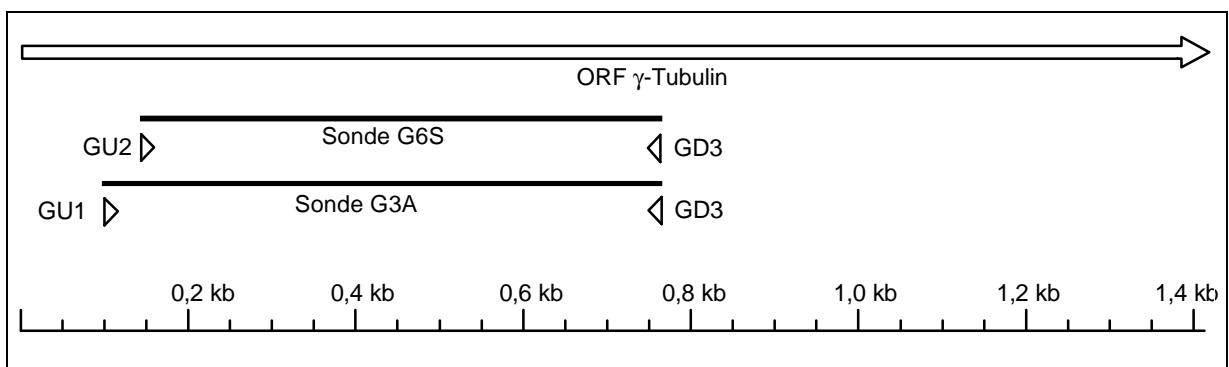


Abb. 36: Lage der homologen  $\gamma$ -Tubulin-Sonden und Primer (Pfeilspitzen) zum kodierenden Bereich (ORF) bisher bekannter  $\gamma$ -Tubulin-Sequenzen höherer Pflanzen.

### 3.4.2 cDNA-Bibliothek Screening mit $\gamma$ -Tubulin-Gensonden

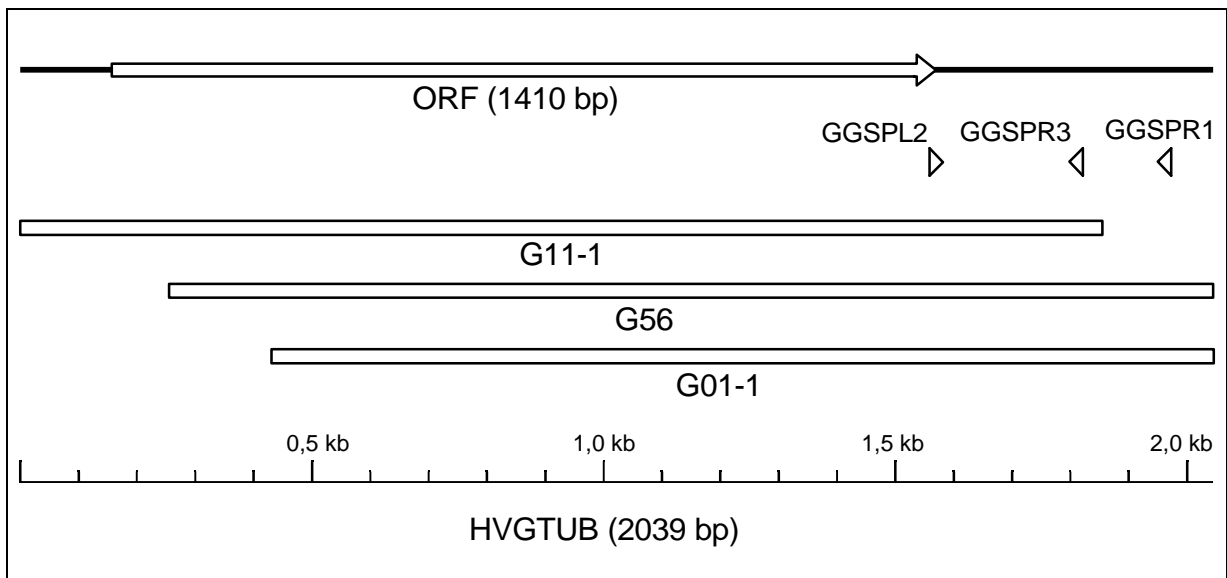
In Gegensatz zum Screening nach stark abundanten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Klonen mußte beim Screening nach  $\gamma$ -Tubulin pro Petrischale ein Phagentiter von 4 bis  $6 \times 10^4$  pfu eingesetzt werden, um positive Signale zu erzielen. Eingesetzt wurden die selbst entwickelten Sonden G6S und G3A. In der cDNA-Bibliothek „Blatt gesamt“ wurden  $8,4 \times 10^5$  pfu durchmustert, in der cDNA-Bibliothek „Segment 1“  $5,5 \times 10^5$  pfu und in der cDNA-Bibliothek „Segment 2“  $1,05 \times 10^6$  pfu. Diesmal wurden zusätzlich auch sehr schwach markierte Klone im Primärscreening ausgewählt, um auch potentiell divergierende Isotypen nicht auszuschließen. Von insgesamt rund  $1,7 \times 10^6$  durchmusterten Phagenklonen verblieben nur 26 positive Klone, die der *in vivo*-Excision unterzogen wurden. Nach PCR mit M13-Primern konnten diese in drei Größen eingeteilt werden: 16 Klone mit 1600 bp Länge, ein Klon mit 1790 bp Länge und neun Klone mit 1870 bp Länge (siehe Tab. 12). Jeweils ein Klon pro Gruppe wurde sequenziert (Klon G01-1, G56 und G11-1). Alle wiesen 100 %ige Sequenzhomologie im Überlappungsbereich auf und konnten gemeinsam als ein neues  $\gamma$ -Tubulin charakterisiert werden, HVGTUB aus Gerste. Die ausführliche Beschreibung der Sequenz erfolgt in Kapitel 3.4.6. Die höchste Homologie (90 %, kodierender Bereich) bestand zu einem  $\gamma$ -Tubulin aus *Oryza sativa* (AF036957). Der Klon G11-1 wies einen vollständigen kodierenden Bereich auf, die Klone G56 und G01-1 waren in unterschiedlichem Maße im 5'-Bereich unvollständig. Der nicht kodierende 3'-Bereich dieser Klone war jedoch länger als der von G11-1 (siehe Abb. 37).

Länge der Klone [bp]	cDNA-Bibliothek „Segment 1“	cDNA-Bibliothek „Segment 2“	cDNA-Bibliothek „Blatt-gesamt“
1600 (G01-1)	11	4	1
1790 (G56)	1	/	/
1870 (G11-1)	9	/	/

**Tab. 12: Anzahl der  $\gamma$ -Tubulin-Sequenzen unterschiedlicher Länge in den cDNA-Bibliotheken.**

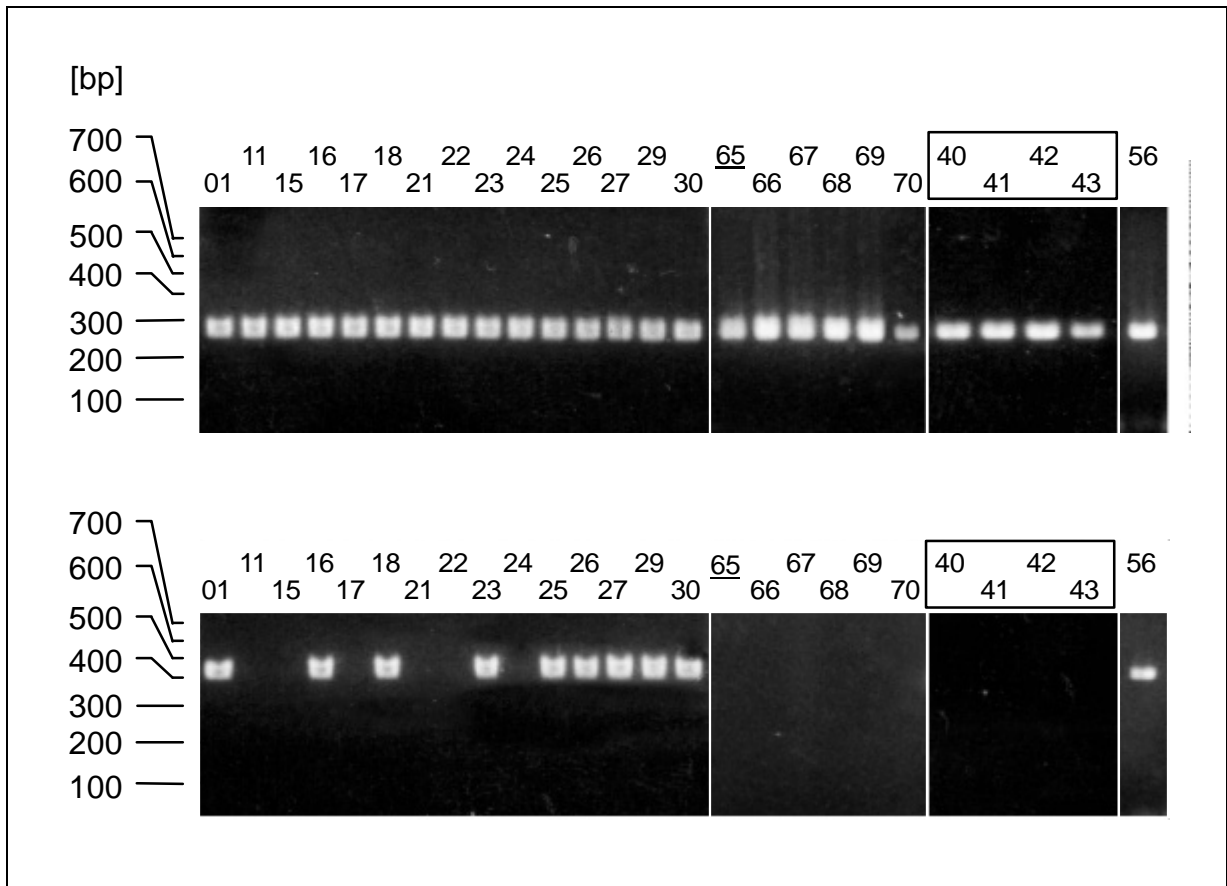
### 3.4.3 Charakterisierung weiterer $\gamma$ -Tubulin cDNA-Klone durch PCR

Aus den nicht kodierenden 3'-Bereichen wurden Primersequenzen abgeleitet, um die übrigen Klone hinsichtlich möglicher Isotypvarianz über Sequenzunterschiede im nicht kodierenden 3'-Bereich zu charakterisieren. So sollten potentielle neue Isotypen auch bei  $\gamma$ -Tubulin über PCR nachzuweisen sein. Ein „neuer“ Isotyp sollte demnach keine PCR-Amplifikation ergeben. Ein Primerpaar (GGSP2/GGSP3) war sowohl spezifisch für die Variante mit kurzem 3'-Bereich als auch spezifisch für die mit dem langen 3'-Bereich (=3'-spezifisch). Das andere (GGSP2/GGSP1) war spezifisch für die Variante mit langem 3'-Ende (siehe Abb. 37). Alle verbliebenen 23  $\gamma$ -Tubulin-positiven Klone wurden mit 3'-spezifischen Primern als HVGTUB klassifiziert, nur hinsichtlich der Länge des 3'-Bereiches ergaben sich Unterschiede (siehe Abb. 38, untere Reihe). Möglicherweise sind diese Unterschiede im nicht kodierenden 3'-Bereich auf multiple, variabel polyadenylierte Transkripte zurückzuführen.



**Abb. 37: Primerpositionen im nicht kodierenden 3'-Bereich zur Unterscheidung potentieller Varianten von  $\gamma$ -Tubulin aus Gerste.**

Der kodierende Sequenzbereich (ORF) ist als Pfeilform dargestellt, die Klone als gerahmten Balken und die Positionen der Primer als Pfeilspitzen.



**Abb. 38: PCR zum Nachweis potentieller neuer Varianten von g-Tubulin.**

Obere Reihe: PCR-Amplifikationen mit der Primerkombination GGSPL2/GGSPR3 (3'-spezifisch). Untere Reihe: Primerkombination GGSPL2/GGSPR1 (spezifisch für nicht kodierendes langes 3'-Ende). Bis auf den Klon 65 (cDNA-Bibliothek „Blatt-gesamt“, unterstrichen) und die Klone 40 bis 43 (cDNA-Bibliothek „Segment 2“, mit Kästchen markiert) stammen alle Klone aus der cDNA-Bibliothek „Segment 1“. Jeweils 7,5 µg einer PCR-Reaktion (25 µl) mit 2,5 ng Template wurden aufgetrennt (2 %iges Agarosegel).

### 3.4.4 Nachweis eines vollständigen g-Tubulin-Transkripts mittels RT-PCR

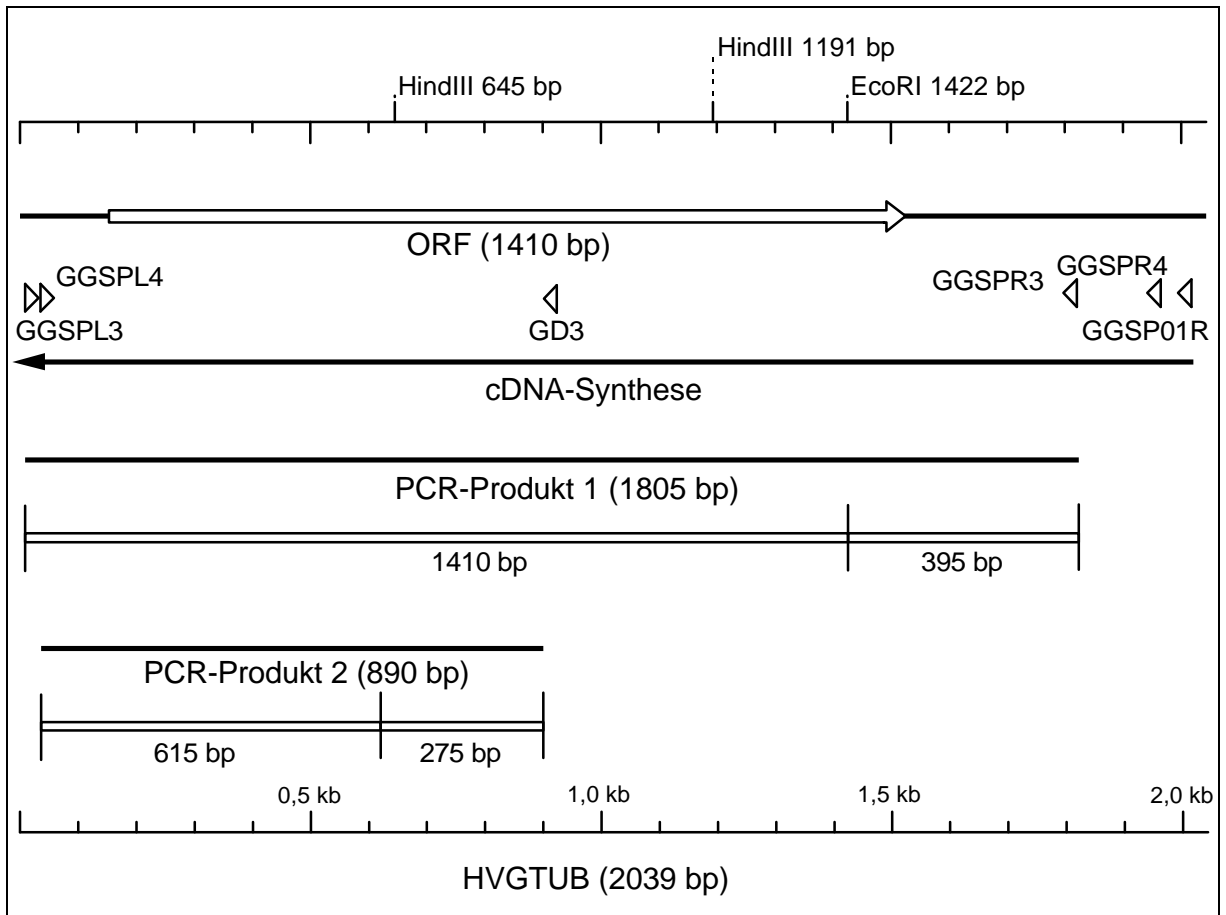
Alle Screeningrunden führten entweder zu  $\gamma$ -Tubulin cDNA-Klonen mit vollständigem kodierenden Bereich und verkürzten 3'-Enden oder zu im kodierenden Bereich unvollständigen cDNA-Klonen mit langen 3'-Enden. Die bisher gefundenen cDNA-Klone sind mit großer Wahrscheinlichkeit Kopien des gleichen Gens, da sie in den Überlappungsbereichen des offenen Leserahmens und der nicht translatierten Bereiche zu 100% übereinstimmten. Da kein Klon der Variante mit sowohl vollständigem kodierenden Bereich, als auch langem 3'-Ende in den cDNA-Bibliotheken gefunden werden konnte, sollte mittels RT-PCR getestet werden, ob ein Transkript vollständiger Länge vorhanden ist. Mit Primern, die aus Bereichen nahe des 5'- und des 3'-Endes der bekannten Klone abgeleitet wurden, sollte dies geklärt werden. Die übliche Vorgehensweise eines 5'- oder 3'-RACE

(rapid amplification of cDNA ends) erschien hier nicht notwendig, da die cDNA-Sequenzen beider Enden bekannt waren.

Zunächst wurde mit oligo(dT)-Primern revers transkribierte cDNA (aus mRNA vom Segment 1) für die PCR mit Primern nahe der beiden Enden der  $\gamma$ -Tubulin-Sequenz (GGSP3/GGSP4) eingesetzt. Dies führte zwar stets zur Amplifikation eines Fragments in der erwarteten Länge von etwa 2 kb, dessen Sequenz jedoch eine hohe Homologie zur kodierenden Sequenz für eine ATP-Synthase aus Mais aufwies.

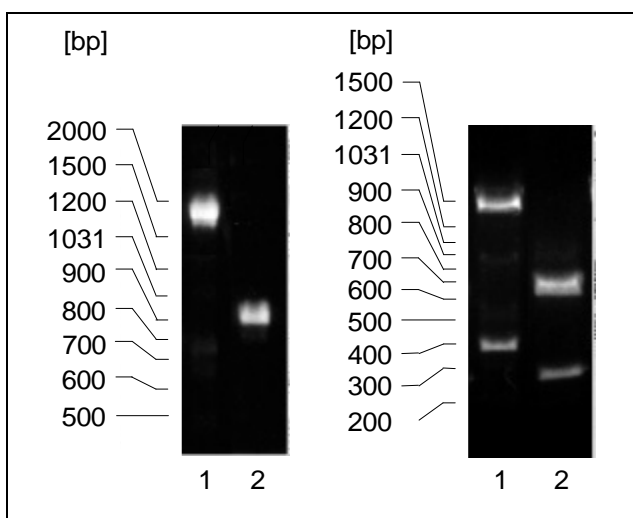
Daher wurde die Spezifität der reversen Transkription durch den Einsatz von  $\gamma$ -Tubulin-Primern (GGSP01R) anstelle von oligo(dt)-Primern erhöht (siehe Abb. 39). Die so erhaltene  $\gamma$ -Tubulin-cDNA mit langem 3'-Ende wurde dann durch PCR und anschließende Restriktion charakterisiert: Zwei unabhängige PCR-Ansätze wurden mit „nested“ Primern der Primerkombination GGSP3/GGSP3 bzw. GGSP4/GD3 durchgeführt, um so gezielt cDNA mit vollständigen 5'-Enden amplifizieren zu können. Beide Ansätze führten zu PCR-Produkten erwarteter Größe (PCR-Produkt 1, 1805 bp und PCR-Produkt 2, 890 bp, siehe Abb. 40, links). Parallel zu den PCR-Ansätzen mit cDNA wurden Kontroll-Ansätze mit  $\text{sddH}_2\text{O}$  sowie mit mRNA statt cDNA durchgeführt, um falsch-positive Amplifikationen durch klonierte bzw. genomische DNA im Reaktionsansatz auszuschließen.

Das PCR-Amplifikat 1 wurde anschließend mit *EcoR* I, das PCR-Amplifikat 2 mit *Hind* III restringiert, um über die in HVGTUB vorhandenen Restriktionserkennungssequenzen mögliche Fehlamplifikationen der vorangegangenen PCR-Reaktion auszuschließen. Das restringierte PCR-Amplifikat 1 ergab zwei Banden bei 1410 bp und 395 bp, das restringierte PCR-Amplifikat 2 zwei Banden bei 615 bp und 275 bp (siehe Abb. 39 und 40). Somit konnte die Existenz eines vollständigen Transkripts von  $\gamma$ -Tubulin über RT-PCR mit den Primern aus den 5'- und 3'-Enden belegt werden.



**Abb. 39: Charakterisierung des vollständigen Transkripts HVG TUB mittels RT-PCR und anschließender Restriktion.**

Oben sind die Positionen der Restriktionserkennungssequenzen dargestellt, der offene Leserahmen (ORF) der HVG TUB-Sequenz ist als gerahmte Pfeilform dargestellt. Der Pfeil skizziert die cDNA-Synthese, die Primerpositionen und -orientierungen sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die Restriktionsfragmente der PCR-Produkte sind durch gerahmte Balken dargestellt.



**Abb. 40: PCR- und Restriktionsansätze zum Nachweis des vollständigen  $\alpha$ -Tubulin-Transkripts.**

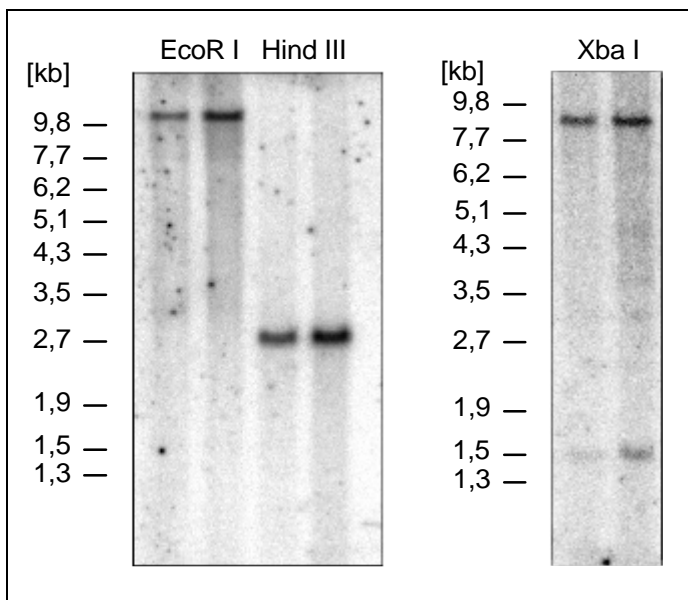
Links: 5  $\mu$ g einer PCR-Reaktion (25  $\mu$ g) mit den Primerkombinationen GGSP3/GGSPR3 (1), GGSP4/GD3 (2). Rechts: 25  $\mu$ g des Restriktionsansatzes von (1) und (2); 2 %iges Agarosegel.

### 3.4.5 Abschätzung der Anzahl der $\gamma$ -Tubulin-Gene im Genom der Gerste

Im Gegensatz zu den Verhältnissen beim  $\alpha$ -Tubulin (siehe Kapitel 3.2.4) wurden bisher keine weiteren Isotypen von  $\gamma$ -Tubulin gefunden. Southernblot-Analysen mit genomischer DNA sollten Hinweise darauf geben, ob mehr als ein einziges  $\gamma$ -Tubulin-Gen zu erwarten ist.

Genomische DNA (10 bis 50  $\mu$ g) wurde jeweils mit *EcoR* I, *Bam* HI, *Hind* III oder *Xba* I restringiert, um anhand der auftretenden Banden Aussagen über die vorliegende Anzahl von Isotypen treffen zu können. Nach Restriktion mit *EcoR* I bzw. *Hind* III, Membrantransfer und Hybridisierung mit Sonde G3AH (5'-*Hind* III Restriktionsfragment der Sonde G3A) konnte jeweils eine einzige Bande oberhalb 9,8 kb bzw. 2,7 kb detektiert werden (siehe Abb. 41). Die Restriktion mit *Bam*H I lieferte nach der Hybridisierung ebenfalls eine einzige Bande bei 3,5 kb, die aber wegen der schwachen Signalintensität nur schwer dokumentierbar war (nicht gezeigt). Nach Restriktion mit *Xba* I konnten zwei Banden (1,5 kb und unterhalb 9,8 kb) detektiert werden. Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß diese Schnittstelle auch innerhalb des Sondenbindungsereichs auftritt.

Im Genom der Gerste scheint nur ein Genort für  $\gamma$ -Tubulin zu existieren, es ist daher wenig wahrscheinlich, daß auf Transkript-Ebene noch weitere Isotypen von  $\gamma$ -Tubulin vorhanden sind. Ein weiteres Screening von cDNA-Bibliotheken erschien daher nicht sinnvoll.

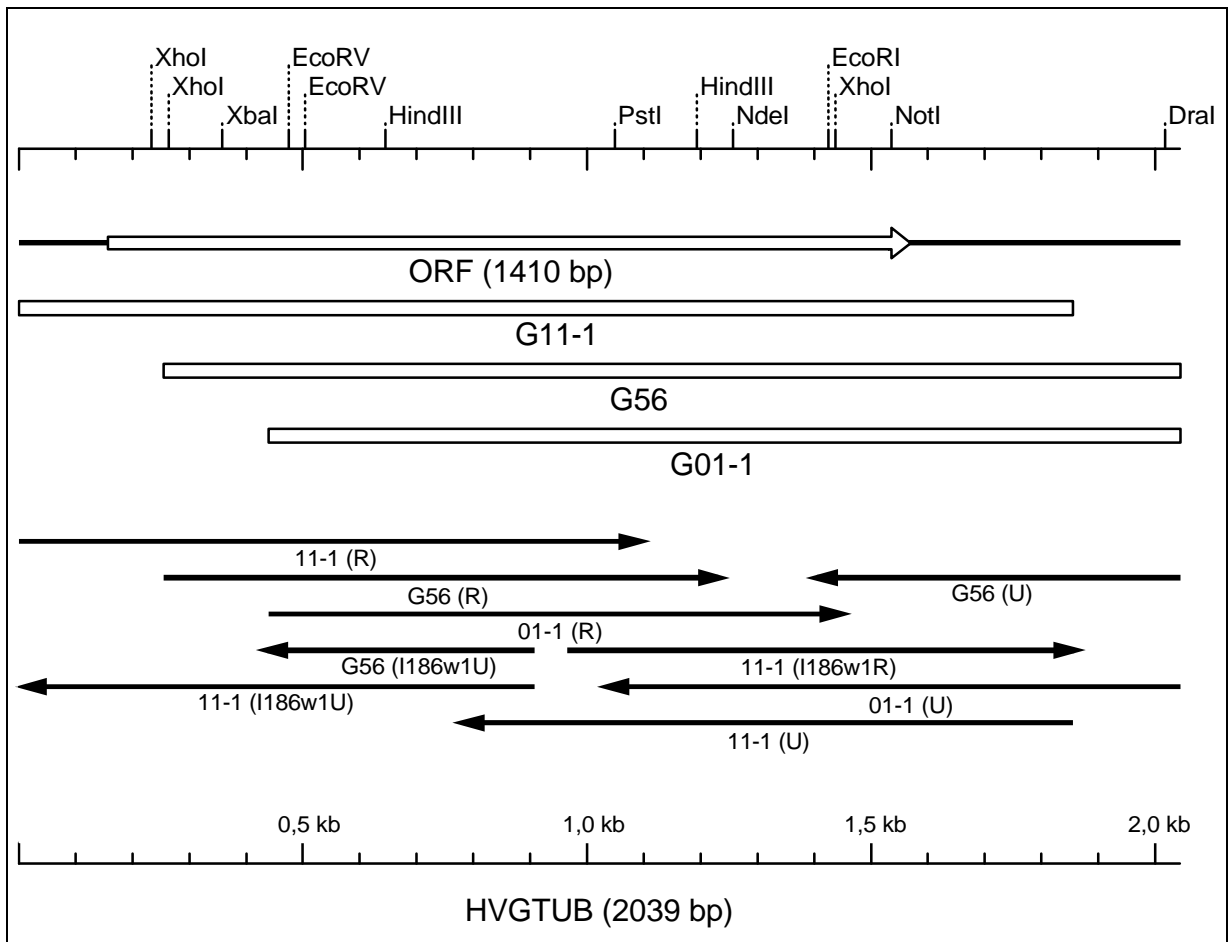


**Abb. 41: Southernblot zur Abschätzung der Anzahl von  $\gamma$ -Tubulin-Genen im Gerstengenom.**

Links: Mit *EcoR* I bzw. *Hind* III restringierte genomische DNA (25 und 50  $\mu$ g). Rechts: Mit *Xba* I restringierte genomische DNA (25 und 50  $\mu$ g). Hybridisiert wurde mit Sonde G3AH (5'-*Hind* III-Restriktionsfragment der Sonde G3A) spezifisch für den kodierenden Bereich von  $\gamma$ -Tubulin; Expositionsdauer 10 d.

### 3.4.6 Die *Hordeum vulgare* g-Tubulin cDNA-Sequenz HVGTUB

Zur Ermittlung der vollständigen cDNA-Sequenz wurden neben dem Klon G11-1 zusätzlich die im 5'- Bereich unvollständigen aber sonst zu vollständig sequenzhomologen und im 3'-Bereich längeren Klone G01-1 und G56 herangezogen (siehe Abb. 42).



**Abb. 42: Sequenzierungsstrategie von HVGTUB**

Der kodierende Bereich ist durch einen gerahmten Pfeil gekennzeichnet, die einzelnen cDNA-Klone durch gerahmte Balken dargestellt und die durch die einzelnen Sequenzierungen abgedeckten Bereiche sind mit Pfeilen bezeichnet. Die Primer (genaue Sequenzen siehe Kapitel 2.4 bzw. Anhang) sind in Klammern dargestellt.

## Die cDNA-Sequenz von HVG TUB

Auf den kodierenden Bereich entfielen 1410 bp (siehe Abb. 43), auf den nicht kodierenden 5'-Bereich entfielen 155 bp und auf den nicht kodierenden 3'-Bereich ohne poly(A)-Ende 456 bp. Der nicht kodierende 3'-Bereich des potentiell variabel polyadenylierten Transkripts war um 171 bp kürzer. Die abgeleitete Aminosäuresequenz bestand aus 469 AS, hatte ein berechnetes Molekulargewicht von 52,8 kD und einen Isoelektrischen Punkt von 5,87.

```

1   GGACGGCTCA GCACTTGCGC CCAAACAAAG CAACCCCAA ACCCTAGACA ACCGCGCCGC
61  CGGCCGAGCC CGCCGCCCCC GCCCTCCCC GTCTCCCGTA ACCCTAGCCG TGGCATCCGC
121 CGCCGCCGGA GCAGCAGCAG GAGGAGGACG ACGAGATGCC GCGCGAGATC ATCACGATAC
                                     M P R E I I T I

181 AGGTGGGGCA ATGCGGGAAC CAGATCGGGA TGGAGTTCTG GAAGCAGCTC TGCCTCGAGC
    Q V G Q C G N Q I G M E F W K Q L C L E

241 ACGGCATCGG CAAGGACGGC CTCCTCGAGG ACTTCGCTAC GCAGGGAGGA GACAGGAAGG
    H G I G K D G L L E D F A T Q G G D R K

301 ATGTTTTCTT CTACCAGGCA GATGACCAAC ACTACATACC CAGGGCTCTT CTTATGGATC
    D V F F Y Q A D D Q H Y I P R A L L M D

361 TAGAACCGAG AGTAATCAAT GGAATACAGA ACAGTGAGTA TAAGAACCTA TTCAACCATG
    L E P R V I N G I Q N S E Y K N L F N H

421 AGAATATATA TTTATCTGAG CATGGTGGTG GTGCTGGAAA CAATTGGGCT AGTGGATATC
    E N I Y L S E H G G G A G N N W A S G Y

481 ATCAGGGTGA ACAAGTCGTT GATGATATCA TGGACATGGT GGATCGAGAA GCAGATGGAA
    H Q G E Q V V D D I M D M V D R E A D G

541 GTGATAGCCT TGAGGTTTTT GTTTTATGTC ACTCCATTGC TGGTGGAACT GGTTCAGGTA
    S D S L E G F V L C H S I A G G T G S G

601 TGGTTCTTA TGTGCTGGAG ACCCTAAATG ATCGATACAG TAAGAAGCTT GTACAGACAT
    M G S Y V L E T L N D R Y S K K L V Q T

661 ATAGTGTCTT TCCAAACCAG ATGGAAACGA GTGATGTTGT TGTCCAACCA TACAATTCCC
    Y S V F P N Q M E T S D V V V Q P Y N S

721 TTTTAACTCT GAAGCGCTTG ACACTGAATG CTGACTGTGT GGTTGTTCTT GACAATACGG
    L L T L K R L T L N A D C V V V L D N T

781 CTCTTAATAG AATTGCCGTT GAACGTCTTC ATTTGGCAA TCCTACTTTT GCACAAACAA
    A L N R I A V E R L H L A N P T F A Q T

841 ACTCTTTGGT TTCCACTGTT ATGTCTGCAA GCACAACCAC CTTGAGGTAT CCTGGATATA
    N S L V S T V M S A S T T T L R Y P G Y

901 TGAATAATGA TCTGGCTGGC CTTCTTGCCT CCTTGATTCC TACTCCAAGG TGCCATTTTC
    M N N D L A G L L A S L I P T P R C H F

961 TTATGACAGG TTATACTCCG TTGACCGTTG AACGACAGGT TAACATGATA CGCAAGACGA
    L M T G Y T P L T V E R Q V N M I R K T

1021 CGGTATTAGA TGTGATGAGA CGACTTCTGC AGACAAAGAA CATAATGGTG TCATCTTACG
    T V L D V M R R L L Q T K N I M V S S Y

1081 CTCGTACCAA GGAAGCTAGT CAGGCTAAAT ACATCTCCAT ACTCAACATC ATTCAAGGAG
    A R T K E A S Q A K Y I S I L N I I Q G

```

```

1141  AGGTGGACCC AACACAGGTC CATGAGAGCC TACAAAGGAT ACGTGAAAGG AAGCTTGTTA
      E V D P T Q V H E S L Q R I R E R K L V
1201  ACTTCGTAGA GTGGGGACCT GCAAGCATTG AGGTTGCATT GTCAAGAAAA TCACCATATG
      N F V E W G P A S I Q V A L S R K S P Y
1261  TTCAAACCAC CCACAGGGTT AGTGGTTTGA TGTTAGCAAA TCATACTAGC ATCCGTCACT
      V Q T T H R V S G L M L A N H T S I R H
1321  TATTCAGCAA ATGTCTGGGG CAGTATGAAA AGCTGAGGAA AAAGCAAGCC TTTCTTGACA
      L F S K C L G Q Y E K L R K K Q A F L D
1381  ACTACAGGAA GTTCCCAATG TTTGCGGACA ATGATCTGTC TGAATTCGAT GAATCTCGAG
      N Y R K F P M F A D N D L S E F D E S R
1441  AAATTATAGA GGGTCTGGTT GATGAATACA AGGCTTGCGA ATCACCTGAC TATATCAAAT
      E I I E G L V D E Y K A C E S P D Y I K
1501  GGGGAATGGA GGACCTTGGA GATGCAAATG TTGCGGCCGC ACTTGAGTCG AAGTTAGTTG
      W G M E D L G D A N V A A A L E S K L V
1561  TGTAAATACC AAGTCTCGC TGGTTATACA AAGATGCGAC TATAGCTGTC TGCTGGACAT
      V STOPP
1621  CAGTCTTGCT CAAGCTCAAC CCCACCCAA CGTAGTGCTA GTGTGGTACG GAATCGGTTG
1681  ACGCAGTTCT CTGCTTCCTT AGACTTTCGC TTTTTTCCGT TAGTTCAGTG CGCCATGTAT
1741  ATTTCGGAAT CCACTGCAAC CGGGTCTTTA TGCTGTTTTG TTTTGCGTGT ACAATCTGTA
1801  GTGATGCTGC TTTTGGTGCT GTGTGAGGTT TACATGTTTT CTGTCAAGTT ATTATTGCGC
1861  AGACCTTTCT TTGCTGGTGA CATAGCGGTT GCCAGAAATG TAATCTACTC CATCCGTTCC
1921  TAAATATAAG TCTTTTTAGA CATTCAATA GGGACTGTA TATGAAGCAA AATGAATGGA
1981  TCTTTTTTAA GAATAAAATA AGTGAATCTA CACTTTAAAA TAAAAAATAA AAAAAAATAA

```

**Abb. 43: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz von HVG TUB.**

Der Bindungsbereich der G3A-Sonde ist unterstrichen, der der G6S-Sonde zusätzlich doppelt unterstrichen und mögliche **Polyadenylierungssignale** sind fett hervorgehoben. Anfang und Ende des bei der potentiellen Polyadenylierungsvariante fehlenden Bereiches sind durch „-“ gekennzeichnet. **TG-reiche** Regionen im 3'-Ende sind schattiert. Das für die Variante mit langem 3'-Bereich spezifische PCR-Fragment (Primerkombination GGSPL2/GGSPR1) ist gestrichelt markiert. Das 3'-spezifische PCR-Amplifikat (Primerkombination GGSPL2/GGSPR3) ist zusätzlich umrahmt.

### 3.4.7 Der Basengehalt der cDNA-Sequenz HVG TUB

Der Gehalts an Purinbasen (A/T) war ähnlich dem bei den anderen bisher beschriebenen Tubulin-Sequenzen aus Gerste. In der nicht kodierenden 5'-Region konnte ein Wert von 28,4 % bestimmt werden. Allerdings wies  $\gamma$ -Tubulin mit 55,1 % im kodierenden Bereich und 59,0 % im nicht kodierenden 3'-Bereich ohne Poly(A)-Sequenz hier leicht erhöhte Werte auf.

### 3.4.8 Sequenzvergleich des $\gamma$ -Tubulins aus Gerste mit anderen Spezies

Bisher gibt es noch wenig Sequenzdaten über pflanzliche  $\gamma$ -Tubuline, so scheinen auch in den verschiedenen Pflanzenarten nur ein bis zwei Isotypen aufzutreten. Der Vergleich abgeleiteter AS-Sequenzen des  $\gamma$ -Tubulin der Gerste mit anderen Spezies zeigte (siehe Abb. 44), daß pflanzliches  $\gamma$ -Tubulin im C-Terminus 17 - 23 AS mehr besitzt als tierisches, wobei  $\gamma$ -Tubulin aus dikotylen Pflanzen wiederum um fünf AS länger ist als das der monokotylen Pflanzen. Der C-Terminus ist sehr variabel, über Speziesgrenzen hinweg konservierte Homologien befinden sich eher im N-terminalen Bereich. Allerdings besitzt  $\gamma$ -Tubulin aus Gerste zwischen Position 83 und 95 Sequenzbereiche, die sich deutlich von denen aller anderen bisher bekannten  $\gamma$ -Tubulin-Sequenzen der Gefäßpflanzen unterscheiden. Das Motiv 91 IYLSEH 96 ist im Gegensatz zu allen anderen bekannten pflanzlichen Sequenzen vollständig identisch mit dem aus Mensch. Die höchste Homologie von 96 - 97 % bestand zu den Sequenzen der anderen Monokotylen, zu Dikotylen bestand noch 89 - 91 % Homologie und zu  $\gamma$ -Tubulin aus *Chlamydomonas* bzw. Mensch jeweils 72 %.

HVGTUB	1	MPREIITIQVGQCGNQIGMEFWKQLCLEHGIGKDGLEDGFATQGGDRKDVFFYQADDQHYIPRALLMLEPRVINGIQNS	
AF036957	1	.....V.....	
ZMGAMTU	1	.....F...S...I.....	
ZMGAMTUB	1	.....F...S...I.....	
ATU02069	1	.....L.....S...I.....I.....G	
ATTUBG2	1	.....L.....S...I.....I.....G	
NTGTUB	1	.....L.....S.E.I.....I.....G	
APTUBGA	1	.....L.....S.E.M.....E.....L.....	
CRU31545	1	.....NL.....V.S...RK..Q.....R.....L.....EQ.....I.L.....T.	
HUMGTUB	1	.....L.L.....F.....SPEAIV.E...E.T.....E.....V.L.....HS.L..	
HVGTUB	81	EYKNLFNHENIYLSEHGGGAGNNWASGYHQGEQVVDIMDMVDREADGSDSLEGFVLCHSIAGGTGSGMGSYVLETLNDR	
AF036957	81	..R..Y....FVA.....I.....L.....	
ZMGAMTU	81	..R..Y....FVA.....F.....L.....	
ZMGAMTUB	81	..R..Y....FVA.....L.....	
ATU02069	81	D.R..Y....FVAD.....KG.EEE...I.....L.....	
ATTUBG2	81	..R..Y....F..D.....KG.EEE...I.....L.....	
NTGTUB	81	..R..Y....VFIAD.....K.YEE.L..I.....I.....	
APTUBGA	81	..R..Y....VFVAD.....EE...I.....L.....	
CRU31545	81	DLR...P...FI.KE.....T...QETLL.I...EYC...NM.....M..LIS..	
HUMGTUB	81	P..K.Y.P.....FS...KIHE..F.II.....L...L..R...	
HVGTUB	161	YSKKLVQTYSVFPNQMETSDVVVQPYNSLLTL-KRLTLNADCVVLDNTALNRIAVERLHLANPTFAQTNSLVSTVMSAS	
AF036957	161	.....-.....-.....-.....-.....	
ZMGAMTU	161	.....V.....-.....S.....	
ZMGAMTUB	161	.....-.....S.....	
ATU02069	161	.....-.....G.....T.....	
ATTUBG2	161	.....-.....T.....	
NTGTUB	161	.....N.....-.....ITT.....	
APTUBGA	161	.....N...I.....D..IP.....	
CRU31545	161	.....I.....S.S.....-.....H.....DK.....HK.DVQ.I..IA.....	
HUMGTUB	161	..P.....D.M.....-.....Q...L.....TD...IQ..S.S.I.Q...I...	
HVGTUB	240	TTTTLRYPGYMNNDLAGLLASLIPTPRCHFLMTGYTPLTVERQVNM---IRKTTVLDMRRLQLTKNIMVSSYARTKEAS	
AF036957	240	.....V.....-.....-.....-.....N.....	
ZMGAMTU	240	.....V.....-.....-.....-.....	
ZMGAMTUB	240	.....V.....-.....-.....-.....V.....	
ATU02069	240	.....V.....V.....-.....-.....N.....	
ATTUBG2	240	.....V.....V.....-.....-.....N.....	
NTGTUB	240	.....V.....V.....-.....-.....	
APTUBGA	241	.....V..V.....-.....-.....	
CRU31545	240	.....V..V.....NAAGQVTSN.....P.....THTKSRDIA	
HUMGTUB	240	.....I..I.....L.....TDQS..S---V.....P..V.....-...GRDR	
HVGTUB	316	QAK--YISILNIIQGEVDPTQVHESLQRIRERKLVNFVWGPASIQVALSRKSPYVQTTHRVSGMLMLANHTSIRHLFSKC	
AF036957	316	....-.....I.....	
ZMGAMTU	316	....-.....IY.....	
ZMGAMTUB	316	....-.....ID.....G..	
ATU02069	316	....-.....I.....K.....S.....	
ATTUBG2	316	....-.....ID.....K.....S.....S.....R.	
NTGTUB	316	....-.....ID.....K.....S..G.....	
APTUBGA	317	....-.....K.....I.....S.....	
CRU31545	320	N..-.....S..K.....QA..I.....K.....V...N.V	
HUMGTUB	312	.TNHC.....K.....IP.....LPSA.....M.....SS..ERT	
HVGTUB	394	LGQYEKLRKK---QAFLDNRYKFPMFADND-----LSEFDESREIEGLVDEYKACESPDYIKWGMEDL-----GDAN	
AF036957	394	.....E.....S.....E..	
ZMGAMTU	394	.....S.....P-----E..	
ZMGAMTUB	394	.....S.....P-----E..	
ATU02069	394	.S..D.....D..S.....PEQLMT.EG.	
ATTUBG2	394	.S..D.....D..S.....PGQLMT.EG.	
NTGTUB	394	.S..D...R-----NH.T.....DV..S.....PDHVL.T.EG.	
APTUBGA	395	IN.....T.....VQS.....R-----SKTL	
CRU31545	398	.RD...MGPKQER...MQA..DV.R...AGGGTAL.E...DAK.VVQD..N.....QRQ..AS-----	
HUMGTUB	392	CR..D...R---E...EQF..ED..K.....FD.M.T...VQQ.I...H..TR...S..TQ.Q-----	
HVGTUB	459	VAAALE--S-----KLVV	<i>Hordeum vulgare</i>
AF036957	459	....D-----	<i>Oryza sativa</i>
ZMGAMTU	459	.V..D-----	<i>Zea mays</i>
ZMGAMTUB	459	...D-----	<i>Zea mays</i>
ATU02069	464	ASGVVD--P-----F	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATTUBG2	459	ASGV-----ADP...F	<i>Arabidopsis thaliana</i>
NTGTUB	464	ASGTVD--P-----SL	<i>Nicotiana tabacum</i>
APTUBGA	460	S.DGTMDL-----LPSS	<i>Anemia phyllitidis</i>
CRU31545		-----	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
HUMGTUB		-----	<i>Homo sapiens</i>

**Abb. 44: Vergleich der abgeleiteten AS-Sequenz von g-Tubulin aus Gerste mit anderen Pflanzenarten.** Nur die von der Referenzsequenz abweichenden AS sind angegeben, fehlende AS bzw. alignment-bedingte Lücken sind mit Strichen dargestellt. Als „outgroup“ diente HUMGTUB.

### 3.5 Genexpressionsstudien

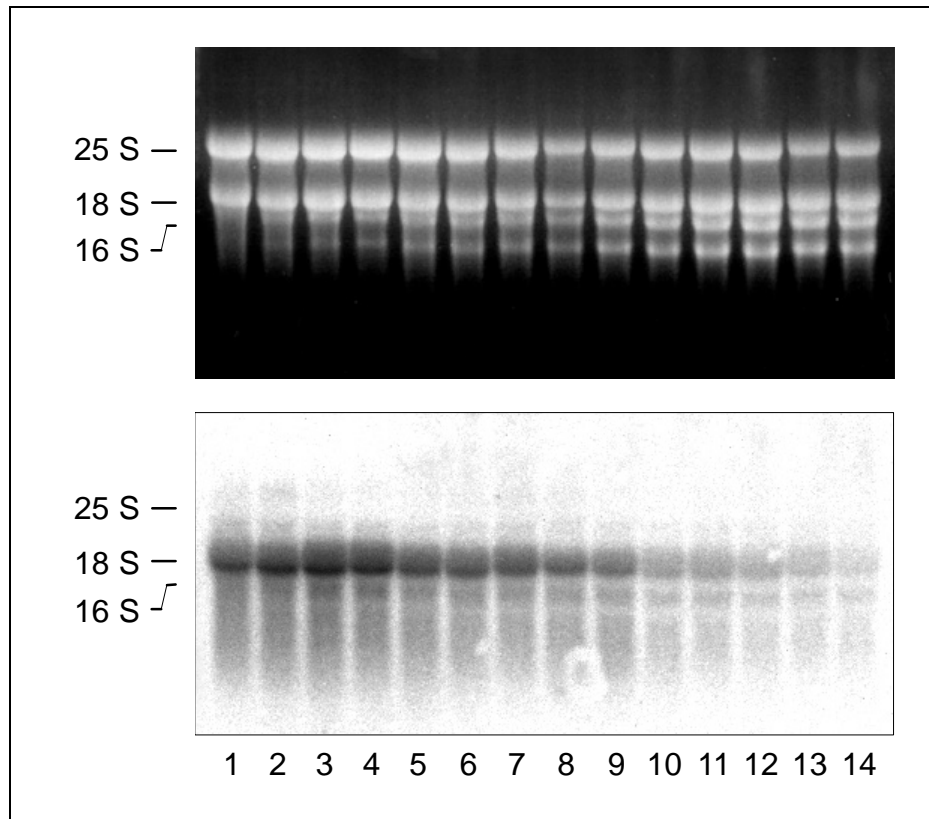
Im Vordergrund stand die Aufklärung der Expression  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen innerhalb des Entwicklungsgradienten des Blattes, da die Ergebnisse auf Proteinebene hier - im Gegensatz zu den Verhältnissen beim  $\beta$ -Tubulin - eine deutliche differenzielle Expression vermuten ließen. Außerdem galt es zu untersuchen, ob  $\gamma$ -Tubulin-Transkript außer in meristematischen Geweben noch in weiter differenzierten Blattbereichen auftritt. Aus den jetzt bekannten cDNA-Sequenzen für Tubulin, die durch das umfangreiche Screening der cDNA-Bibliotheken ermittelt werden konnten, wurden sowohl homologe als auch isotypspezifische DNA-Gensonden abgeleitet. Mit diesen spezifischen DNA-Sonden konnte die Genexpression von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tubulin im Entwicklungsgradienten des Blattes mittels Northernblot-Analysen detailliert untersucht werden.

Alle Northernblot-Untersuchungen wurden zwei bis drei mal wiederholt, dabei traten keine auffälligen Abweichungen auf. Darüberhinaus wurden die Spezifität der DNA-Gensonden durch Kreuzhybridisierungstests bestätigt (nicht gezeigt).

#### 3.5.1 Expression von $\alpha$ -Tubulin-mRNA

In Mesophyllzellen von *Hordeum vulgare* kommt es im Laufe der Blattentwicklung zu charakteristischen Ausprägungen des mikrotubulären kortikalen Cytoskelettmusters, wie in Abb. 3, Kapitel 1.2 am Beispiel des zweiten Blattes schematisch dargestellt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl der Gesamtgehalt von  $\alpha$ -Tubulin-Transkript als auch das Auftreten isotypspezifischer  $\alpha$ -Tubulin-Transkripte in RNA-Präparationen aus den entsprechenden Blattsegmenten untersucht. Zum einen mit homologen Gensonden, die mit konservierten Bereichen im 3'-Bereich des offenen Leserahmens von  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen hybridisieren können, und zum anderen mit isotypspezifischen Gensonden, die mit den nicht kodierenden 3'-Sequenzbereichen der Transkripte hybridisieren.

Die Hybridisierungssignale mit der homologen Sonde 11-3 für konservierte Bereiche im 3'-Bereich der kodierenden Sequenz zeigten ein Maximum des  $\alpha$ -Tubulin-Transkriptes bei Segment 3 (siehe Abb. 45), danach erfolgt eine stetige Abnahme bis auf 10 % im Segment 14. Dies bestätigte die entsprechenden Untersuchungen mit einer heterologen DNA-Sonde aus Mais (MEYER et al. 1998).



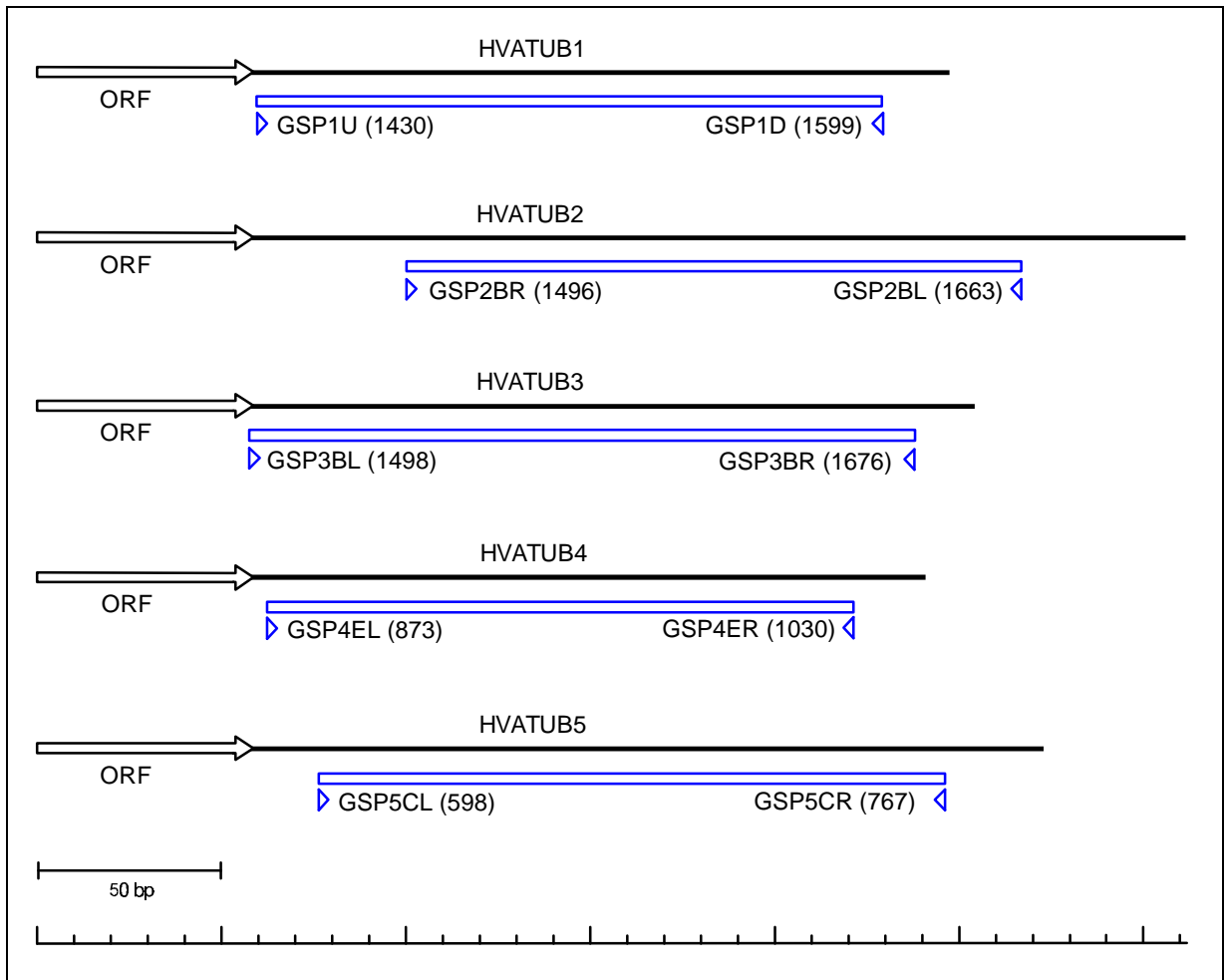
**Abb. 45: Abundanz von  $\alpha$ -Tubulin-Transkript im Entwicklungsgradienten des Blattes.**

Oben: Elektrophoretische Auftrennung von gRNA (12  $\mu$ g) der Segmente 1 - 14. Deutlich zu erkennen ist die Abnahme der cytosolischen rRNA-Anteile zugunsten der Zunahme plastidärer rRNA. Unten: Mit Sonde 11-3 hybridisierte mRNA. Die Banden der  $\alpha$ -Tubulin-Transkripte befinden sich bei 1,8 kb. Stringente Waschbedingungen, Expositionsdauer 65 h.

### 3.5.1.1 Herstellung isotypspezifischer DNA-Sonden mit PCR

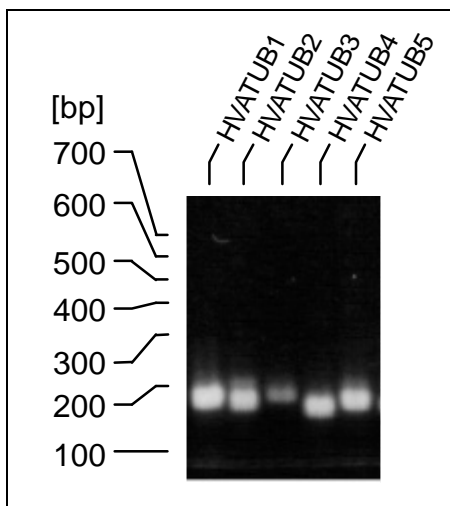
Die  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen der Gerste wiesen im kodierenden Bereich eine zum Teil sehr große Ähnlichkeit zueinander auf. Daher mußte zur Differenzierung der verschiedenen  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen die Hybridisierung auf den isotypspezifischen nicht kodierenden 3'-Bereich eingegrenzt werden. Die benötigten isotypspezifischen DNA-Sonden wurden mittels PCR unter Verwendung der isotypspezifischer Primer hergestellt (siehe Abb. 46). Je nach Isotyp wurden PCR-Sonden im Bereich von 158 bis 175 bp Länge amplifiziert (siehe Abb. 46 und 47).

Alle Hybridisierungsansätze sollten im Hinblick auf die eingesetzte Aktivität vergleichbar sein. Da die Effizienz der PCR-Reaktionen unterschiedlich war (siehe Abb. 47), wurde mittels Flüssigszintillations-Zählung die spezifische Aktivität der Reaktionen bestimmt und die Hybridisierungen jeweils mit  $2 \times 10^8$  cpm ( $3,36 \times 10^7$  cpm/ml) Sonden-Aktivität durchgeführt.



**Abb. 46: Positionen der isotypspezifischen  $\alpha$ -Tubulin-DNA-Sonden.**

Dargestellt sind die letzten 60 bp des kodierenden Bereichs (ORF) und nicht kodierende 3'-Enden der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen aus Gerste. In Klammern ist die Position der Primer (Pfeilspitzen) angegeben.



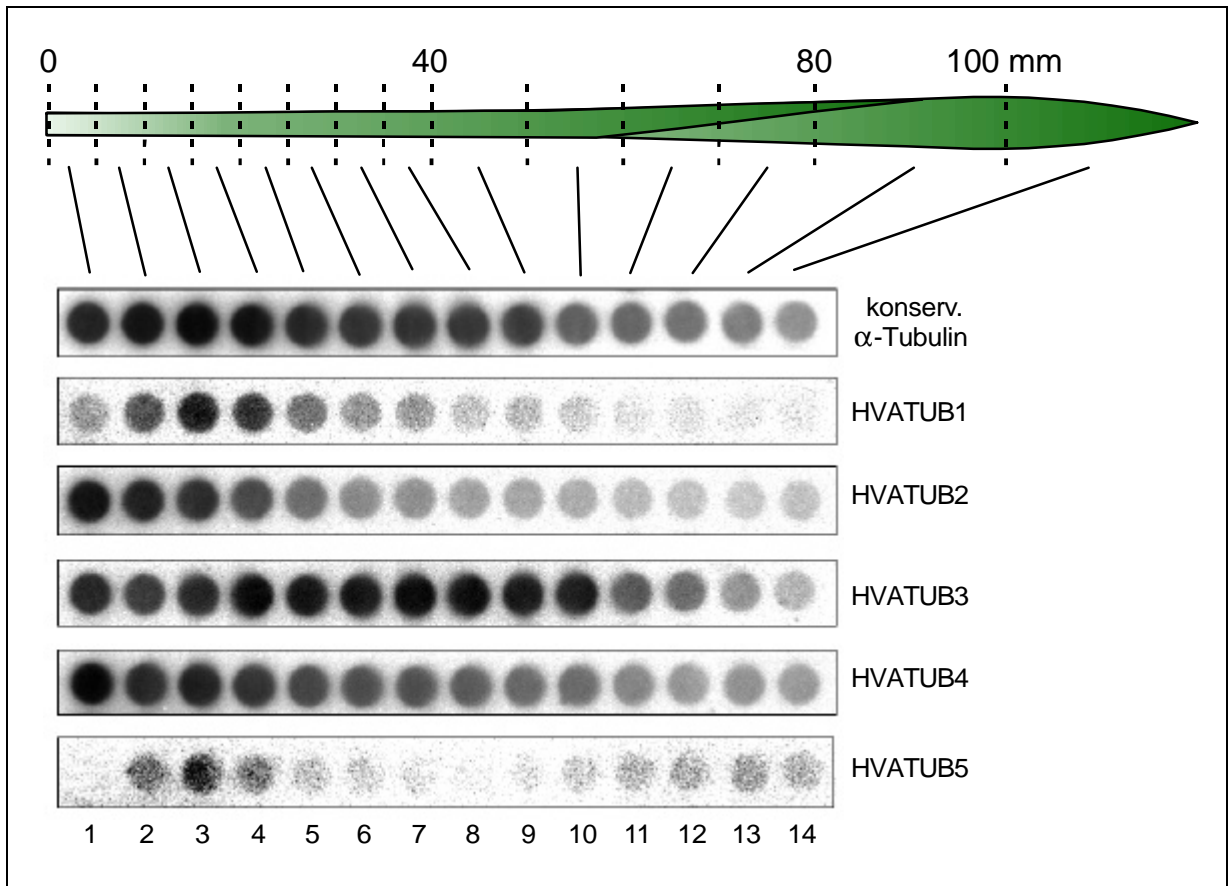
**Abb. 47: Nicht-radioaktiver PCR-Ansatz zur Überprüfung der Amplifikationseffizienz der isotypspezifischen Sonden.**

Aufgetrennt wurden 5  $\mu$ g eines PCR-Ansatzes (25  $\mu$ g) mit 2,5 ng Template-DNA. Annealingtemperatur 50°C (2 %iges Agarosegel).

### 3.5.1.2 Entwicklungsspezifische Expression der einzelnen $\alpha$ -Tubulin-Isotypen

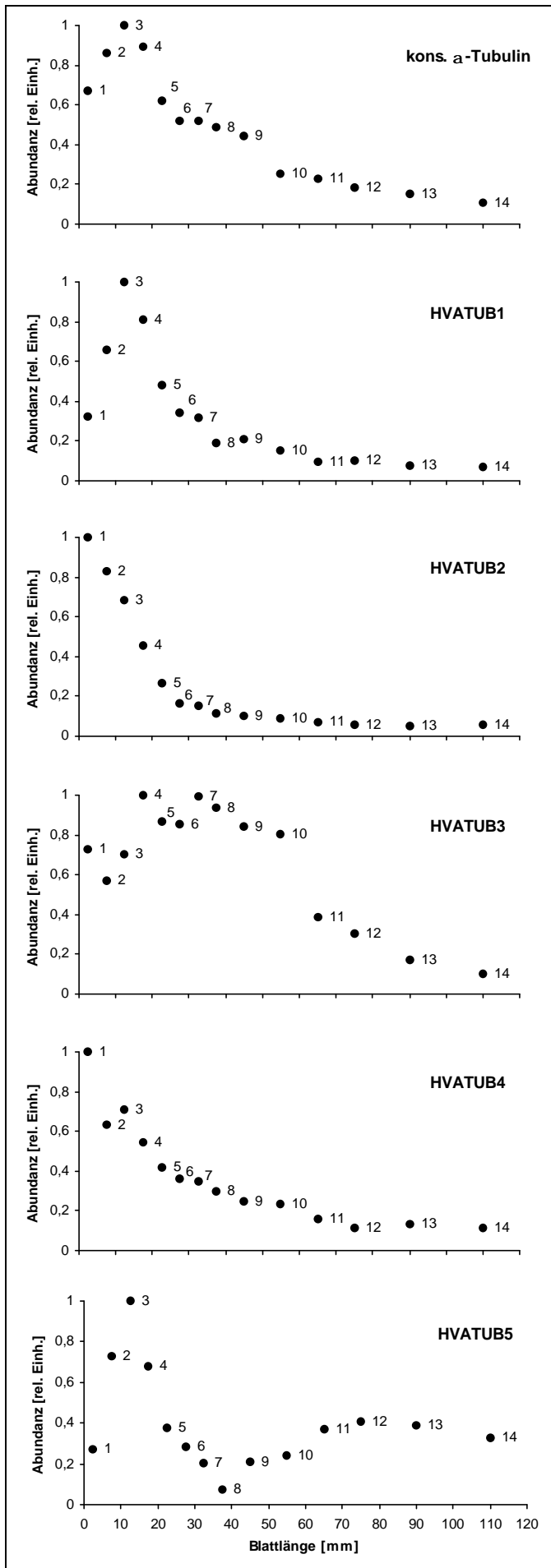
Die gRNA-Präparationen der einzelnen Blattabschnitte wurden mittels Dotblot-Hybridisierungen mit der Sonde 11-3 und den fünf isotypspezifischen Sonden analysiert. Mit allen Sonden konnten jeweils charakteristische Expressionsmuster im Entwicklungsgradienten des Blattes nachgewiesen werden (siehe Abb. 48). Außerdem wurden diese Signale zur Quantifizierung densitometrisch ausgewertet (siehe Abb. 49).

Im folgenden sollen die Expressionsmuster der einzelnen Isotypen während der Blattentwicklung gegenübergestellt werden. Den Hybridisierungen mit isotypspezifischen Sonden ist das „integrierende“ Muster der mit allen  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen hybridisierenden 11-3-Sonde vorangestellt. Der Transkriptgehalt von HVATUB1 und HVATUB5 stieg an vom Segment 1 bis zum Segment 3 und nahm in den folgenden Segmenten wieder ab. Besonders auffällig war diese Abnahme bei HVATUB5, wobei in RNA älterer Blattabschnitte sich eine wieder leicht erhöhte Abundanz zeigte. Mittels Northernblot-Analysen (siehe Abb. 50) konnte dieser Anstieg in älteren Segmenten allerdings nicht bestätigt werden. Innerhalb der ersten drei Blattsegmente konnte bei HVATUB2 und HVATUB4 ein genau entgegengesetztes Expressionsmuster beobachtet werden. Bereits im basalen Segment war der Transkriptgehalt am höchsten, gefolgt von einer stetigen Abnahme zu älteren Blattabschnitten hin. Bei HVATUB2 verlief diese Abnahme wesentlich schneller als bei HVATUB4. Die höchste Abundanz von HVATUB3 war hingegen deutlich verschoben in Richtung älterer Blattabschnitte (Segmente 4 bis 10) jenseits der Zellstreckungszone. HVATUB3 wurde aber auch bereits im Segment 1 stark exprimiert (über 50 %), danach erfolgte eine nur geringe Abnahme des Signals, um dann wieder zuzunehmen. In den Segmenten 4 bis 10 verblieb der Transkriptgehalt von HVATUB3 über dem Niveau von 60 %. Erst danach erfolgte eine rasche Abnahme des Signals.



**Abb. 48: Isotypenspezifische Expression der  $\alpha$ -Tubulin-Transkripte aus Gerste im Entwicklungsgradienten des Blattes.**

Dot blot-Analyse von gRNA (12  $\mu$ g) der Segmente 1 - 14. Stringente Waschprozedur. Expositionsdauer der Blots HVATUB1 bis HVATUB3: 2 d 19 h. Expositionsdauer der Blots HVATUB4 und HVATUB5: 4 d 17 h.

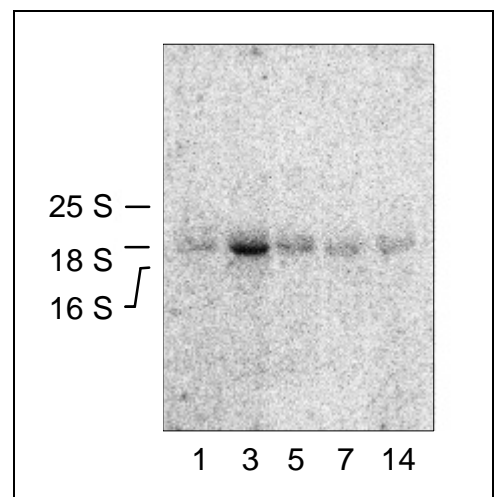


**Abb. 49 (links):** Densitometrisch ausgewertete Signale der  $\alpha$ -Tubulin-Transkripte des Dotblots (Abb. 48):

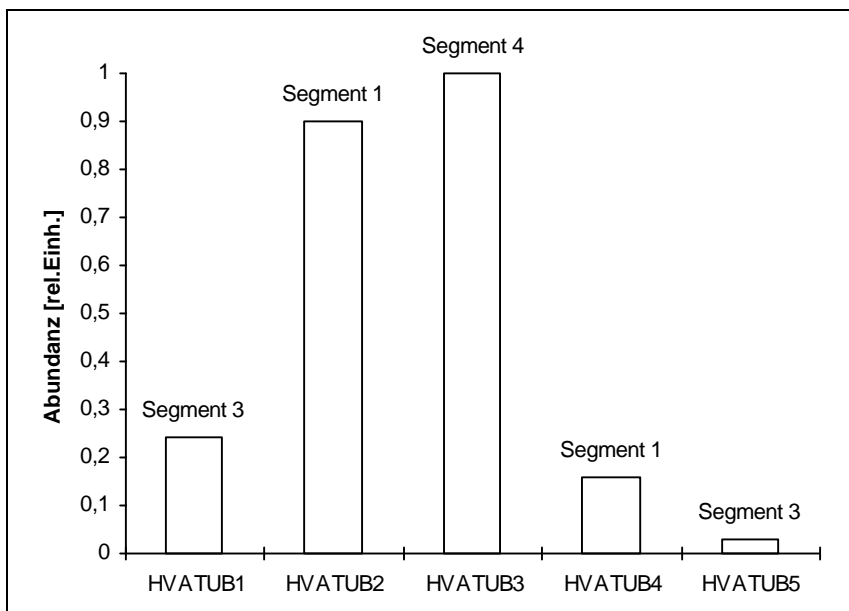
Die Transkriptmengen jedes einzelnen Isotyps wurden auf Basis des jeweils stärksten Signals in Beziehung gesetzt.

**Abb. 50 (unten):** Northernblot des  $\alpha$ -Tubulin-Transkripts HVATUB5.

gRNA (6  $\mu$ g) der Segmente 1, 3, 5, 7, 14 wurden untersucht, stringente Waschbedingungen, Expositionsdauer 7 d.



Die Transkriptgehalte der Segmente wurden nicht nur bezogen auf die jeweils höchste Abundanz innerhalb ein und derselben isotypspezifischen Untersuchung in Relation gesetzt. Die verschiedenen isotypspezifischen Abundanzen wurden auch miteinander verglichen. Die auf den Blots (siehe Abb. 48) parallel aufgetragenen Konzentrationsreihen der jeweiligen Sonden-DNA (nicht gezeigt) dienten hierfür als Bezugsgröße. Das im Entwicklungsgradienten jeweils am stärksten hervortretende Signal wurde über diese Bezugsgröße quantifiziert. Am stärksten exprimiert wurde das Transkript HVATUB3, das jeweils stärkste Signal jeder anderen isotypspezifischen Markierung wurde zu diesem in Beziehung gestellt: Verglichen hierzu wies HVATUB2 eine Signalstärke von 0,90 auf, bei 0,24 lag HVATUB1, HVATUB4 hatte eine Signalstärke von 0,16 und das stärkste Signal des Transkripts von HVATUB5 wies nur noch eine Intensität von 0,03 auf (siehe Abb. 51).

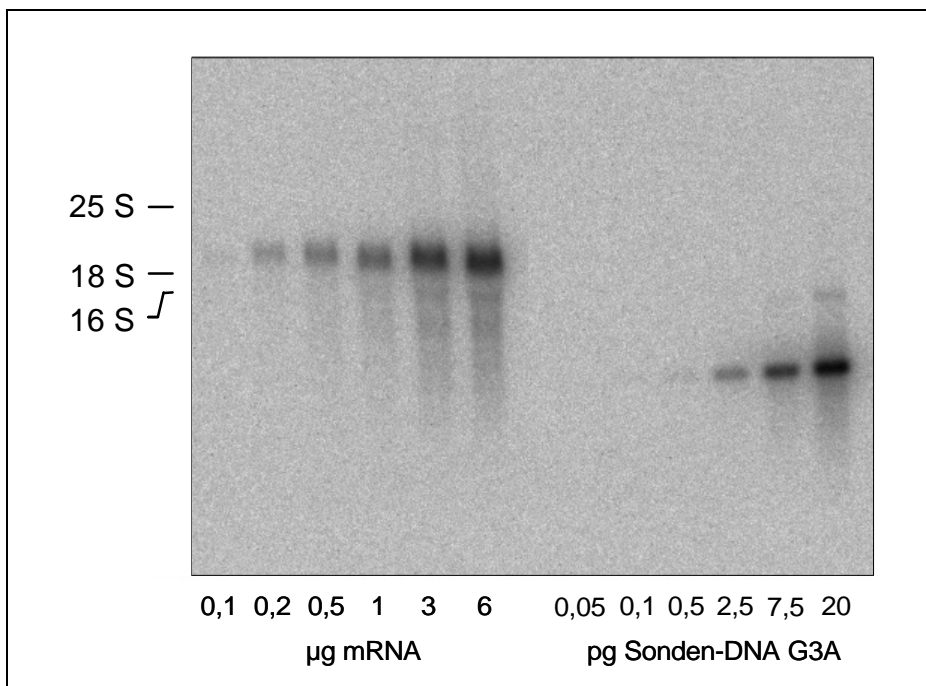


**Abb. 51: Vergleich der absoluten Signalstärken der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen.**

Berechnungsgrundlage waren die Dotblots (Abb. 48). Über parallel aufgetragene Konzentrationsreihen der jeweiligen Sonden-DNA wurden die jeweils stärksten Signale innerhalb des Entwicklungsgradienten quantifiziert und in Bezug zueinander gesetzt.

### 3.5.2 Expression von $\gamma$ -Tubulin-mRNA

$\gamma$ -Tubulin, bekannt als Bestandteil von Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) mitotischer Zellen, sollte in der vorliegenden Arbeit auf sein Auftreten im Zuge der Blattentwicklung untersucht werden. Da zu erwarten war, daß das  $\gamma$ -Tubulin-Transkript HVGTUB in weitaus geringerem Maß exprimiert wird als  $\alpha$ -Tubulin, wurden zunächst mRNA-Präparationen des mitosereichen, ersten Segments untersucht.  $\gamma$ -Tubulin-Transkript konnte durch Hybridisierung mit einer im kodierenden Bereich bindenden Sonde nachgewiesen werden (siehe Abb. 52). Die Banden der  $\gamma$ -Tubulin-Transkripte lagen im Gegensatz zu den Banden der  $\alpha$ -Tubulin-Transkripte etwas oberhalb der 18S-rRNA-Bande und wurden auf etwa 2 kb geschätzt. Da schon in 100 - 200 ng mRNA  $\gamma$ -Tubulin-Transkript nachgewiesen werden konnte, wurde in den folgenden Untersuchungen gRNA eingesetzt.



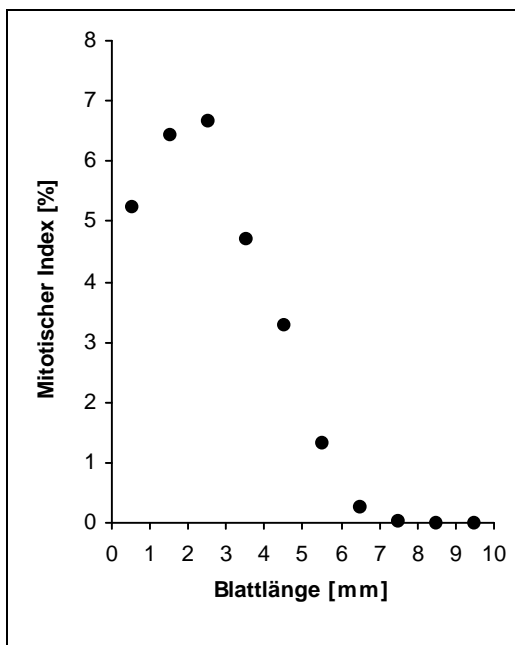
**Abb. 52: Nachweis von  $\gamma$ -Tubulin-Transkript bei Gerste.**

Links: Northernblot mit einer Konzentrationsreihe von 0,1 bis 6  $\mu$ g mRNA des ersten Segments. Hybridisiert wurde mit der homologen DNA-Sonde G3A (kodierender Bereich), die zur Abschätzung der Nachweisgrenze in einer Konzentrationsreihe von 0,05 bis 20 pg aufgetragen wurde (rechts). Stringente Waschbedingungen, Expositionsdauer 4 d.

Um korrelative Abweichungen zwischen  $\gamma$ -Tubulin-Expression und Zellteilungsaktivität herstellen zu können, wurde der mitotischen Index (MI) gesamter Blattquerschnitte (Dicke 1 mm) der ersten 10 mm nahe der Blattbasis bestimmt. Innerhalb der ersten drei Millimeter nahm der MI noch leicht zu, um nach dem Erreichen eines Maximums von knapp 7 % in den

folgenden Blattabschnitten stark abzunehmen (siehe Abb. 53). Acht bis neun Millimeter entfernt von der Blattbasis konnten in sehr seltenen Fällen noch vereinzelte Mitosestadien angetroffen werden, danach waren keinerlei Mitosestadien mehr nachweisbar.

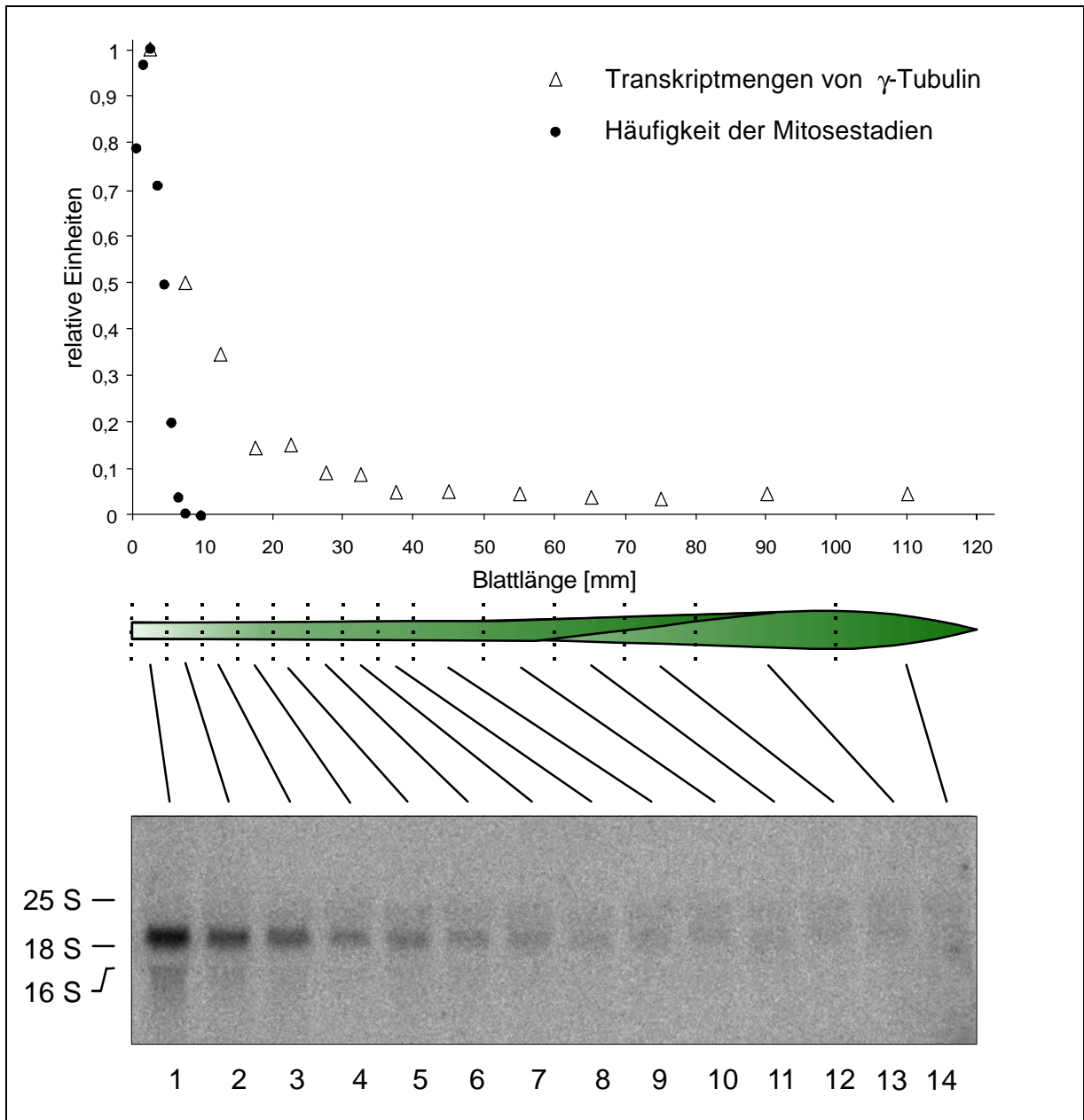
Die anschließende Untersuchung der Genexpression von  $\gamma$ -Tubulin im gesamten Entwicklungsgradienten wurde ebenfalls mit einer im kodierenden Bereich bindenden DNA-Sonde durchgeführt. Verglichen mit der Abundanz von  $\alpha$ -Tubulin zeigte sich eine weitaus schnellere Abnahme der Signalintensität entlang des Entwicklungsgradienten (siehe Abb. 54). Die Abnahme verlief allerdings nicht in dem starken Maße, wie es der Verlauf des MI erwarten ließ. Zur genaueren Untersuchung wurden diese Signale densitometrisch erfaßt.



**Abb. 53: Bestimmung des mitotischen Index in Segment 1 und 2.**

Untersucht wurden Blattquerschnitte (1 mm) den ersten 10 mm nahe der Blattbasis.

Die  $\gamma$ -Tubulin-Transkriptmengen in gRNA der einzelnen Blattsegmente nahmen vom Maximum im Segment 1 rasch auf unter 15 % in Segment 5/6 ab (siehe Abb. 54). In den folgenden Blattabschnitten war kaum noch Transkript nachweisbar. Faßt man die Werte des MI (1 mm-Abschnitte) auf eine Klassenbreite entsprechend der fünf Millimeter langen Segmente zusammen, um einen Vergleich mit den densitometrisch bestimmten  $\gamma$ -Tubulin-Transkriptmengen führen zu können, ergab sich für Segment 1 ein MI-Durchschnittswert von 5,3 %. Im Segment 2 betrug die Häufigkeit von Mitosen dann nur noch rund 1/18 dieses Wertes. Im Unterschied dazu betrug die densitometrisch bestimmte  $\gamma$ -Tubulin-Transkriptmenge in diesem Abschnitt jedoch noch ungefähr die Hälfte, verglichen mit dem ersten Segment. Bemerkenswert ist, daß die Signalstärke im Segment 3 noch bei rund 38 % lag, während hier keinerlei Mitosestadien mehr anzutreffen waren.



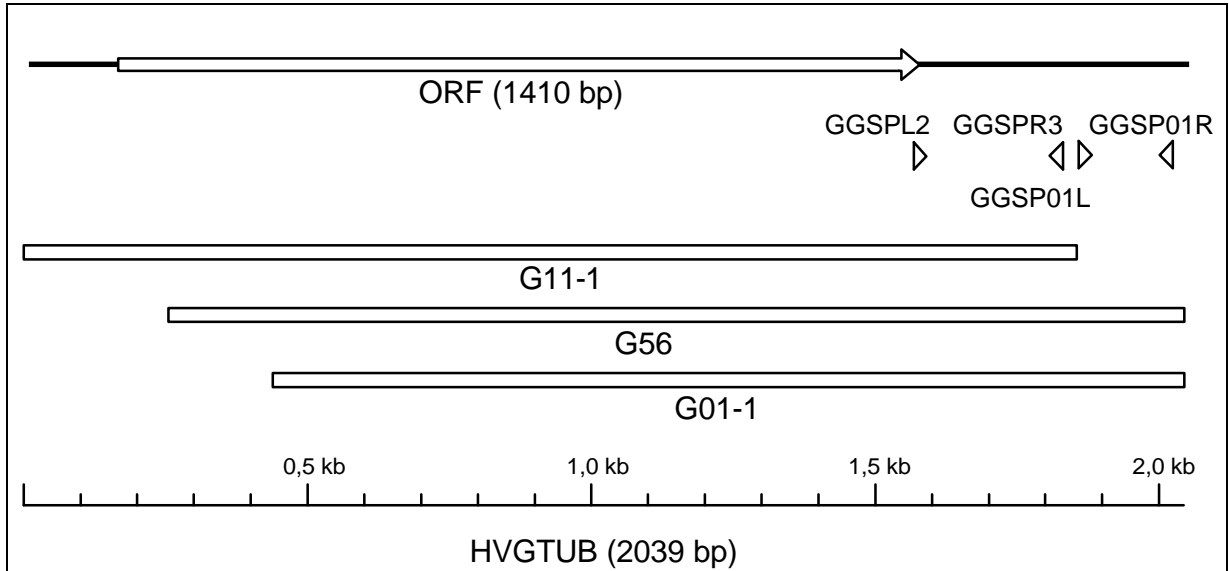
**Abb. 54: g-Tubulin-Expression im Vergleich mit Häufigkeit von Mitosestadien.**

Oben: Vergleich der densitometrisch bestimmten Transkriptmengen von  $\gamma$ -Tubulin ( $\Delta$ ) (vom unten dargestellten Blot) mit dem mitotischen Index ( $\bullet$ ) entlang des Entwicklungsgradienten (Schema Mitte). Unten: Mit Sonde G6S markierter Northernblot mit gRNA (12  $\mu$ g) der einzelnen Blattsegmente 1 bis 14. Stringente Waschprozedur, Expositionsdauer 2 d 20 h.

### 3.5.2.1 Herstellung 3'-Bereich spezifischer DNA-Sonden für g-Tubulin

Um erste Untersuchungen hinsichtlich potentieller Polyadenylierungsvarianten (stellvertretend hierfür die Klone G01-1 und G56 mit langem 3'-Ende, Klon G11-1 mit kurzem 3'-Ende) durchführen zu können, wurden die benötigten DNA-Gensonden mittels PCR unter Verwendung der in Abb. 55 dargestellten Primer hergestellt. Die Sonde (11-1), spezifisch für beide Varianten, konnte mit der schon erprobten Primerkombination GGSP2/GGSP3

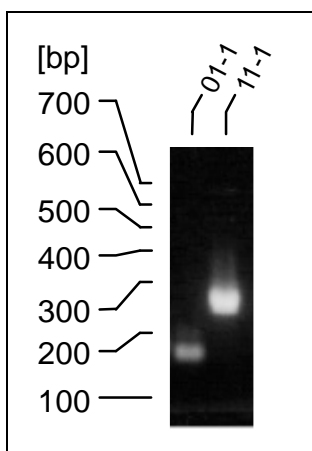
(siehe Kapitel 3.4.3) hergestellt werden, die Sonde (01-1) für den langen nicht kodierenden 3'-Bereich wurde unter Verwendung der Primer GGSP01L und GGSP01R hergestellt (siehe Abb. 55).



**Abb. 55: Herstellung von Sonden spezifisch für den nicht kodierenden 3'-Bereich von HVGTUB durch PCR.**

Die bisher bekannten Varianten von HVGTUB sind durch offenen Balken dargestellt, der kodierende Bereich (ORF) ist als Pfeilform gekennzeichnet und die Lage der Primer mit Pfeilspitzen. Die Primerkombination GGSP2/GGSPR3 führt zur für beide Varianten spezifischen Sonde (11-1), die andere Kombination führt zur Sonde(01-1), die spezifisch für die lange Version ist.

Die PCR-Reaktion ergab bei der Sonde (11-1) sechs- bis achtmal mehr Amplifikat als bei Sonde (01-1) (siehe Abb. 56). Deshalb wurde auch hier die spezifische Aktivität bestimmt, um die Aktivität der Hybridisierungsansätze angleichen zu können.

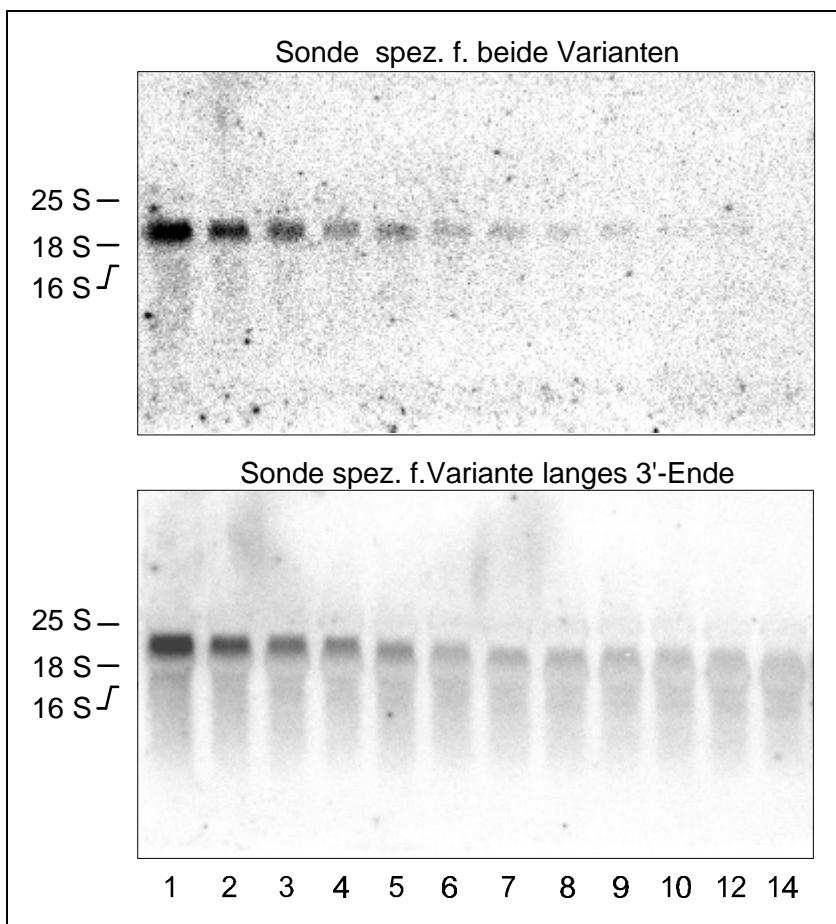


**Abb. 56: Nicht-radioaktiver PCR-Ansatz zur Überprüfung der Amplifikationseffizienz der Sonden spezifisch für den nicht kodierenden 3'-Bereich.**

Sonde (01-1) war spezifisch für das lange 3'-Ende, Sonde (11-1) war spezifisch für beide Varianten. Aufgetrennt wurden 5 µg eines PCR-Ansatzes (25 µg); 2 %iges Agarosegel.

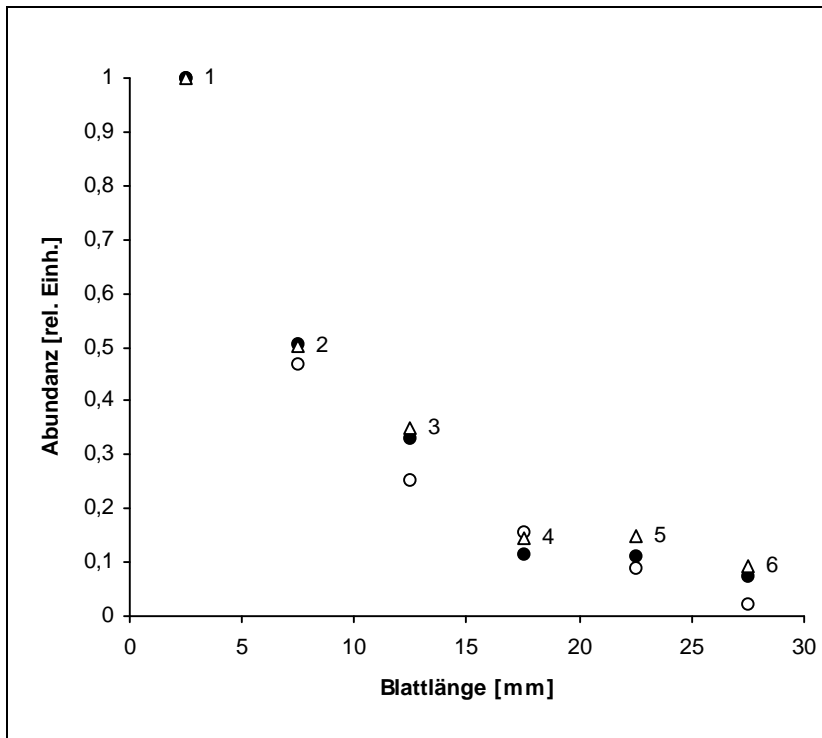
### 3.5.2.2 Nachweis von HVGTUB-Transkript mit 3'-spezifischen DNA-Sonden

Mit beiden Sonden konnte  $\gamma$ -Tubulin-Transkript im Northernblot (siehe Abb. 57) nachgewiesen werden und die Abnahme der Signalintensität verlief bei beiden ähnlich. Allerdings war die Signalintensität nach der Hybridisierung mit der für den langen nicht kodierenden 3'-Bereich spezifischen Sonde (01-1) derart schwach (nicht gezeigt), daß eine densitometrische Quantifizierung nicht möglich war. Dem konnte abgeholfen werden durch die Erhöhung der spezifischen Aktivität bei der Sondenmarkierung. Ein Vergleich der densitometrisch ermittelten Werte der Signalstärke beider Hybridisierungen bestätigte, daß die Abnahme der Signalstärken bei beiden entlang des Entwicklungsgradienten fast gleich verlief (Abb. 58). Außerdem war die Abnahme der Signalintensität vergleichbar zu der bei der Markierung mit der Sonde G6S (kodierender Bereich) beobachteten Kinetik. Das sehr schwache Signal der für die lange 3'-Variante spezifischen Sonde kann als erster Hinweis auf die Existenz zweier Varianten auch auf RNA-Ebene verstanden werden. Hierzu sind jedoch noch eingehendere Untersuchungen nötig.



**Abb. 57: Nachweis von  $\gamma$ -Tubulin mittels Sonden spezifisch für den nicht kodierenden 3'-Bereich.**

Oben: Markierung mit der für beide Varianten spezifischen Sonde (Sondenmarkierung mit 12,5  $\mu$ Ci [ $\alpha^{32}$ P]dATP). Unten: Markierung mit der für das lange 3'-Ende spezifischen Sonde (Sondenmarkierung mit 50  $\mu$ Ci [ $\alpha^{32}$ P]dATP). gRNA (12  $\mu$ g) der Segmente 1 bis 10, sowie 12 und 14 wurde untersucht. Stringente Waschprozedur, Expositionsdauer 5 d 20 h.



**Abb. 58: Relative Werte der densitometrisch erfaßten Transkriptmengen.**

Die Markierungen mit der Sonde 11-1 (○) und der Sonde 01-1 (●) von Abb. 57 wurden verglichen mit der Markierung (siehe Abb. 54) durch Sonde G6S (Δ), die im kodierendem Sequenzbereich hybridisiert. Dargestellt sind nur die Hybridisierungssignale der Transkripte aus den Segmenten 1 bis 6.

## 4. Diskussion

### 4.1 Genexpression von $\alpha$ -Tubulin

In vielzelligen Organismen treten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline in der Regel in Multigenfamilien auf (LUDUEÑA 1998), weshalb die Aufklärung der Genexpression der einzelnen Isotypen von zentraler Bedeutung ist. Im tierischen Organismus ist die entwicklungsabhängige Expression von Tubulin-Isotypen schon seit einiger Zeit bekannt (siehe auch LEWIS et al. 1985, LINHARTOVA et al. 1992, JIANG & OBLINGER 1992). Auch bei Pflanzen werden Tubulin-Isotypen entwicklungspezifisch exprimiert. Erstmals wurde dies bei *Arabidopsis thaliana* beschrieben (SILFLOW et al. 1987, LUDWIG et al. 1988, KIM & AN 1992, CARPENTER et al. 1992, CARPENTER et al. 1993). Bei *Zea mays* wird Tubulin gleichfalls entwicklungspezifisch exprimiert (MONTOLIU et al. 1990a, HUSSEY et al. 1990, JOYCE et al. 1992). So tritt der  $\alpha$ -Tubulin-Isotyp ZMALTUB1 im Gegensatz zu ZMALTUB3 bevorzugt in Wurzelspitzen auf (MONTOLIU et al. 1990a). Entwicklungsspezifische Expression von Tubulin-Isotypen wurde auch bei einer Reihe anderer Pflanzenarten untersucht (Übersicht siehe Tab.13), allerdings wurde bisher bei keiner einzigen Pflanzenspezies die Genexpression aller bekannter Tubulin-Isotypen einer Genfamilie im Entwicklungsverlauf eines Organs analysiert. In der vorliegenden Arbeit konnten die Daten zur Genexpression zudem mit cytoskelettalen Musteränderungen korreliert werden.

Spezies	Quelle
<i>Daucus carota</i>	OKAMURA et al. (1997)
<i>Eleusine indica</i>	YAMAMOTO & BAIRD (1999)
<i>Eucalyptus globulus</i>	DIAZ et al. (1996)
<i>Glycine max</i>	CREELMAN & MULLET (1991), HAN et al. (1991)
<i>Gossypium hirsutum</i>	DIXON et al. (1994), WHITTAKER & TRIPLETT (1999)
<i>Lupinus albus</i>	VASSILEVSKAIA et al. (1996)
<i>Nicotiana tabacum</i>	SORRI et al. (1996), OKAMURA et al. (1999)
<i>Oryza sativa</i>	QIN et al. (1997)
<i>Prunus amygdalus</i>	STÖCKER et al. (1993)
<i>Solanum tuberosum</i>	TAYLOR et al. (1994)
<i>Zinnia elegans</i>	YOSHIMURA et al. (1996)

**Tab. 13:** Übersicht über weitere Pflanzenarten, bei denen Genexpressionsstudien bezüglich Tubulin-Isotypen durchgeführt wurden.

#### **4.1.1 Differenzielle Genexpression der $\alpha$ -Tubulin-Isotypen im Entwicklungsgradienten des Blattes**

Da der Anteil der Mesophyllzellen gegenüber anderen Zelltypen des Blattes dominant ist (JELLINGS & LEECH 1982), können Beobachtungen auf cytologischer Ebene gut mit Analysen, die auf dem Extrakt einzelner Blattsegmente beruhen, korreliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Transkriptmengen der einzelnen Tubulin-Isotypen zueinander in Beziehung gestellt, ein interner Mengenstandard als BezugsgöÙe zur Quantifizierung von Transkriptmengen war daher nicht notwendig.

Bei  $\alpha$ -Tubulin zeichnete sich im Gegensatz zu  $\beta$ -Tubulin bereits auf Proteinebene eine weitaus deutlichere differenzielle Expression der Isotypen ab (HELLMAN 1995, HELLMANN & WERNICKE 1998), deshalb stand im Zentrum der Genexpressionsstudien das  $\alpha$ -Tubulin. Die hier vorliegenden Untersuchungen zur Transkription der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen ermöglichten es, einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der charakteristischen, in der Einleitung beschriebenen MT-Strukturen und der differenziellen Transkription der fünf  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen der Gerste während der Blattentwicklung herzustellen.

Die aus den isolierten cDNA-Sequenzen abgeleiteten DNA-Sonden für den nicht kodierenden 3'-Bereich dienten zum isotypspezifischen Nachweis der Transkripte des  $\alpha$ -Tubulin. Am stärksten wurde HVATUB3 im Entwicklungsgradienten exprimiert, nicht ganz so stark HVATUB2. Dann folgten HVATUB1 und HVATUB4. Die geringsten Transkriptmengen wies HVATUB5 auf. Die einzelnen Isotypen waren nicht nur unterschiedlich stark im Entwicklungsgradienten vertreten, sondern wiesen auch untereinander verschiedene, für jeden einzelnen Isotypen charakteristische Expressionsmuster auf. Die zusätzlichen diffusen Markierungen im niedermolekularen Bereich, die nach Hybridisierung mit der für den kodierenden Bereich homologen  $\alpha$ -Tubulin-Sonde beobachtet wurden (siehe Abb. 45, Kapitel 3.5.1), könnten ein Hinweis sein auf mögliche Degradationsprodukte von Tubulin-mRNA im Rahmen eines erhöhten turn-over bestimmter Isotypen.

Die Expressionsmuster der fünf Isotypen ließen sich in drei Gruppen unterteilen: Eine Gruppe hatte am meisten Transkript in Blattbereichen, in denen hauptsächlich Mesophyllzellen mit distinkten MT-Bündeln („MT-Band-Isotypen“) auftreten, eine zweite Gruppe hatte die höchste Abundanz in Bereichen mit dem höchsten mitotischen Index („MI<sub>max</sub>-Isotypen“) und die dritte Gruppe wurde bevorzugt exprimiert in älteren Blattregionen, in denen Zellen mit zerstreuten, zufällig angeordneten MT („Random-MT-Isotypen“) auftreten.

**I. MT-Band-Isotypen:** HVATUB1 und HVATUB5 zeigten in meristemnahen Geweben folgendes Expressionsmuster: Nach einem sehr niedrigen Transkriptgehalt in meristematischen Bereichen der Blattbasis wurde ein Maximum in Segment 3 erreicht. In diesem Entwicklungsbereich der Zellstreckung werden in den Mesophyllzellen die distinkten transversalen Mikrotubulibänder ausgebildet (siehe Abb. 59). Zu fordern wären daher Eigenschaften dieser Isotypen, die spezifisch die Bündelung von MT erleichtern oder diese stabilisieren. Unklar bleibt die Bedeutung der Dotplot-Signale von HVATUB5 in älteren Blattbereichen (ab Segment 11). Die Stärke dieser Signale war allerdings weit unter dem Niveau des Maximums, wie auch durch zusätzliche Northernblot-Analysen (Abb. 50, Kapitel 3.5.1.2) bestätigt werden konnte. Eine leicht erhöhte Abundanz cytoskelettaler Transkripte in älterem Blattgewebe konnte bei Gerste schon für Aktin beobachtet werden (MEYER 1994).

**II. MI<sub>max</sub>-Isotypen:** Das Expressionsmuster dieser Gruppe verläuft innerhalb der ersten drei Segmente genau entgegengesetzt zu dem der letzten Gruppe: HVATUB2 und HVATUB4 wurden am stärksten in meristematischen Bereichen der Blattbasis (Segment 1) mit hohem mitotischem Index (MI) exprimiert (siehe Abb. 59) und nehmen wahrscheinlich innerhalb der MT-Muster eher mitose-spezifische Aufgaben wahr. Denkbar wäre ein erhöhtes Vorkommen in den Spindelfasern während der Mitose. Aber auch während der Cytokinese könnten MI<sub>max</sub>-Isotypen innerhalb der MT des Phragmoplasten, der zur Ausbildung der neuen Zellwand beiträgt, spezielle Aufgaben wahrnehmen. Falls die in BYRNE et al. (1993) und GREEN (1993) dargestellten biologischen Halbwertszeiten (etwa 100 min) von Tubulin-mRNA auch für Gerste zuträfen, müßten bei hoher Korrelation zum mitotischen Index der Transkriptgehalt von HVATUB2 und HVATUB4 allerdings noch sehr viel schneller absinken. Wahrscheinlicher als eine Halbwertszeit der Tubulin-Transkripte im Tagesbereich erscheint daher, daß HVATUB2 und HVATUB4 neben mitose- und cytokinesespezifischen Funktionen in geringerem Maße auch Aufgaben in anderen MT-Cytoskelettstrukturen erfüllen.

**III. Random-MT-Isotypen:** HVATUB3 ist der einzige Vertreter dieser Gruppe. Dieser Isotyp wurde als einziger der fünf Isotypen einerseits auf sehr hohem Niveau, andererseits aber bevorzugt in den Blattbereichen jenseits der Zellstreckungszone exprimiert, in denen fast nur noch Mesophyllzellen mit zerstreuten MT vorkommen (Segmente 5 - 9). Auch im basalen Meristem war die Expression gegenüber den folgenden zwei Segmenten leicht erhöht, in den nahezu isodiametrischen Zellen des Meristems sind neben zellteilungsspezifischen MT auch zerstreute MT zu finden. Diese zerstreute MT-Anordnungen sind im kortikalen MT-Netz sich

differenzierender Pflanzenzellen neben anderen Anordnungen fast immer zu finden. Dies würde das hohe Gesamtniveau der Expression erklären helfen.

Die Transkriptmengen der Isotypen entsprechen auch in etwa der Verteilung der cDNA-Klone in den verschiedenen cDNA-Bibliotheken (siehe Tab. 14)

cDNA-Bibliothek	HVATUB1	HVATUB2	HVATUB3	HVATUB4	HVATUB5
Segment 1	7	19	39	1	/
Segment 2	34	8	16	/	1
Blatt „gesamt“	1	28	22	/	/

Tab. 14: Vorkommen der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen der Gerste in den cDNA-Bibliotheken.

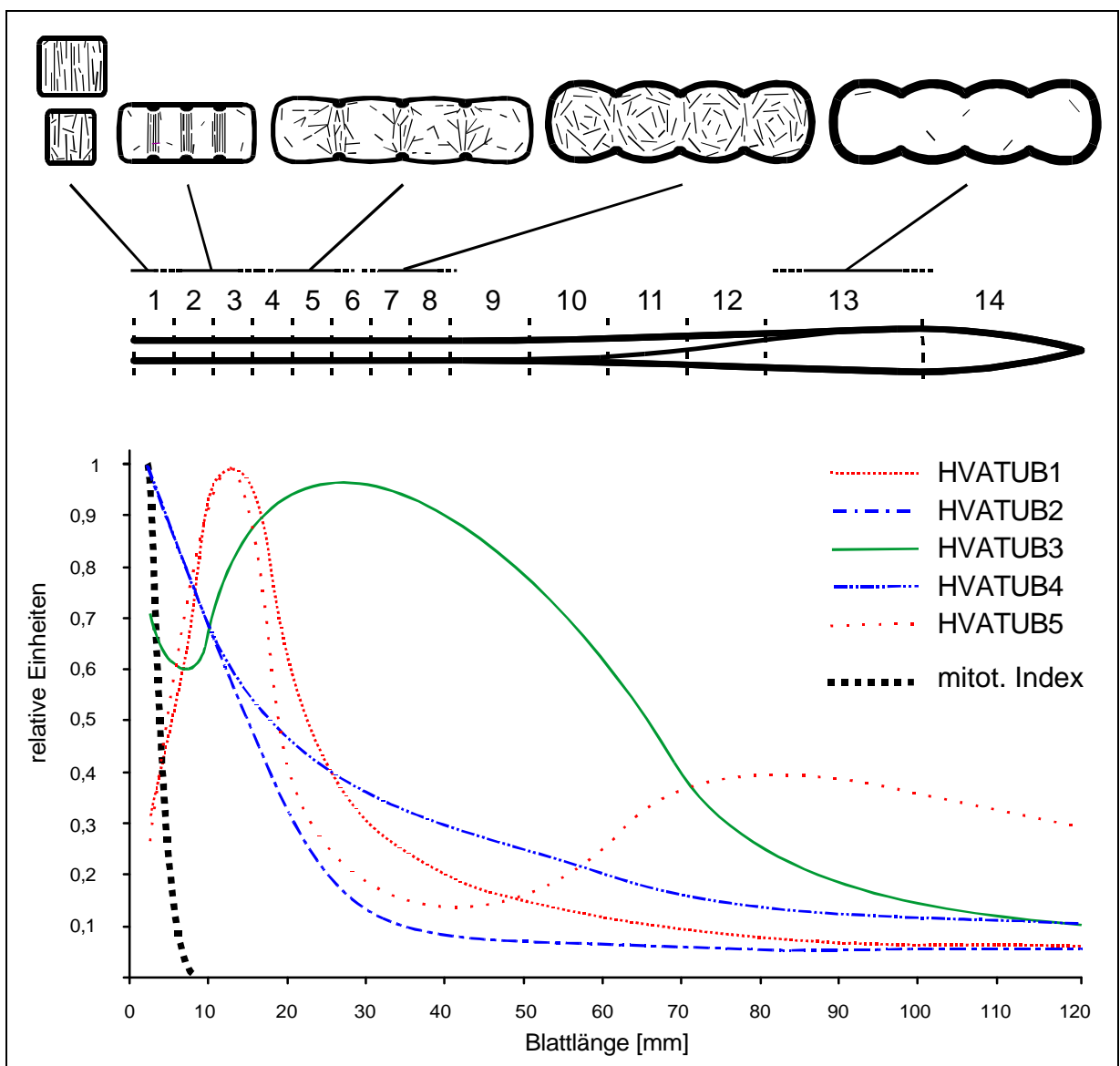


Abb. 59: Vergleich der relativen Transkriptmengen der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen mit den kortikalen MT-Mustern im Entwicklungsgradienten.

Die Maxima der Transkriptmengen der einzelnen Isotypen (siehe Abb. 49, Kapitel 3.5.1.2) und des mitotische Index wurden auf den Wert 1 bezogen.

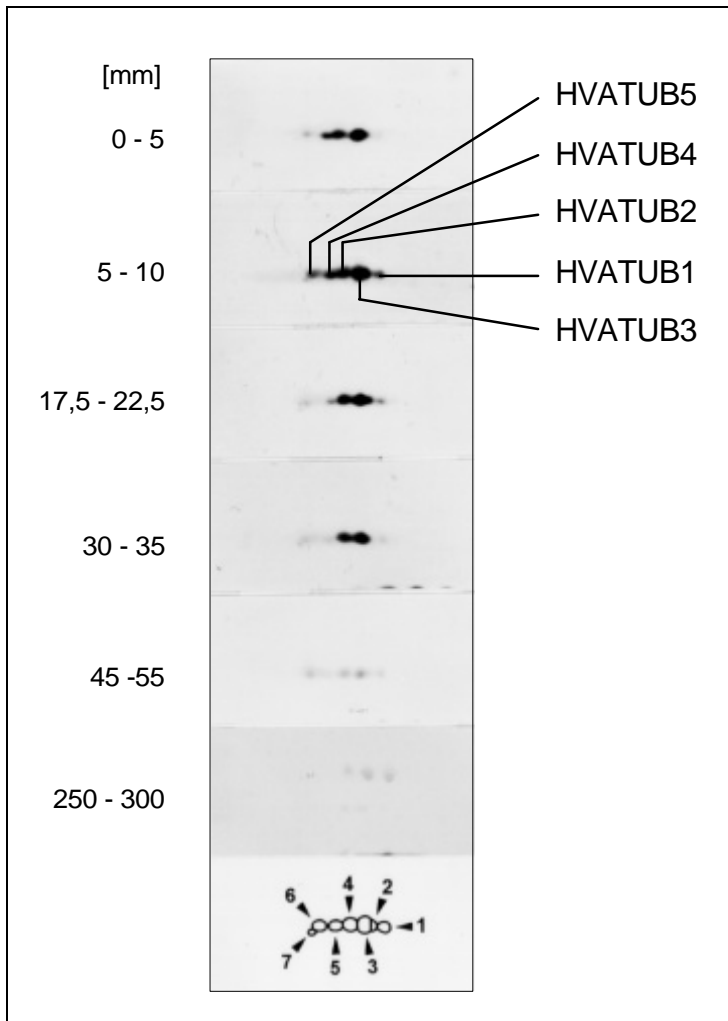
#### 4.1.2 Vergleich der Abundanz der $\alpha$ -Tubulin-Isotypen auf Transkriptionsebene mit Signalen der 2D SDS-PAGE

Auf Proteinebene konnten bisher abhängig vom Entwicklungszustand des Blattes bis zu sieben  $\alpha$ -Tubulin Signale durch zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese mit anschließendem Immunoblot differenziert werden (HELLMANN 1995, HELLMANN & WERNICKE 1998). Die dabei exklusiv auftretenden Signale von Proteinextrakten aus den Segmenten 2 und 3 korrespondierten mit dem Auftauchen distinkter transversaler kortikaler MT-Bänder in den Mesophyllzellen. Allerdings war die Auflösung von sieben Signalen nicht immer reproduzierbar (pers. Mitteilung SEIDEL-GUYENOT, HELLMANN 1995). Bei den folgenden Vergleichen werden deshalb die Signale  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  sowie  $\alpha 6$  und  $\alpha 7$  zusammengefaßt betrachtet (siehe Abb. 60).

Von HVATUB3 war am meisten Transkript über den gesamten Entwicklungsgradienten hinweg vorhanden, die Signale  $\alpha 2/3$  könnten also diesem entsprechen. HVATUB2 und HVATUB4 wiesen die höchsten Transkriptmengen in meristemnahen Blattsegmenten auf, wobei HVATUB4 nicht so stark exprimiert wurde. Diesen Isotypen wären  $\alpha 4$  bzw.  $\alpha 5$  zuzuordnen. Von den beiden letzten unterschieden sich mit genau entgegengesetzter Expression innerhalb der ersten drei Segmente HVATUB1 und HVATUB5, wobei HVATUB5 noch weitaus schwächer auftrat. Jenen Isotypen könnte man die Signale  $\alpha 1$  bzw.  $\alpha 6/7$  zuweisen.

Beim derzeitigen Kenntnisstand ist die dargestellte Zuordnung der Signale auf Proteinebene zu den cDNA Sequenzen anhand der Transkript-Abundanzen die Methode der Wahl. Eine Zuordnung über den berechenbaren Isoelektrischen Punkt erscheint wenig sinnvoll, da noch nicht bei allen Isotypen die vollständige Sequenz bekannt ist. Außerdem kann die Existenz posttranslational modifizierter Isotypen nicht generell ausgeschlossen werden, wodurch auf Proteinebene mehr Signale auftreten können, als unterschiedliche Transkripte vorhanden sind. Bisher konnte jedoch bei Tubulin aus Gerste keine posttranslationelle Modifikation nachgewiesen werden (PIRRUNG 1999).

Eine genauere Zuordnung der 2D SDS-PAGE Signale zu den Isotypen auf cDNA-Ebene ist nur durch weitere Experimente auf Proteinebene möglich, beispielsweise durch die Sequenzierung von Tubulinprotein aus Gerste. Die Immunoblot-Signale könnten durch Mikrosequenzierung der separierten Proteine den Isotypen auf cDNA-Ebene zugeordnet werden.



**Abb. 60: Zuordnung  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen HVATUB1 bis HVATUB5 zu den Signalen der 2D SDS-PAGE (nach HELLMANN 1995).**

Tubulinprotein aus Blattsegmenten des Gerstenblattes wurde nach 2D SDS-PAGE und Westerntransfer mit anti  $\alpha$ -Tubulin Antikörpern (DM-1A) markiert. Die Ziffern der Signale 1 - 7 entsprechen **nicht** den Isotypen auf cDNA-Ebene.

Eine weitere Möglichkeit zur Einordnung von Westernblot-Signalen zu bestimmten Isotypen würde die *in vitro*-Transkription und anschließende Translation auf Basis vollständiger cDNA-Klone bieten. Beispielsweise könnte etwa im Retikulozytenlysat-System mit gleichzeitiger Gabe von [ $^{35}$ S]-Methionin zum Translationsansatz das so hergestellte Protein zusammen mit Pflanzenextrakt in der 2D-SDS PAGE aufgetrennt und nach Immunoblotting dem entsprechenden Isotyp über Autoradiographie zugeordnet werden. Dies wäre eine weitere Möglichkeit, genauere Zuordnungen zwischen Immunoblot-Signalen und Isotypen auf cDNA-Ebene zu erreichen.

Vor dem Hintergrund der nicht immer reproduzierbaren Auftrennung von sieben Signalen auf Westernblot-Ebene kann mit einiger Sicherheit davon ausgegangen werden, daß eher fünf als sieben Isotypen von  $\alpha$ -Tubulin vorliegen, zumal die Ergebnisse der Southernblot-Untersuchungen auch in eine ähnliche Richtung weisen. Somit liegt der Umfang der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen in der für die höheren Pflanzen üblichen Bandbreite von vier bis sieben Isotypen.

### 4.1.3 Für die Antikörperherstellung geeignete Sequenzmotive

Mit den vorliegenden Sequenzinformationen können nicht nur isotypspezifische DNA-Sonden hergestellt werden, es ist auch möglich, mittels abgeleiteter AS-Sequenzen Peptide zur Antikörperherstellung zu gewinnen. Auf diese Weise wären weiterführende Immunoblot- oder immuncytologische Untersuchungen möglich.

Unterschiedliche Assemblierungseigenschaften und/oder Resistenz gegen MT-depolymerisierende Inhibitoren bei verschiedenen Tubulin-Isotypen wurden bereits vielfach beschrieben (BORCK & BRAYMER 1974, THOMAS et al. 1985, JOSHI et al. 1987, LI et al. 1996, YAMAMOTO et al. 1998). In diesem Zusammenhang ist es bedeutsam, daß insbesondere der C-Terminus der Tubulinmonomere eine wichtige Rolle bei MT-Depolymerisation spielt, wie aus *in vitro*-Experimenten bekannt ist (BOKROS et al. 1996). Da sich die Tubulin-Isotypen der Gersten-Sequenzen im hypervariablen Bereich des C-Terminus auffällig in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden, ist auch anzunehmen, daß Unterschiede hinsichtlich ihrer Assemblierungseigenschaften bestehen. Gerade die isotypspezifischen Unterschiede in diesen Sequenzbereichen würden zugleich eine hervorragende Möglichkeit bieten, isotypspezifische Antikörper über synthetische Peptide herzustellen. Da der C-Terminus zudem nicht nur an der Oberfläche des Monomers, sondern auch im MT an der Außenseite exponiert ist (WEHLAND et al. 1984, BREITLING & LITTLE 1986, SMERTENKO et al. 1997), sind proteinbiochemische und immuncytologische Untersuchungen gleichermaßen möglich.

GODDARD et al. (1998) beschrieben bereits die Herstellung isotypspezifischer polyklonaler Antikörper gegen Tubulin aus Mais (anti- $\alpha$ -1-tubulin und anti- $\alpha$ -5-tubulin), die erfolgreich eingesetzt werden konnten (EUN & WICK 1998). Die Sequenzen der dafür eingesetzten Peptide wurden aus einem 11 bis 13 AS langem Motiv des hypervariablen C-Terminus abgeleitet. Die aus den cDNA Sequenzen abgeleiteten AS-Sequenzen von HVATUB3 und HVATUB1 aus der Gerste sind vollständig identisch zu ZMALTUB1 bzw. ZMALTUB5 aus Mais (siehe Abb. 61). Deshalb könnten die nach GODDARD et al. (1998) hergestellten Antikörper auch für proteinbiochemische oder immuncytologische Untersuchungen bei Gerste eingesetzt werden. Für die Isotypen HVATUB2, HVATUB4 und HVATUB5 müßten allerdings noch isotypspezifische Antikörper hergestellt werden, da deren Sequenzmotive aus dem hypervariablen C-Terminus nicht mit denen aus Mais übereinstimmen.

HVATUB2	FDDGEDGDEGDEY
HVATUB3	FDEGEDGDEGDEY
ZMALTUB1	FDEGEDGDEGDEY
HVATUB4	GGDDEDGEEDDDY
HVATUB1	GADDE-GDEGDDY
ZMALTUB5	GADDE-GDEGDDY
HVATUB5	GED--DDDEVDEY

**Abb. 61: Gegenüberstellung der für eine Peptidsynthese (GODDARD et al. 1998) relevanten AS-Sequenz des hypervariablen Bereiches des  $\alpha$ -Tubulins aus Gerste und Mais.**

In allen Sequenzen übereinstimmende Positionen sind schattiert, von HVATUB2 abweichende Positionen fett unterlegt, durch das alignment bedingt Lücken sind durch Striche gekennzeichnet. Bei Mais und Gerste übereinstimmende Sequenzen sind umrahmt.

#### 4.1.4 Funktionelle Bedeutung der entwicklungspezifischen Expression von Tubulin-Isotypen

Über einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Auftreten bestimmter Isotypen und dem Entwicklungszustand des jeweiligen pflanzlichen Gewebes ist bisher wenig bekannt. Erst seit kurzem gibt es im tierischen System Hinweise über die Unersetzlichkeit bestimmter Isotypen bezüglich ihrer Funktion. HUTCHENS et al. (1997) beschreiben, daß bei der Spermatogenese transgener *Drosophila* ein Austausch eines  $\alpha$ -Tubulin-Isotyps durch einen sehr ähnlichen Isotyp zu männlicher Sterilität führt. Derartige Experimente wurden bei Pflanzen bisher noch nicht durchgeführt. Erste Experimente mit transgenen Pflanzen wurden bisher nur im Zusammenhang mit der Aktivität von Tubulin-Promotoren bei der Zellentwicklung beschrieben (URIBE et al. 1998). Zum jetzigen Zeitpunkt scheinen daher nur indirekte Hinweise auf funktionelle Zusammenhänge mit der Expression bestimmter Tubulin-Isotypen bei Pflanzen denkbar.

Eine Möglichkeit stellt die Suche nach Anhaltspunkten für spezieübergreifende isotypspezifische funktionelle Gemeinsamkeiten bei Mais und Gerste dar. Im folgenden sollen die Befunde der Expressionsstudien aus Mais mit denen der vorliegenden Arbeit verglichen werden, da bezüglich monokotyler Pflanzen nur bei Mais ähnlich umfangreiche Daten über Tubulin vorliegen. Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen stimmen allerdings nur teilweise überein und immunologische Daten innerhalb eines Entwicklungsgradienten sind bei Mais kaum vorhanden.

##### **Hinweise auf funktionelle Isotypspezifische Gemeinsamkeiten bei Gerste und Mais:**

Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Expressionsanalysen der vorliegenden Arbeit ist nur möglich, wenn gemeinsame Anhaltspunkte beider Spezies für eine Funktion existieren. Am ehesten ist das Maß der Teilungsaktivität des untersuchten Gewebes als gemeinsamer

funktioneller „Marker“ geeignet: Die relative Transkriptmenge von ZMALTUB3, ZMALTUB1 und ZMALTUB2 aus Mais ist am höchsten in teilungsaktiven Geweben von Embryonen (MONTOLIU et al. 1990a) und meristematischen Wurzelgewebe (JOYCE et al. 1992, Fig. 3, S. 102). Bei Gerste weisen HVATUB2 und HVATUB4 die höchsten Transkriptmengen im basalen Meristem des Blattes auf. Dies könnte ein Hinweis auf über Artgrenzen hinausgehende funktionelle Gemeinsamkeit von Isotypen bezüglich mitose- oder zellteilungsspezifischer Aufgaben sein, zumal die genannten Tubulin-Gene der Gerste auch alle der selben Gruppe der  $\alpha$ -Tubulin-Gene zugehören (siehe Kapitel 4.5.1). Da allerdings keine umfangreichen parallelen cytologischen Daten zu diesen Untersuchungen aus Mais vorliegen, sind weitergehende Interpretationen bezüglich möglicher cytoskelettaler Korrelationen nicht möglich.

Das Auftreten der anderen Isotypen aus Gerste, die mit MT-Bändern oder MT zerstreuter Anordnung korrelieren, kann hingegen nicht sinnvoll mit den Befunden aus Mais verglichen werden. Die Untersuchungen bei Mais (MONTOLIU et al. 1990a, JOYCE et al. 1992) beziehen sich nicht auf einen Entwicklungsgradienten innerhalb eines Organs, sondern auf unterschiedliche Organe oder Gewebetypen, außerdem fehlen parallele cytologische Studien. Neuere *in situ* Hybridisierungsexperimente bei Wurzelspitzen von Mais zeigen zwar Expressionsmuster eines Leitbündel-spezifischen  $\alpha$ -Tubulin-Transkripts gegenüber eines eher im Meristem aktiven (URIBE et al. 1998). Allerdings können auch hier wegen fehlender immunocytologischer Untersuchungen keine Zusammenhänge zu den mikrotubulären Cytoskelettstrukturen hergestellt werden.

## 4.2 Genexpression von $\gamma$ -Tubulin

Bei Säugetieren ist das  $\gamma$ -Tubulin bekannt als Bestandteil Mikrotubuli-organisierender Zentren (MTOCs), die strukturell an Centriolen gebunden sind (BURNS 1995). In Landpflanzen sind strukturell gut definierte MTOCs nur in Farnen und Gymnospermen, die begeißelte Schwärmerstadien (in Form von Blepharoplasten oder ähnlichen Strukturen) ausbilden, vorhanden. Angiospermen hingegen weisen ein nicht scharf umgrenztes sogenanntes Centroplasma auf, von dem die Nukleation der Spindelfasern ausgeht. Bei Pflanzen sind Nukleation und Organisation von MT oft an Membransysteme wie die Kernmembran, das Plasmalemma oder das glatte Endoplasmatische Reticulum gekoppelt (LIU et al. 1993, VAUGHN & HARPER 1998).

Abgesehen von Mitose- und Cytokinesevorgängen muß auch in anderen Stadien des Zellzyklus die Reorganisation des Cytoskeletts gewährleistet sein. Im Zusammenhang mit der Umgestaltung des pflanzlichen MT-Cytoskeletts im Zellkortex wird ebenfalls das  $\gamma$ -Tubulin als organisierender Faktor diskutiert (McDONALD et al. 1993). Immunfluoreszenz-Studien zeigen zerstreut-punktierte Markierungen im Präprophaseband (LIU et al. 1993, LIU et al. 1994). Immunzytologische Untersuchungen belegen ferner eine Lokalisation von  $\gamma$ -Tubulin nicht nur am Minus-Ende von MT-Bündeln, sondern auch in zerstreuter Anordnung längs der MT-Bündel (JOSHI & PALEVITZ 1996, VAUGHN & HARPER 1998). Es wird vermutet, daß bei MT-Bündeln nicht nur am Minus-Ende ringartige Initiator-Komplexe aus 13  $\gamma$ -Tubulin-Monomeren (OAKLEY 1995, RAFF 1996) positioniert sind, sondern daß diese auch innerhalb der pflanzlichen MT-Bündel vorliegen, um ein schnelleres und flexibleres Reagieren innerhalb mikrotubulärer Reorganisationsprozesse zu erleichtern (VAUGHN & HARPER 1998). Möglicherweise wird die Umgestaltung des kortikalen MT-Cytoskeletts auch bei postmitotischen Mesophyllzellen der Gerste auf diese Weise durch  $\gamma$ -Tubulin räumlich mitorganisiert.

#### **4.2.1 Vorkommen von $\gamma$ -Tubulin-Transkript außerhalb des basalen Meristems**

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob beim Auftreten neuer MT-Muster innerhalb der Mesophyllzellen ein Zusammenhang mit der Transkription von  $\gamma$ -Tubulin besteht. Da die Expression von  $\gamma$ -Tubulin bekanntermaßen parallel zu mitotischen Vorgängen stattfindet, wurde der mitotische Index entlang des Entwicklungsgradienten des Blattes bestimmt. Unterschiede zwischen dem Degressionsverlauf des mitotischem Index und dem Degressionsverlauf des  $\gamma$ -Tubulin-Signals sollten so einen Hinweis auf die  $\gamma$ -Tubulin-Abundanz außerhalb der Zellteilung geben.

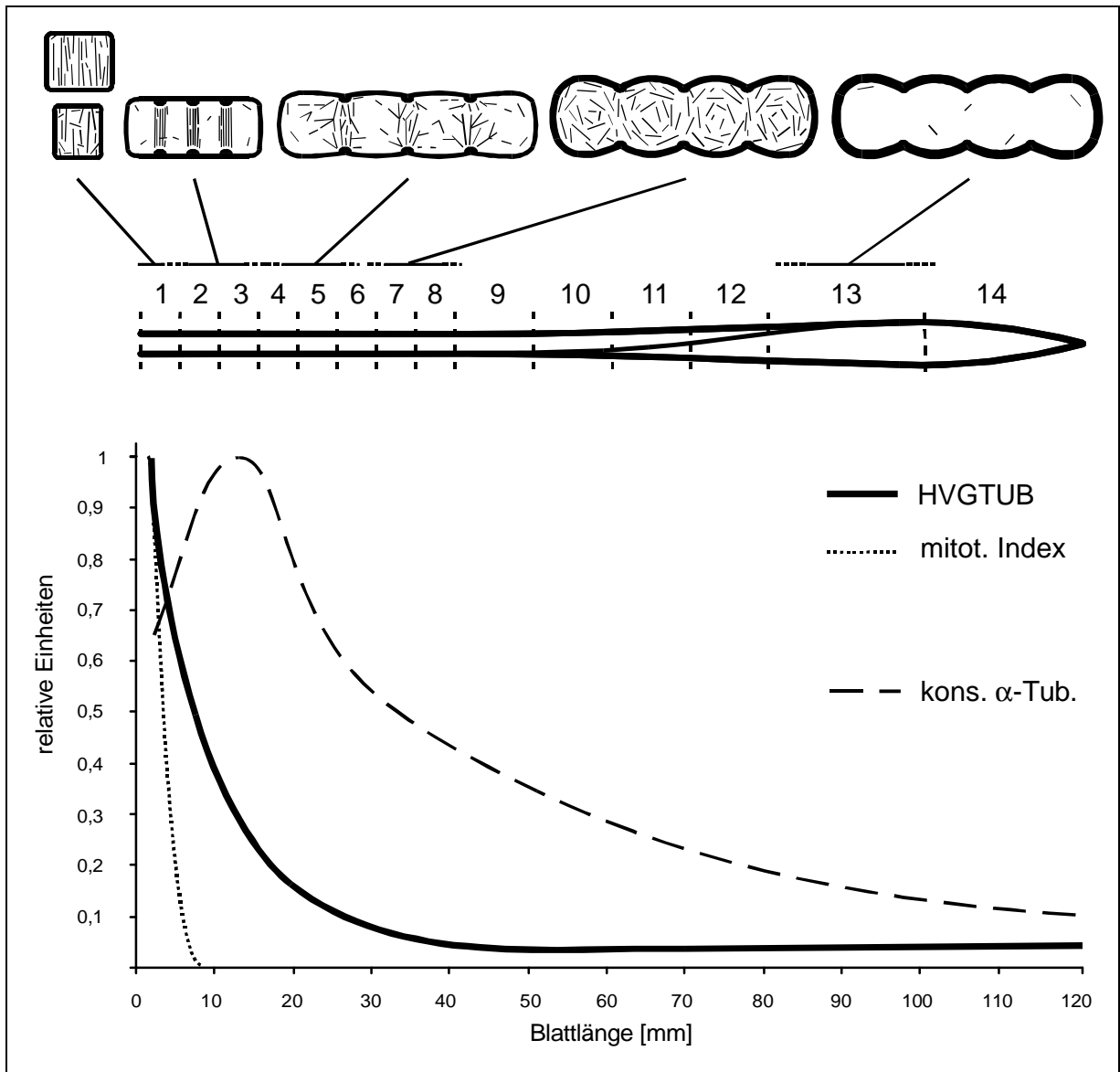
Innerhalb der ersten drei Millimeter des ersten Segments war der Mitotische Index (MI) am höchsten, bereits im Verlauf von Segment 2 sank der MI auf den Wert Null (siehe Abb. 62). Die Transkriptmenge in diesem Segment betrug jedoch noch die Hälfte des Maximalwertes. Im Segment 3 konnten keinerlei Mitosestadien mehr nachgewiesen werden, die relative Transkriptmenge von  $\gamma$ -Tubulin lag aber immer noch bei 38 % des Maximums.

Eine Erklärung für die auffällige Diskrepanz in der Degressionsgeschwindigkeit zwischen MI und Abundanz von  $\gamma$ -Tubulin-RNA böte die biologische Halbwertszeit dieses Transkripts. Die wachstumsbedingte Translokation meristematischer, mitotisch aktiver Zellen von der

Blattbasis bis zum Segment 2 dauert sieben bis 14 h bei einer Wachstumsgeschwindigkeit von 0,7 mm/h (MEYER 1994). Halbwertszeiten für pflanzliche mRNA werden zumeist im Stundenbereich angegeben (JOHNSON et al. 1998, GUTIÉRREZ et al. 1999), die für Tubulin-mRNA werden meist in Minuten, seltener in Stunden (BYRNE et al. 1993). Nach GREEN (1993) beträgt die Halbwertszeit pflanzlicher  $\beta$ -Tubulintranskripte etwa 100 min. Geht man von einer durchschnittlichen Translokationszeit von 10 h aus, so dürfte im Segment 2 nur noch ca. 1,6 % der ursprünglichen Transkriptmenge vorhanden sein, unter der Annahme, daß  $\gamma$ -Tubulin- und  $\beta$ -Tubulin-Transkripte eine ähnliche Halbwertszeit besitzen. Wenn  $\gamma$ -Tubulin ausschließlich in meristematischen Bereichen exprimiert würde, sollte in Segment 2 und 3 kein  $\gamma$ -Tubulin-Transkript mehr nachweisbar sein.

Die Gründe der hohen Abundanz von  $\gamma$ -Tubulin-Transkript in den Segmenten 2 und 3 sind also eher in Vorgängen zu suchen, die nicht mitose- oder cytokineseabhängig sind. Dies spricht dafür, daß  $\gamma$ -Tubulin neben zellteilungsspezifischen Aufgaben wie Initiierung von Spindelfasern noch weitere Funktionen erfüllt, die im Zusammenhang mit der Reorganisation des mikrotubulären kortikalen Cytoskeletts stehen. So könnte  $\gamma$ -Tubulin verantwortlich sein für die Initiierung der bandartig organisierten kortikalen MT der Mesophyllzellen im Segment 2 und 3. Erste Hinweise lassen vermuten, daß auch bei anderen Pflanzen außerhalb von Mitose- und Cytokineseaktivität  $\gamma$ -Tubulin-Transkript vorliegt (KAUTZ 1999).

Allgemein weist pflanzliches  $\gamma$ -Tubulin eher im C-Terminus auffällige Sequenzunterschiede gegenüber tierischem  $\gamma$ -Tubulin auf (siehe Abb. 44, Kapitel 3.4.8). Es wird angenommen, daß tierisches  $\gamma$ -Tubulin über den C-Terminus mit anderen centrosomalen Proteinen interagiert (BURNS 1995). Die Nukleation der Mikrotubuli von Angiospermen wird dagegen nicht über Centriolen gesteuert. Dies könnte ein weiterer Anhaltspunkt dafür sein, daß Sequenzunterschiede in dieser Region auch funktionelle Bedeutung haben, insbesondere im Hinblick auf die mögliche Beteiligung von  $\gamma$ -Tubulin an der Initiation kortikaler Mikrotubuli bei Pflanzen.



**Abb. 62:** Vergleich der relativen Transkriptmengen von  $\gamma$ -Tubulin und  $\alpha$ -Tubulin mit den kortikalen Mustern der Mikrotubuli im Entwicklungsgradienten des Blattes.

Die Maxima der Transkriptmengen und des mitotischen Index wurden auf den Wert 1 bezogen. Die  $\gamma$ -Tubulin-Abundanz wurde mit der  $\alpha$ -Tubulin-Abundanz (Sonde konserv.  $\alpha$ -Tubulin, Abb. 49, Kapitel 3.5.1.2) verglichen.

#### 4.2.2 Zur Antikörperherstellung geeignete Sequenzmotive

Bei  $\gamma$ -Tubulin liegt die Homologie auf Proteinebene zwischen der Sequenz aus Gerste und der aus Mensch nur noch bei 75 % und nicht bei 83 % wie zwischen  $\alpha$ -Tubulin aus Maus (MUSTUBA2M) und Gerste (HVATUB1). Dies könnte die Wahrscheinlichkeit einer Antikörperbindung aufgrund weniger gut passender Epitope verringern, weshalb bei einem Nachweis von pflanzlichem  $\gamma$ -Tubulin-Protein die gegen tierisches Protein gerichteten Antikörper als weniger gut geeignet erscheinen.

Obwohl mit gegen menschliches  $\gamma$ -Tubulin gerichteten Antikörpern (JOSHI et al. 1992) bereits pflanzliches  $\gamma$ -Tubulin bei *Allium cepa* und *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen wurde (McDONALD 1993, LIU et al. 1994), konnte mit diesem Antikörper bei Gerstenprotein keine eindeutige Markierung erreicht werden. Sowohl immunocytoologische als auch Westernblot-Experimente wurden durchgeführt (ZUKOWSKI 1994). Allerdings konnten in den Immunoblots keine distinkten Banden bei Gersten-Gesamtprotein detektiert werden. In den Mesophyllzellen der Gerste zeigte sich in Interphase-Zellen perinucleäre Fluoreszenz, bei Anaphase-Zellen war die Fluoreszenz auf die Spindelpole beschränkt. Möglicherweise ließen sich eindeutigere Ergebnisse erreichen, wenn zur Antikörperherstellung ein aus pflanzlichen Sequenzen abgeleitetes Peptid verwendet würde, da sich pflanzliche und tierische Epitope dieses Bereichs in drei AS unterscheiden.

Neuere Arbeiten zeigen, daß sowohl mit Antikörpern, die gegen die AS-Sequenzmotive der Positionen 38 - 53 aus *Arabidopsis thaliana*  $\gamma$ -Tubulin (MARC 1997) bzw. gegen die Motive 35-50 aus *Chlamydomonas reinhardtii* (SILFLOW et al. 1999) gerichtet sind,  $\gamma$ -Tubulin detektiert werden konnte. Diese Sequenzbereiche liegen innerhalb eines konservierten, N-terminalen Motivs. Gegen Proteinbereiche des C-Terminus (Positionen 368 - 383) gerichtete Antikörper wurden ebenfalls bei *Chlamydomonas* erfolgreich eingesetzt (SILFLOW et al. 1999). Sollen die selben Antikörper auch für Untersuchungen bei unterschiedlichen Spezies eingesetzt werden, erscheinen indes noch weiter im C-Terminus gelegene Bereiche als wenig sinnvoll, da die Sequenzunterschiede zwischen den Arten zunehmen. Dennoch wurden auch bei immunocytoologischen Untersuchungen an Angiospermen monoklonale Antikörper eingesetzt, die gegen Peptide an den Positionen 434 - 449 aus menschlichem  $\gamma$ -Tubulin gerichtet waren (BINAROVA et al. 1998). In diesem Bereich stimmen zwischen pflanzlichen und menschlichem  $\gamma$ -Tubulin von 16 AS nur neun überein, was den sinnvollen Einsatz dieses Antikörpers im pflanzlichen System grundsätzlich in Frage stellt.

Für die Antikörperherstellung wäre das C-terminale Motiv 368 - 383 aus *Chlamydomonas* (SILFLOW 1999) geeignet, allerdings sollte wegen der Sequenzabweichung in zwei Positionen die entsprechende Sequenz aus Gerste herangezogen werden. Es könnte aber auch wie in MARC (1997) bei *Arabidopsis* (s.o.) verfahren werden, da die N-terminale Sequenz „EDFATQGGDRKDVFFY“ aus *A. thaliana* vollständig homolog zum entsprechenden Sequenzbereich aus Gerste ist.

### 4.3 Multiple Polyadenylierung

Bei vier von neun in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tubulin-Isotypen der Gerste traten im nicht kodierenden 3'-Bereich unterschiedlich lange Varianten auf, so etwa bei HVATUB2 bis zu sechs Formen unterschiedlicher Länge. Obwohl nicht generell ausgeschlossen werden kann, daß die verkürzten Formen das Resultat von Sekundärstrukturen bei der cDNA-Synthese sind, lassen die umfangreichen Daten aus der Literatur (siehe unten) darauf schließen, daß tatsächlich Transkripte des selben Gens mit unterschiedlich langem nicht kodierenden 3'-Bereich möglich sind.

Bei pflanzlicher mRNA ist das Vorkommen mehrerer Polyadenylierungsstarts weit verbreitet (WU et al. 1995). Bei verschiedenen pflanzlichen Genen kommen bis zu 14 unterschiedliche Möglichkeiten zur Polyadenylierung vor (DEAN et al. 1986, KLAHRE et al. 1995). Auch bei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Transkripten aus Mais sind Varianten mit multipler Polyadenylierung beschrieben worden (MONTOLIU et al. 1990b, ROGERS et al. 1993). Besondere Sequenzmotive im nicht kodierenden 3'-Bereich beeinflussen den Start der Polyadenylierung: Es lassen sich nach HUNT (1994) „Near Upstream Elements“ (NUEs) von „Far Upstream Elements“ (FUEs) abgrenzen, die gemeinsam den Ort der Polyadenylierung bestimmen sollen (MacDONALD et al. 1991, ROTHNIE et al. 1994, WU et al. 1995, HUNT & MESSING 1998).

#### **Near Upstream Elements:**

Eine typisches in fast allen tierischen Sequenzen gefundenes NUE stellt die Basenfolge AAUAAA dar, die sechs bis 40 Basen stromaufwärts der Polyadenylierungsstelle liegt (PROUDFOOT & BROWNLEE 1976). Bei Pflanzen ist diese Sequenzfolge allerdings nicht hoch konserviert (MOGEN et al. 1990, HUNT & MESSING 1998) oder fehlt vollständig (LI & HUNT 1995). So besitzen nur 1/3 aller untersuchten pflanzlichen cDNA-Sequenzen das vollständige Element, während etwa die Hälfte Varianten enthalten, in denen nur vier bis fünf der sechs Basen übereinstimmen (JOSHI 1987). Im Gegensatz zum tierischen System können sogar an fast beliebiger Stelle des „klassischen“ NUE-Motivs AAUAAA experimentell Nukleotidsubstitutionen gesetzt werden, die ohne nennenswerten Einfluß auf die Prozessierung des 3'-Ende bleiben. (BIRNSTIEL et al. 1985, WU et al. 1995, ROTHNIE 1996).

#### **Far Upstream Elements:**

FUE-Elemente, die bei Säugetieren nicht vorkommen, liegen in größerer Entfernung stromaufwärts der Polyadenylierungsstelle. Im Gegensatz zu den NUEs scheinen sie eher

einen Bereich mehrerer möglicher Polyadenylierungsstarts 40 bis 160 Basen stromabwärts festzulegen. Für FUEs des *rbcS*-Gens der Erbse sind charakteristische Basenfolgen z.B. UAUUUGUA oder UUGUA (MOGEN 1992). Es werden außerdem weitere Motive (UUUGUA, UGUGUUUUU und UGUUGUG) für Pflanzen diskutiert (ROTHNIE 1996).

Aufgrund dieser Variabilität zwischen verschiedenen FUEs wird allgemein UG-reichen Sequenzen im nicht kodierenden 3'-Bereich diese Rolle zugesprochen (HUNT 1994, HUNT & MESSING 1998).

In den bisher bekannten Tubulin-Sequenzen der Gerste ist das klassische NUE-Motiv AAUAAA kurz vor dem Polyadenylierungsstart nur bei HVGTUB vorhanden (siehe Abb. 43, Kapitel 3.4.6), dort allerdings zweimal kurz hintereinander. Das leicht abweichende Motiv AATGAA (WU et al. 1993, WU et al. 1994) findet sich nur bei HVATUB5 (siehe Abb. 24, Kapitel 3.2.6.5) und HVGTUB. Wenn allerdings im Sinne JOSHI (1987) auch noch stärker abweichende Motive zugelassen werden, können auch bei den übrigen Sequenzen NUE-Polyadenylierungssignale definiert werden (nicht gezeigt).

Die bisher bekannten Tubulin-Sequenzen der Gerste weisen eher typische FUE-Sequenzfolgen wie (T)TTGTA auf, die sich in der Regel 40 bis 160 bp stromaufwärts des poly(A)-Bereiches befinden (siehe die Kapitel 3.2.6, 3.3.3 und 3.4.6). Ausnahmen sind HVATUB1 und HVGTUB. Bei HVATUB5 tritt dieses Motiv ebenfalls auf, allerdings an für FUEs untypischer Stelle neun bp unmittelbar vor dem Polyadenylierungsstart. Alle bisher beschriebenen  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Tubulin-Isotypen der Gerste weisen hingegen UG-reiche Sequenzen 40 bis 160 bp stromaufwärts des Polyadenylierungsstarts im Sinne von HUNT (1994) auf.

Die in dieser Arbeit beschriebenen cDNA-Sequenzen der Gerste besitzen keine konservierten Signalsequenzen für Polyadenylierungsstarts, die allen Tubulin-Sequenzen gemeinsam sind. Nur die UG-reichen FUE-Sequenzen lassen sich bei allen Tubulin-Sequenzen der Gerste finden. Dies bestätigt die Beobachtung, daß bei pflanzlichen Transkripten weniger genau definierte Motive als Signalsequenzen für die Polyadenylierung genutzt werden.

### 4.3.1 Die Bedeutung multipler Polyadenylierungen

Ein Großteil der mRNA wird als heterogene Kern-RNA (hnRNA) nach dem Spleißen im Zuge ihrer Reifung vor dem Export in das Cytoplasma an definierter Stelle polyadenyliert. Im Gegensatz zur mRNA aus Säugetieren können pflanzliche mRNAs zumeist an unterschiedlichen Stellen des nicht kodierendem 3'-Bereichs polyadenyliert werden

(WU et al. 1995). Neuere Arbeiten weisen jedoch auf multiple funktionelle Polyadenylierungssignale auch in Säugetier-Transkripten hin (PENHOAT et al. 1997, HUNT & MESSING 1998). Obwohl Untersuchungen über die Rolle des nicht kodierenden 3'-Bereichs in Bezug auf Transkriptionstermination und mRNA-Export aus dem Kern (WU et al. 1995) durchgeführt wurden, gibt es noch wenig Hinweise auf die Bedeutung der multiplen Polyadenylierung für die Expression eines bestimmten Gens. INGELBRECHT et al. (1989) untersuchten die Expression über Reportergene mit Deletionsmutationen im 3'-Bereich und stellten fest, daß verkürzte 3'-Enden die Genexpression vermindern können. Allgemein wird angenommen, daß durch Länge und Sequenzunterschiede des nicht kodierenden 3'-Bereichs die Stabilität der mRNA und somit die Translationseffizienz mitbestimmt wird (GALLIE 1993, GUTIÉRREZ et al. 1999).

#### **4.3.2 Expression von Polyadenylierungsvarianten des Tubulin**

Bei monokotylen Pflanzen wurden außer bei Gerste bisher nur bei Mais cDNA-Sequenzen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin mit unterschiedlich langem nicht kodierenden 3'-Bereich isoliert (MONTOLIU et al. 1990b, ROGERS et al. 1993). Expressionsanalysen weisen darauf hin, daß eine kürzere Variante von ZMALTUB1 aus Mais bevorzugt in meristematischen Geweben exprimiert wird (MONTOLIU et al. 1990b). Bei Gerste traten hauptsächlich in der cDNA-Bibliothek „Segment 1“ verkürzte Varianten von HVATUB2 auf. Dies könnte als erster Hinweis angesehen werden, daß auch bei der Gerste eine bevorzugte Expression der kürzeren Variante eines  $\alpha$ -Tubulin-Isotyps in teilungsaktivem Gewebe stattfindet.

Hingegen sind bei pflanzlichem  $\gamma$ -Tubulin noch keine Polyadenylierungsvarianten bekannt. Die zwei in der vorliegenden Arbeit beschriebenen im nicht kodierenden 3'-Bereich unterschiedlich langen Varianten von HVGTUB könnten das Produkt multipler Polyadenylierungsformen darstellen, die auch differenziell exprimiert werden. Erste Northernblot-Analysen erbrachten jedoch keinen auffälligen Unterschied in der Degression der Transkriptmengen beider Varianten. Vielmehr veränderten sich die relativen Transkriptgehalte beider Varianten in dem Maße, wie es auch mit der Sonde aus dem kodierenden Bereich nachgewiesen werden konnte. Genauere Aussagen wären mit DNA-Sonden gleicher spezifischer Aktivität möglich. Die Signalintensitäten aus den Hybridisierungen mit beiden Sonden könnten dann durch Subtraktion Hinweise auf Mengenunterschiede beider RNA-Spezies geben. Der Nachweis einer im 3'-Bereich kürzeren Variante auf RNA-Ebene könnte zusätzlich durch einen Endonuklease S1-Protektions Assay oder quantitative RT-PCR erfolgen.

#### **4.4 Schnellere Identifizierung nah verwandten Isotypen mittels PCR-Technik**

Aus den proteinbiochemischen Daten der Arbeitsgruppe und den Verhältnissen bei anderen Pflanzenspezies ist zu schließen, daß die Multigenfamilie des  $\beta$ -Tubulin noch umfangreicher ist als die des  $\alpha$ -Tubulin. Bei *Arabidopsis thaliana* sind neun exprimierte Isotypen bekannt (SNUTSTAD et al. 1992), bei *Zea mays* wurden acht Isotypen (VILLEMUR et al. 1994) beschrieben.

Die in dieser Arbeit etablierte Methode der Ausschließung schon bekannter Isotypen mittels PCR in der ersten Screeningrunde stellt bereits einen großen Fortschritt gegenüber herkömmlichen cDNA-Bibliothek-Screenings dar. Ein schnellerer Zugang zu nah verwandten cDNA-Sequenzen wäre dennoch wünschenswert. Eine Möglichkeit dazu würde die von FAGOTTI et al. (1998) entwickelte „Multiple isoform recovery (MIR)-PCR“ bieten. Diese Methode basiert auf der Kombination der RACE (rapid amplification of cDNA ends)-Technik mit der Herstellung subtraktiver cDNA-Bibliotheken. Über sukzessive Subtraktionen der am häufigsten vorkommenden Isotypen werden die weniger stark exprimierten Isotypen angereichert. Die Anreicherung wird dadurch erreicht, daß die cDNA schon bekannter Isotypen mittels isotypspezifischer biotinylierter Primer durch eine Streptavidin-Affinitäts Chromatographie zurückgehalten wird und von der weiteren cDNA-Prozessierung ausgeschlossen wird.

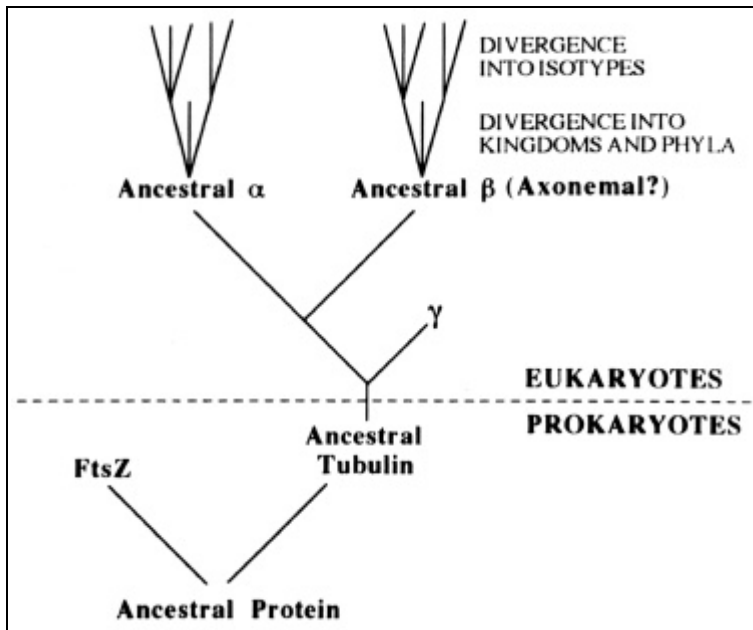
Da in der vorliegenden Arbeit schon drei  $\beta$ -Tubulin-Isotypen aus Gerste isoliert werden konnten, wäre sogar eine Zusammenfassung mehrerer Subtraktionsschritte auf einen denkbar. Nachteilig ist, daß mit dieser Methode nur Teilsequenzen zu isolieren sind. Wird die Technik indes so modifiziert, daß insbesondere die nicht kodierenden 3'-Regionen amplifiziert werden, wären auch mit Teilsequenzen schon isotypspezifische Genexpressionsstudien möglich.

## 4.5 Phylogenetische Analysen

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen den Tubulinklassen zeigt, daß  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin zu 36 - 42 % übereinstimmen,  $\gamma$ -Tubulin hat zu beiden nur noch eine Übereinstimmung von 28 - 35% (BURNS 1991), woraus die Annahme folgt, daß in der Evolution  $\gamma$ -Tubulin zuerst divergierte (LITTLE & SEEHAUS 1988, OAKLEY 1994). Da die drei Tubulinklassen bei allen Eukaryonten vorkommen, kann angenommen werden, daß die Auftrennung in drei Tubulinklassen aus einem unbekanntem Vorläuferprotein (siehe Abb. 63) der Aufspaltung der eukaryontischen Organismen vorausging (LUDUEÑA 1998).

Seit einiger Zeit mehren sich auch Hinweise auf ein „prokaryontisches Tubulin“, eine bakterielle GTPase (*FtsZ*), die im N-Terminus gewisse Ähnlichkeit zu Tubulin aufweist, zu Protofilamenten assemblieren kann, wie  $\gamma$ -Tubulin ringartige Komplexe ausbildet und eine wichtige Rolle bei der Zellteilung von *E. coli* spielt (MUKHERJEE & LUTKENHAUS 1994, ERICKSON 1995, ERICKSON 1997, WANG et al. 1997, ERICKSON 1998). Möglicherweise etablierte sich das Tubulin aus einem bakteriellen oder archäbakteriellen *FtsZ*-ähnlichen Vorläuferprotein in der Evolution dadurch, daß mit der Entwicklung vom ringartigen Polymer zum röhrenartigen Polymer (MARGOLIN et al. 1996) entscheidende Vorteile in der räumlichen Organisation der Zelle gewonnen werden konnten. Da besonders Eigenschaften zur Ausbildung von Axonemata bei  $\beta$ -Tubulin stark konserviert sind, nimmt man an, daß dies die ursprüngliche Funktion des Tubulins gewesen sei (RAFF et al. 1997).

Zwischen Pflanzen- und Tierreich finden sich nur geringe Übereinstimmungen bezüglich der Isotypen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin. Die Aufspaltung in Isotypen soll bei tierischen Organismen vor etwa 500 - 280 Millionen Jahren erfolgt sein (LUDUEÑA 1998). Auch für Gefäßpflanzen wird angenommen, daß erst mit dem erhöhten zellulären Organisationsgrad die Entwicklung der Tubulin-Isotypen einherging und nicht schon vor der Radiation stattfand. Die bisher bekannten Analysen umfassen jedoch nur die Sequenzvergleiche zwischen mono- und dikotylen Pflanzen, entwicklungsgeschichtlich ältere Spezies wurden nicht mit einbezogen. (VILLEMUR et al. 1992). Im folgenden sollen das pflanzliche  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tubulin im Vordergrund der Diskussion stehen.



**Abb. 63: Die Evolution des Tubulin.** Entwicklung des Tubulin und dessen Isotypen aus einem putativen (archäobakteriellen) ancestralen Tubulin (aus: LUDUEÑA 1998).

#### 4.5.1 Die Einordnung der $\alpha$ -Tubulin-Isotypen aus Gerste in die Subfamilien I-III

Die  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen der mono- und dikotylen Pflanzen werden in zwei ursprüngliche  $\alpha$ -Tubulin-Gruppen (Subfamilien I und II) eingeteilt, wobei für ZMALTUB3 (*Z. mays*) eine weitere Gruppe, die Subfamilie III, aus der Subfamilie I abgeleitet wurde (VILLEMUR et al. 1992). Es wurden ausschließlich die bekannten Sequenzen von *A. thaliana*, *Z. mays* und *Chlamydomonas* miteinander verglichen. Die Sequenzen der Subfamilien I und II des  $\alpha$ -Tubulin aus Mais zeigen jeweils höhere Übereinstimmung zu *Arabidopsis*-Sequenzen als zu Sequenzen innerhalb der Spezies Mais, was darauf zurückgeführt wird, daß die Entwicklung dieser Subfamilien vor der Aufspaltung in monokotyle und dikotyle Pflanzen stattfand (VILLEMUR et al. 1992).

Die phylogenetischen Untersuchungen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Tubulin-Isotypen aus Gerste dienten dazu, mögliche verwandtschaftliche Beziehungen der untersuchten Tubulin-Sequenzen untereinander sowie zu den Subfamilien festzustellen. Außerdem sollte ein möglichst umfassender Überblick über die phylogenetischen Beziehungen im Pflanzenreich bezüglich des  $\alpha$ -Tubulins ermöglicht werden. Der Stammbaum wurde nach der „Neighbor Joining“-Methode mit dem Programmpaket PHYLIP auf Basis der AS-Divergenzen berechnet. Die Astlänge spiegelt prozentuale Sequenzunterschiede zwischen benachbarten Sequenzen wider (angegeben in akzeptierten Punktmutationen pro Aminosäure, PAM-Matrix). Dabei gibt die Lage der Verknüpfungspunkte eine Orientierung über den Verwandtschaftsgrad der Subklassen bzw. einzelnen Sequenzen. Es ist auch möglich, die

Berechnungen mit Teilsequenzen durchzuführen, was insbesondere im Hinblick auf die unvollständigen Sequenzen HVATUB4 und HVATUB5 nahe lag. Bei evolutionären Sequenzanalysen von  $\beta$ -Tubulin-Genen bei *Basidiomyceten* konnte mit nur 133 AS eine sinnvolle phylogenetischen Analyse durchgeführt werden (THON & ROYSE 1999). Die kürzeste Sequenz aus Gerste mit 192 AS sollte auch eine derartige Untersuchung zulassen. Dennoch wurde das alignment nur mit den vollständig bekannten Sequenzen durchgeführt, da für ein alignment mit Teilsequenzen nicht genügend variable Positionen für statistisch gut unterstützte Verzweigungspunkte (> 70 %) vorhanden waren.

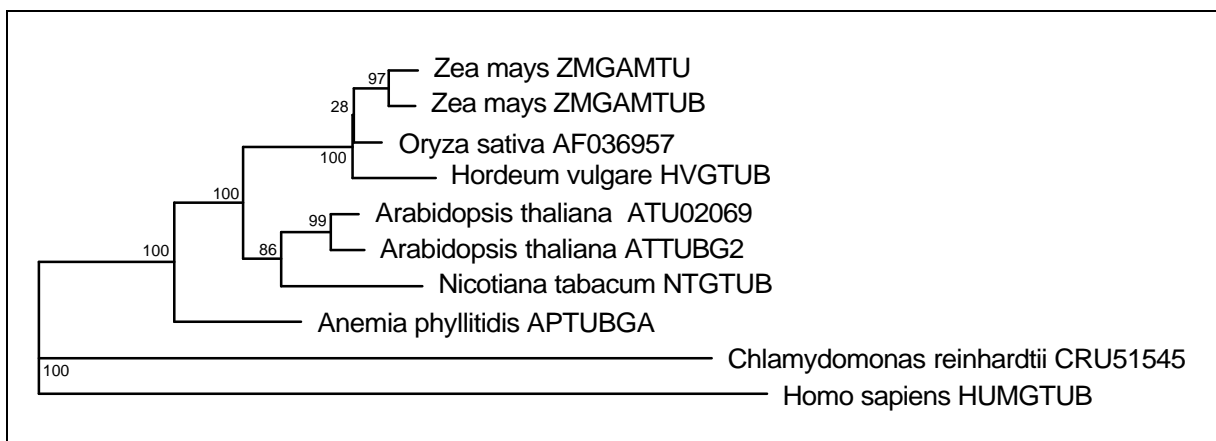
In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich zu den bereits von VILLEMUR et al. (1992) untersuchten AS-Sequenzen alle bis dato bekannten, vollständigen pflanzlichen  $\alpha$ -Tubuline auf Basis der abgeleiteten AS-Sequenzen eingeführt. Alle ließen sich, mit Ausnahme der Sequenzen aus Algen, entweder in die Subfamilien I oder II einordnen. Der Subfamilie III ist nach wie vor als einzige Sequenz ZMALTUB3 zugehörig (siehe Abb. 64) und die unvollständige Sequenz ZMTUA4 könnte aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit in die Subfamilie I gestellt werden. Es zeigt sich außerdem, daß die Aufspaltung der Subfamilien I und II wohl schon vor Entwicklung der Samenpflanzen stattfand, da sich auch die bisher bekannte vollständige Sequenz aus Farn (*A. phyllitidis*) in die Subfamilie I gruppieren läßt. Von APTUBA2A aus *A. phyllitidis* war nur die Teilsequenz bekannt, sie könnte aufgrund der höchsten Übereinstimmung mit HVATUB1, ZMALTUB5 und ZMALTUB6 zur Subfamilie II gestellt werden.

HVATUB2 und HVATUB3 lassen sich in die Subfamilie I einordnen. HVATUB1 läßt sich zur Subfamilie II aus Mais (VILLEMUR et al. 1992) gruppieren (siehe Abb. 64). HVATUB4 und HVATUB5 konnten aufgrund der nur teilweise bekannten Sequenzen nicht in die Berechnungen mit vollständigen Sequenzen einbezogen werden und könnten jeweils entsprechend ihrer offensichtlichen Sequenzähnlichkeiten zu Subfamilie I bzw. II gestellt werden. Auch bei den  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen der Gerste bestätigt sich die Beobachtung, daß Sequenzgemeinschaften zwischen den Isotypen einer Subfamilie über Speziesgrenzen hinweg höher sind, als Sequenzgemeinschaften von Isotypen unterschiedlicher Subfamilien innerhalb einer Spezies.



bootstrap-Werte statistisch unterstützt, so daß die Mais- $\gamma$ -Tubuline zwar eine eigenständige Gruppe bilden, aber die Abstammung von einer eher Reis-ähnlichen oder eher Gersten-ähnlichen Sequenz nicht statistisch ausreichend belegt werden kann.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei  $\alpha$ -Tubulin stellt die Sequenz aus Farn bei  $\gamma$ -Tubulin eine eigene Gruppe dar, was darauf schließen läßt, daß die Aufspaltung zwischen den  $\gamma$ -Tubulin-Genen entwicklungsgeschichtlich früher eintrat als die Aufspaltung in Isotypen bei  $\alpha$ -Tubulin. Im Gegensatz zu Angiospermen weist Farn im Entwicklungszyklus noch Centriolen auf, worin eine stammesgeschichtliche frühere Abspaltung des  $\gamma$ -Tubulins innerhalb der Gefäßpflanzen begründet sein könnte. Sind erst weitere  $\gamma$ -Tubulin-Gene aus weiteren Spezies höherer Pflanzen bekannt, die noch Centriolen im Entwicklungszyklus aufweisen, etwa Gymnospermen, wäre ein umfassenderer Sequenzvergleich möglich, der vielleicht auch weitergehende Einblicke in Funktionsaspekte ermöglichen würde.



**Abb. 65: Phylogenetischer Stammbaum der abgeleiteten Aminosäuresequenzen pflanzlichen  $\gamma$ -Tubulins.** Die Ziffern an den Verzweigungspunkten geben die Bootstrap-Konfidenzstufen wieder. Als „outgroup“ diente die *Homo sapiens*-Sequenz HUMGTUB. Mono- und dikotyle Pflanzen lassen sich deutlich voneinander abgrenzen. Farn bildet eine eigene Gruppe. Die Quellenverweise zu den Sequenzen befinden sich im Anhang.

## 4.6 Ausblick

Wie bereits diskutiert, können aus den nun bekannten cDNA-Sequenzen der Tubulin-Isotypen der Gerste AS-Sequenzen abgeleitet werden, die sich für eine Peptidsynthese zur Herstellung isotypspezifischer Antikörper eignen. Mittels Immunfluoreszenz wäre zu untersuchen, ob bestimmte Kompositionen von  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen bei kortikalen MT entwicklungspezifisch bedingt bevorzugt werden. Bei Mais wurden bisher keine MT-Muster gefunden, die sich aus einem einzigen  $\alpha$ -Tubulin-Isotyp zusammensetzen. Auch liegen bei Mais differenziell exprimierte Isotypen in der gesamten MT-Struktur vor und sind nicht etwa auf verschiedene MT-Muster innerhalb einer Zelle aufgeteilt (EUN & WICK 1998). Mit isotypspezifischen  $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern könnte geklärt werden, ob im Entwicklungsgradienten des Gerstenblattes entwicklungspezifische oder vielleicht für bestimmte MT-Muster spezifische Isotyp-Stöchiometrien bei  $\alpha$ -Tubulin auftreten.

Mit für Gerste spezifischen  $\gamma$ -Tubulin-Antikörpern könnte analysiert werden, ob im Zusammenhang mit Reorganisation kortikaler MT-Muster MTOC-ähnliche Nukleationsorte von Bedeutung sind, die außerhalb von Mitose und Zellteilung auftauchen. Den *in situ*-Untersuchungen könnten *in vivo*-Studien folgen: Beispielsweise könnten Pflanzenzellen mit GFP (green fluorescent protein) fusionierten  $\gamma$ -Tubulin-Konstrukten transformiert werden, wie es kürzlich von KHODJAKOV & RIEDER (1999) bei tierischen Zellen beschrieben wurde. Auf diese Weise könnte man zumindest in pflanzlichen Zellkulturen studieren, inwieweit  $\gamma$ -Tubulin auch außerhalb von Mitose und Cytokinese auftritt.

Nach Aufklärung der Genstruktur der Tubulin-Gene bei Gerste wären Experimente möglich, die über die Aktivität von Promotoren Hinweise auf spezieübergreifende Gemeinsamkeiten bezüglich der Transkriptionskontrolle bestimmter Isotypen erlauben. Beispielsweise könnten Promotoren der Gene für die  $MI_{\max}$ -Isotypen und die MT-Band-Isotypen aus Gerste mit GUS-Reportergenen fusioniert werden. Die mit jeweils unterschiedlichen Konstrukten transformierten Pflanzen wären dann hinsichtlich der bei Gerste beobachteten Expressionsmuster zu überprüfen.

Die sehr charakteristischen Unterschiede im Expressionsmuster der fünf  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen während der Blattentwicklung weisen auf eine funktionelle Bedeutung im Rahmen der Reorganisation des kortikalen MT-Cytoskeletts bei sich entwickelnden Mesophyllzellen der Gerste hin. In Blattregionen hoher Zellteilungsaktivität dominante Isotypen der Gerste sind

den entsprechenden Sequenzen aus Mais sehr ähnlich. Möglicherweise bestehen hier funktionelle Gemeinsamkeiten, die die Multitubulinhypothese (FULTON & SIMPSON 1976, LUDUEÑA 1998) unterstützen.

Ein Großteil der durchgeführten und oben geschilderten Untersuchungen hat jedoch eher deskriptiven Charakter, teilweise können bestimmten Isotypen spezifische Vorkommen in MT-Mustern zugeordnet werden, die möglicherweise entwicklungs- oder gewebespezifisch bedingt besondere Funktionen erfüllen. Allerdings gibt es noch wenige Vorstellungen darüber, welche unterschiedlichen molekularen Eigenarten der Isotypen im Einzelnen diese funktionelle Spezialisierung ermöglichen. Letztlich müsste überprüft werden, ob ein bestimmter Isotyp hinsichtlich der Funktion in einer Weise unersetzlich ist, die sich phänotypisch ausdrückt. Die genaue Aufklärung der funktionellen Rollen der einzelnen Tubulin-Isotypen bei der Umgestaltung des kortikalen MT-Cytoskeletts in Mesophyllzellen im Modell „Entwicklungsgradient des Gerstenblattes“ wäre letztlich nur mittels Deletions- und Mutationsanalysen möglich.

## 5. Zusammenfassung

Die Morphogenese einer Pflanzenzelle wird in großem Maße durch die Dynamik kortikaler Mikrotubuli (MT) bestimmt, die auf die Zellwandsynthese Einfluß nehmen. In dieser Arbeit wurden die Transkriptmengen der  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen und des  $\gamma$ -Tubulin während der Entwicklung des Gerstenblattes analysiert, um Zusammenhänge zu bereits beschriebenen Umwandlungen im kortikalen MT-Cytoskelett der Mesophyllzellen aufzudecken. Erstmals konnte bei einer höheren Pflanze die Genexpression auf RNA-Ebene innerhalb einer Tubulin-Multigenfamilie im Verlauf der Blattentwicklung umfassend dargestellt werden.

Es wurden blattspezifische cDNA-Bibliotheken erstellt und mittels RT-PCR homologe DNA-Gensonden für die Screeningprozesse der cDNA-Bibliotheken hergestellt. cDNA-Sequenzen von  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Tubulin konnten isoliert werden. Weitere, weniger abundante  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen wurden während zusätzlicher Screeningrunden über PCR-Ausschluß häufiger vertretener, bereits bekannter Isotypen isoliert.

Die cDNA-Sequenzen von insgesamt fünf verschiedenen Isotypen des  $\alpha$ -Tubulin konnten aufgeklärt werden, drei Isotypen wiesen bis zu fünf im nicht kodierenden 3'-Bereich verkürzte Varianten auf, die aber in ihrer Anzahl deutlich unterrepräsentiert waren. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen umfassten bei drei Isotypen 451 Aminosäuren (AS), zwei Isotypen waren im C-Terminus um eine bzw. um zwei AS kürzer. Die fünf  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen wiesen charakteristische Expressionsmuster auf, die in drei Klassen unterteilbar waren. Die Isotypen HVATUB1 und HVATUB5 (MT-Band-Isotypen) hatten den maximalen Gehalt in Blattbereichen, in denen auch hauptsächlich Mesophyllzellen mit kortikalen MT-Bänderungen vorkommen, wobei HVATUB5 den am schwächsten exprimierten Isotyp darstellte. HVATUB3 (Random-MT-Isotyp) zeigte die stärksten Expressionsraten. Die im Meristem und meristemnahen Bereichen bereits recht hohe Abundanz erreichte erst nach der Zellstreckungszone in einer Blattzone das Maximum, in dem hauptsächlich Mesophyllzellen mit zerstreut angeordneten MT anzutreffen sind. Die Isotypen HVATUB2 und HVATUB4 ( $MI_{max}$ -Isotypen) waren in mitotisch aktiven, basalen Blattbereichen dominant.

Die cDNA-Sequenz vom  $\gamma$ -Tubulin der Gerste, HVG TUB, wurde ermittelt; die abgeleitete Aminosäuresequenz bestand aus 469 AS. Das Auftreten einer im nicht kodierenden 3'-Bereich kürzeren Variante konnte erstmals bei pflanzlichem  $\gamma$ -Tubulin beschrieben werden. Southernblot-Analysen ließen darauf schließen, daß  $\gamma$ -Tubulin nur als Einzelkopie im Genom der Gerste vorkommt. Das  $\gamma$ -Tubulin wurde im mitosereichen Meristem der Blattbasis am

stärksten exprimiert. Da die Abnahme der Transkriptmenge weitaus langsamer verlief als die Abnahme der Zellteilungsaktivität, ist anzunehmen, daß  $\gamma$ -Tubulin neben der Erfüllung von mitose- und zellteilungsspezifischen Funktionen auch eine Rolle im Zusammenhang mit der Dynamik des kortikalen MT-Cytoskeletts spielt.

Einen ersten Schritt zur Aufklärung der Genfamilie des  $\beta$ -Tubulin bei Gerste stellt die Isolierung drei verschiedener cDNA-Sequenzen von  $\beta$ -Tubulin (HVBTUB1, HVBTUB2 und HVBTUB3) dar.

## 6. Literatur

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*, Third Edition, Garland Publishing, New York.
- Amos, L.A. & Baker, T.S. (1979). The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature*, 279, 607-612.
- Aviv, H. & Leder, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 1408-1412.
- Benton, W.D. & Davis, R.W. (1977). Screening  $\lambda$ -gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science*, 196, 180.
- Binarova, P., Hause, B., Dolezel, J. & Draber, P. (1998). Association of  $\gamma$ -tubulin with kinetochore/centromeric region of plant chromosomes. *Plant Journal*, 14, 751-757.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7, 1513-1523.
- Birnstiel, M.L., Busslinger, M. & Strub, K. (1985). Transcription termination and 3' processing: the end is in site! *Cell*, 41, 349-359.
- Bokros, C.L., Hugdahl, J.D., Blumenthal, S.S.D. & Morejohn, L.C. (1996). Proteolytic analysis of polymerized maize tubulin: Regulation of microtubule stability to low temperature and  $\text{Ca}^{2+}$  by the carboxyl terminus of  $\beta$ -tubulin. *Plant Cell Environ.*, 19, 539-548.
- Borck, K. & Braymer, H.D. (1974). The genetic analysis of resistance to benomyl in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.*, 85, 51-56.
- Breitling, F. & Little, M. (1986). Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules. Epitope locations of YOL1/34, DM1A and DM1B. *J. Mol. Biol.*, 189, 367-370.
- Brierley, H.L., Webster, P. & Long, S.R. (1995). The *Pisum sativum* TubA1 gene, a member of a small family of  $\alpha$ -tubulin sequences. *Plant Mol. Biol.*, 27, 715-727.
- Brower, D.L. & Hepler, P.K. (1976). Microtubules and secondary wall deposition in xylem: The effects of isopropyl N-phenylcarbamate. *Protoplasma*, 87, 91-111.
- Brown, R.M. (1985). Cellulose microfibril assembly and orientation: recent developments. *J. Cell Sci. Suppl.*, 2, 13-32.
- Burns, R.G. (1991).  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Tubulins: Sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motility Cytoskeleton*, 20, 181-189.

- Burns, R.G. (1995). Analysis of the  $\gamma$ -tubulin sequences: Implications for the functional properties of  $\gamma$ -tubulin. *J. Cell Sci.*, 108, 2123-2130.
- Burns, R.G. & Farrell, K.W. (1996). Getting to the heart of  $\beta$ -tubulin. *Trends Cell Biol.*, 6, 297-303.
- Byrne, D.H., Seeley, K.A. & Colbert, J.T. (1993). Half-lives of oat mRNAs *in vivo* and in a polysome-based *in vitro*-system. *Planta*, 189, 249-256.
- Carpenter, J.L., Ploense, S.E., Snustad, D.P. & Silflow, C.D. (1992). Preferential expression of an  $\alpha$ -tubulin gene of *Arabidopsis* in pollen. *Plant Cell*, 4, 557-571.
- Carpenter, J.L., Kopczak, S.D., Snustad, D.P. & Silflow, C.D. (1993). Semi-constitutive expression of an *Arabidopsis thaliana*  $\alpha$ -tubulin gene. *Plant Mol. Biol.*, 21, 937-942.
- Chu, B., Snustad, D.P. & Carter, J.V. (1993). Alteration of  $\beta$ -tubulin gene expression during low-temperature exposure in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 103, 371-377.
- Church, G.M. & Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1991-1995.
- Cohen, S., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2100-2114.
- Creelman, R.A. & Mullet, J.E. (1991). Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new  $\beta$ -tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant. Mol. Biol.*, 17, 591-608.
- Cyr, R.J. & Palevitz, B.A. (1995). Organization of cortical microtubules in plant cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 7, 65-71.
- Davies, E., Abe, S., Larkins, B.A., Clore, A.M., Quatrano, R.S. & Weidner, S. (1998). The role of the cytoskeleton in plant protein synthesis. In J. Bailey-Serres and D.R. Gallie (Eds). *A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants* (pp. 115-124). American Society of Plant Physiologists.
- Dean, C., Tamaki, S., Dunsmuir, P., Favreau, M., Katayama, C., Dooner, H. & Bedbrook, J. (1986). mRNA transcripts of several plant genes are polyadenylated at multiple sites *in vivo*. *Nucl. Acids Res.*, 14, 2229-2240.
- Delmer, P.D. (1987). Cellulose biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 38, 259-290.
- Delmer, P.D. & Amor, Y. (1995). Cellulose biosynthesis. *Plant Cell*, 7, 987-1000.
- Diaz, E.C., Martin, F. & Tagu, D. (1996). Eucalypt  $\alpha$ -tubulin: cDNA cloning and increased level of transcripts in ectomycorrhizal root system. *Plant Mol. Biol.*, 31, 905-910.

- Dixon, D.C., Seagull, R.W. & Triplett, B.A. (1994). Changes in the accumulation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin isotypes during cotton fiber development. *Plant Physiol.*, 105, 1347-1353.
- Dolfini, S., Consonni, G., Mereghetti, M. & Tonelli, C. (1993). Antiparallel expression of the sense and antisense transcripts of maize  $\alpha$ -tubulin genes. *Mol. Gen. Genet.*, 241, 161-169.
- Doyle, J. (1991). CTAB total DNA isolation. In G.M. Hewitt (Ed). *Molecular techniques in taxonomy*. (pp. 283-291). Springer-Verlag, Berlin.
- Dumontet, C., Duran, G.E., Steger, K.A., Beketic Oreskovic, L. & Sikic, B.I. (1996). Resistance mechanisms in human sarcoma mutants derived by single-step exposure to paclitaxel (Taxol). *Cancer Res.*, 56, 1091-1097.
- Eleftheriou, E.P. (1987). Microtubules and cell wall development in differentiating prothloem sieve elements of *Triticum aestivum* L. *J. Cell. Sci.*, 87, 595-607.
- Erickson, H.P. (1995). *FtsZ*, a prokaryotic homolog of tubulin. *Cell*, 80, 367-370.
- Erickson, H.P. & Stoffler, D. (1996). Tubulin rings are universal polymers of the tubulin family- $\alpha/\beta$ ,  $\gamma$  and *FtsZ*. *J. Cell Biol.*, 135, 5-8.
- Erickson, H.P. (1997). *FtsZ*, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trends Cell Biol.*, 7, 362-367.
- Erickson, H.P. (1998). Atomic structures of tubulin and *FtsZ*. *Trends Cell Biol.*, 8, 133-137.
- Eun, S.O. & Wick, S.M. (1998). Tubulin isoform usage in maize microtubules. *Protoplasma*, 204, 235-244.
- Fackenthal, J.D., Turner, F.R. & Raff, E.C. (1993). Tissue-specific microtubule functions in *Drosophila* spermatogenesis require the  $\beta$ -2-tubulin isotype-specific carboxy terminus. *Dev. Biol.*, 158, 213-227.
- Fackenthal, J.D., Hutchens, J.A., Turner, F.R. & Raff, E.C. (1995). Structural analysis of mutations in the *Drosophila*  $\beta$ 2-tubulin isoform reveals regions in the  $\beta$ -tubulin molecule required for general and for tissue-specific microtubule functions. *Genetics*, 139, 267-286.
- Fagotti, A., Gabbiani, G., Pascolini, R. & Neuville, P. (1998). Multiple isoform recovery (MIR)-PCR: A simple method for the isolation of related mRNA isoforms. *Nucl. Acids Res.*, 26, 2031-2033.
- Falconer, M.M. & Seagull, R.W. (1985). Xylogensis in tissue culture: taxol effects on microtubule reorientation and lateral association in differentiating cells. *Protoplasma*, 128, 157-166.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Addendum. Anal. Biochem.*, 137, 266-267.

- Friedmann, K.D., Rosen, N.L., Neuman, P.J. & Montgomery, R.R. (1988). Screening of  $\lambda$ -gt 11 libraries. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds). PCR protocols: A guide to methods and applications, Academic Press, San Diego.
- Fuchs, U., Moepps, B., Maucher, H.P. & Schraudolf, H. (1993). Isolation, characterization and sequence of a cDNA encoding  $\gamma$ -tubulin protein from the fern *Anemia phyllitidis* L. Sw. Plant Mol. Biol., 23, 595-603.
- Fulton, C. & Simpson, P.A. (1976). Selective synthesis and utilization of flagellar tubulin. The multitubulin hypothesis. In R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum (Eds). Cell Motility (pp. 987-1005). Cold Spring Harbour Publications, New York.
- Galatis, B. (1988). Microtubules and epithem-cell morphogenesis in hydathodes of *Pilea cadierei*. Planta, 176, 287-297.
- Gallie, D.R. (1993). Posttranscriptional regulation of gene expression in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 44, 77-105.
- Galway, M.E. & Hardham, A.R. (1991). Immunofluorescent localization of microtubules throughout the cell cycle in the green alga *Mougeotia* (Zygnemataceae). Am. J. Bot., 78, 451-461.
- Giddings, T.H. & Staehelin, L.A. (1991). Microtubule-mediated control of microfibril deposition: A re-examination of the hypothesis. In C.W. Lloyd (Ed). The cytoskeletal basis of plant growth and form (pp. 85-99). Academic Press, London.
- Goddard, R.H., Wick, S.M., Silflow, C.D. & Snustad, D.P. (1994). Microtubule components of the plant cytoskeleton. Plant Physiol., 104, 1-6.
- Goddard, R.H., Villemur, R., Silflow, C.D. & Wick, S.M. (1998). Generation of chicken polyclonal antibodies against distinct maize isotubulins. Protoplasma, 204, 226-234.
- Green, P.B. (1980). Organogenesis - A biophysical view. Annu. Rev. Plant Physiol., 31, 51-82.
- Green, P.J. (1993). Control of mRNA stability in higher plants. Plant Physiol., 102, 1065-1070.
- Grolig, F. (1990). Actin-based organelle movements in interphase *Spirogyra*. Protoplasma, 155, 29-42.
- Gunning, B.E.S. & Hardham, A.R. (1982). Microtubules. Annu. Rev. Plant Physiol., 33, 651-698.
- Gutiérrez, R.A., MacIntosh, G.C. & Green, P.J. (1999). Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. Trends Plant Sci., 4, 429-438.

- Hamelin, M., Scott, I.M., Way, J.C. & Culotti, J.G. (1992). The *mec-7*  $\beta$ -tubulin gene of *Caenorhabditis elegans* is expressed primarily in the touch receptor neurons. *EMBO J.*, 11, 2885-2893.
- Han, I.S., Jongewaard, I. & Fosket, D.E. (1991). Limited expression of a diverged  $\beta$ -tubulin gene during soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) development. *Plant Mol. Biol.*, 16, 225-234.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580.
- Harper, J.F. & Mages, W. (1988). Organization and structure of *Volvox*  $\beta$ -tubulin genes. *Mol. Gen. Genet.*, 213, 315-324.
- Hellmann, A. (1995). Untersuchungen zur Tubulinexpression - Differenzielle Tubulinexpression im Verlauf der Zellentwicklung bei *Hordeum vulgare* (L.). Dissertation am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Hellmann, A. & Wernicke, W. (1998). Changes in tubulin protein expression accompany reorganization of microtubular arrays during cell shaping in barley leaves. *Planta*, 204, 220-225.
- Hennig, L. (1999). WinGene/WinPep: User-friendly software for the analysis of amino acid sequences. *BioTechniques*, 26, 1170-1172.
- Hepler, P.K. & Fosket, D.E. (1971). The role of microtubules in vessel member differentiation in *Coleus*. *Protoplasma*, 72, 213-236.
- Herth, W. (1980). Calcofluor white and congo red inhibit chitin microfibril assembly of *Poteroiochromonas*: Evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. *J. Cell Biol.*, 87, 442-450.
- Holton, T.A. & Graham, M.W. (1991). A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucl. Acids Res.*, 19, 1156.
- Hoss, S. & Wernicke, W. (1995). Microtubules and the establishment of apparent cell wall invaginations in mesophyll cells of *Pinus sylvestris* L. *Journal of Plant Physiol.*, 147, 474-476.
- Hoyle, H.D. & Raff, E.C. (1990). Two *Drosophila*  $\beta$ -tubulin isoforms are not functionally equivalent. *J. Cell Biol.*, 111, 1009-1026.
- Hoyle, H.D., Hutchens, J.A., Turner, F.R. & Raff, E.C. (1995). Regulation of  $\beta$ -tubulin function and expression in *Drosophila* spermatogenesis. *Dev. Genet.*, 16, 148-170.
- Hunt, G.A. (1994). Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45, 47-60.

- Hunt, A.G. & Messing, J. (1998). mRNA polyadenylation in plants. In J. Bailey-Serres and D.R. Gallie (Eds). A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants (pp. 29-39). American Society of Plant Physiologists.
- Hush, J.M., Wadsworth, P., Callaham, D.A. & Hepler, P.K. (1994). Quantification of microtubule dynamics in living plant cells using fluorescence redistribution after photobleaching. *J. Cell Sci.*, 107, 775-784.
- Hussey, P.J., Haas, N., Hunsperger, J., Larkin, J., Snustad, D.P. & Silflow, C.D. (1990). The  $\beta$ -tubulin gene family in *Zea mays*: two differentially expressed  $\beta$ -tubulin genes. *Plant Mol. Biol.*, 15, 957-972.
- Hutchens, J.A., Hoyle, H.D., Turner, F.R. & Raff, E.C. (1997). Structurally similar *Drosophila*  $\alpha$ -tubulins are functionally distinct *in vivo*. *Mol. Biol. Cell*, 8, 481-500.
- Ingelbrecht, I.L.W., Herman, L.m.F., Dekeyser, R.A., Montagu van, M.C. & Depicker, A.G. (1989). Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell*, 1, 671-680.
- Jellings, A.J. & Leech, R.M. (1982). The importance of quantitative anatomy in the interpretation of whole leaf biochemistry in species of *Triticum*, *Hordeum* and *Avena*. *New Phytol.*, 92, 39-48.
- Jiang, Y.Q. & Oblinger, M.M. (1992). Differential regulation of  $\beta$ III and other tubulin genes during peripheral and central neuron development. *J. Cell Sci.*, 103, 643-651.
- Johnson, M.A., Baker, E.J., Colbert, J.T. & Green, P.J. (1998). Determinants of mRNA stability in plants. In J. Bailey-Serres and D.R. Gallie (Eds). A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants (pp. 40-53). American Society of Plant Physiologists.
- Joshi, C.P. (1987). Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: A compilation and analysis. *Nucl. Acids Res.*, 15, 9627-9640.
- Joshi, H.C., Yen, T.J. & Cleveland, D.W. (1987). *In vivo* coassembly of a divergent  $\beta$ -tubulin subunit (c  $\beta$  6) into microtubules of different function. *J. Cell Biol.*, 105, 2179-2190.
- Joshi, H.C. & Cleveland, D.W. (1989). Differential utilization of  $\beta$ -tubulin isotypes in differentiating neurites. *J. Cell Biol.*, 109, 663-673.
- Joshi, H.C., Palacios, M.J., McNamara, L. & Cleveland, D.W. (1992).  $\gamma$ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature*, 356, 80-83.
- Joshi, H.C. & Palevitz, B.A. (1996).  $\gamma$ -Tubulin and microtubule organization in plants. *Trends Cell Biol.*, 6, 41-44.
- Joyce, C.M., Villemur, R., Snustad, D.P. & Silflow, C.D. (1992). Tubulin gene expression in maize (*Zea mays* L.) - Change in isotype expression along the developmental axis of seedling root. *J. Mol. Biol.*, 227, 97-107.

- Jung, G. & Wernicke, W. (1990). Cell shaping and microtubules in developing mesophyll of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Protoplasma*, 153, 141-148.
- Jung, G. (1991). Zellbiologische Aspekte der Differenzierung von Mesophyllzellen und der Dedifferenzierung daraus isolierter Protoplasten. Dissertation am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Jung, G., Hellmann, A. & Wernicke, W. (1993). Changes in the density of microtubular networks in mesophyll cell and mesophyll derived protoplasts of *Nicotiana* and *Triticum* during leaf development. *Planta*, 190, 10-16.
- Kamiya, N. (1981). Physical and chemical basis of cytoplasmic streaming. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 32, 205-216.
- Kautz, K. (1999). Charakterisierung der  $\gamma$ -Tubulin-Sequenz aus *Nicotiana tabacum*. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Kato, T. & Tonomura, Y. (1977). Identification of myosin in *Nitella flexilis*. *J. Biochem.*, 82, 777-782.
- Khodjakov, A. & Rieder, C.L. (1999). The sudden recruitment of  $\gamma$ -tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J. Cell Biol.*, 146, 585-596.
- Kim, Y. & An, G. (1992). Pollen-specific expression of the *Arabidopsis thaliana*  $\alpha$ 1-tubulin promoter assayed by  $\beta$ -glucuronidase, chloramphenicol, acetyltransferase and diphtheria toxin reporter genes. *Transgenic Res.*, 1, 188-194.
- Kirk, K.E. & Morris, N.R. (1993). Either  $\beta$ -tubulin gene product is sufficient for microtubule function during all stages of growth and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 4465-4476.
- Klahre, U., Hemmings Mieszczak, M. & Filipowicz, W. (1995). Extreme heterogeneity of polyadenylation sites in mRNAs encoding chloroplast RNA-binding proteins in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant. Mol. Biol.*, 28, 569-574.
- Klenow, H. & Henningsen, I. (1970). Selective elimination of the exonuclease activity of the desoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* by limited proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 65, 168-175.
- Komma, D.J. & Endow, S.A. (1997). Enhancement of the *ncd(D)* microtubule motor mutant by mutants of  $\alpha$ -Tub67C. *J. Cell Sci.*, 110, 229-237.
- Kopczak, S.D., Haas, N.A., Hussey, P.J., Silflow, C.D. & Snustad, D.P. (1992). The small genome of *Arabidopsis* contains at least 6 expressed  $\alpha$ -tubulin genes. *Plant Cell*, 4, 539-547.
- Kutschera, U. (1991). Regulation of cell expansion. In C.W. Lloyd (Ed). *The cytoskeletal basis of plant growth and form* (pp. 149-158). Academic Press, London.

- Lambert, A.M. & Lloyd, C.W. (1994). The higher plant microtubule cycle. In J.S. Hyams and C.W. Lloyd (Eds). *Microtubules* (pp. 325-341). Wiley-Liss, New York.
- Ledbetter, M.C. & Porter, K.R. (1963). A 'microtubule' in plant cell fine structure. *J. Cell Biol.*, 19, 239-250.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. & Boedtke, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, 16, 4743-4751.
- Lennerz, V. (1997). Untersuchungen zur  $\alpha$ -Tubulin-Genfamilie der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Lewis, S.A., Lee, M.G. & Cowan, N.J. (1985). Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J. Cell Biol.*, 101, 852-861.
- Lewis, S.A., Gu, W. & Cowan, N.J. (1987). Free intermingling of mammalian  $\beta$ -tubulin isotypes among functionally distinct microtubulus. *Cell*, 49, 539-548.
- Li, Q. & Hunt, A.G. (1995). A near-upstream element in a plant polyadenylation signal consists of more than six nucleotides. *Plant. Mol. Biol.*, 28, 927-934.
- Linhartova, I., Draber, P., Draberova, E. & Viklicky, V. (1992). Immunological discrimination of  $\beta$ -tubulin isoforms in developing mouse brain - post-translational modification of nonclass-III  $\beta$ -tubulins. *Biochem. J.*, 288, 919-924.
- Linse, K. & Mandelkow, E.M. (1988). The GTP-binding peptide of  $\beta$ -tubulin. *J. Biol. Chem.*, 263, 15205-15210.
- Little, M. & Seehaus, T. (1988). Comparative analysis of tubulin sequences. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B, 655-70.
- Liu, B., Marc, J., Joshi, H.C. & Palevitz, B.A. (1993). A  $\gamma$ -tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Sci.*, 104, 1217-1228.
- Liu, B., Joshi, H.C., Wilson, T.J., Silflow, C.D., Palevitz, B.A. & Snustad, D.P. (1994).  $\gamma$ -tubulin in *Arabidopsis*: Gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell*, 6, 303-314.
- Lloyd, C.W. (1984). Toward a dynamic helical model for the influence of microtubules on wall patterns in plants. *Int. Rev. Cytol.*, 86, 1-51.
- Lloyd, C.W. (1987). The plant cytoskeleton: The impact of fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 38, 119-139.
- Lopez, I., Khan, S., Sevik, M., Cande, W.Z. & Hussey, P.J. (1995). Isolation of a full-length cDNA encoding *Zea mays*  $\gamma$ -tubulin. *Plant Physiol.*, 107, 309-310.

- Ludueña, R.F. (1993). Are tubulin isotypes functionally significant. *Mol. Biol. Cell*, 4, 445-457.
- Ludueña, R.F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.*, 178, 207-75.
- Ludwig, S.R., Oppenheimer, D.G., Silflow, C.D. & Snustad, D.P. (1987). Characterization of the  $\alpha$ -tubulin gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5833-5837.
- Ludwig, S.R., Oppenheimer, D.G., Silflow, C.D. & Snustad, D.P. (1988). The  $\alpha$ 1-tubulin gene of *Arabidopsis thaliana*: primary structure and preferential expression in flowers. *Plant Mol. Biol.*, 10, 311-321.
- MacDonald, R.J., Swift, G.H., Przybyla, A.E. & Chirgwin, J.M. (1987). Isolation of RNA using guanidinium salts. *Meth. Enzymol.*, 152, 219-227.
- MacDonald, M.H., Mogen, B.D. & Hunt, A.G. (1991). Characterization of the polyadenylation signal from the T-DNA-encoded octopine synthase gene. *Nucl. Acids Res.*, 19, 5575-5581.
- Mages, W., Salbaum, J.M., Harper, J.F. & Schmitt, R. (1988). Organization and structure of *Volvox*  $\alpha$ -tubulin genes. *Mol. Gen. Genet.*, 213, 449-458.
- Mages, W., Cresnar, B., Harper, J.F., Bruderlein, M. & Schmitt, R. (1995). *Volvox carteri*  $\alpha$  2- and  $\beta$  2-tubulin-encoding genes: regulatory signals and transcription. *Gene*, 160, 47-54.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53, 159-162.
- Mandelkow, E.M., Schultheiss, R., Rapp, R., Muller, M. & Mandelkow, E. (1986). On the surface lattice of microtubules: helix starts, protofilament number, seam, and handedness. *J. Cell Biol.*, 102, 1067-1073.
- Marc, J. (1997). Microtubule organizing centres in plants. *Trends Plant Sci.*, 2, 223-230.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. & Collins, F.S. (1991). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucl. Acids Res.*, 19, 1154.
- Margolin, W., Wang, R. & Kumar, M. (1996). Isolation of an *FtsZ* homolog from the archaeobacterium *Halobacterium salinarium*: implications for the evolution of *FtsZ* and tubulin. *J. Bacteriol.*, 178, 1320-1327.
- May, G.S. (1989). The highly divergent  $\beta$ -tubulins of *Aspergillus nidulans* are functionally interchangeable. *J. Cell Biol.*, 109, 2276-2274.

- McDonald, A.R., Liu, B., Joshi, C. & Palevitz, B.A. (1993).  $\gamma$ -Tubulin is associated with a cortical-microtubule-organizing zone in the developing guard cells of *Allium cepa* L. *Planta*, 191, 357-361.
- Melan, M.A. (1990). Taxol maintains organized microtubule patterns in protoplasts which lead to the resynthesis of organized cell wall microfibrils. *Protoplasma*, 15, 169-177.
- Menzel, D. (1993). Chasing coiled coils: Intermediate filaments in plants. *Bot. Acta*, 106, 294-300.
- Mertz, L.M. & Rashtchian, A. (1994). Nucleotide imbalance and polymerase chain reaction: effects on DNA amplification and synthesis of high specific activity radiolabeled DNA probes. *Anal. Biochem*, 221, 160-165.
- Meyer, C. (1994). Untersuchungen zur Tubulinexpression - Tubulin mRNA-Gehalte im Verlauf der Zellentwicklung bei *Hordeum vulgare* (L.). Dissertation am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Meyer, C.U., Hellmann, A. & Wernicke, W. (1998). Tubulin gene expression persists during all changes in microtubular arrays related to cell shaping in growing barley leaves. *J. Plant Physiol.*, 153, 258-260.
- Mitchison, T. & Kirschner, M. (1984). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature*, 312, 232-237.
- Miyahara, J. (1989). The Imaging Plate: A new radiation imaging sensor. *Chemistry Today*, 223, 29-36.
- Mogen, B.D., MacDonald, M.H., Graybosch, R. & Hunt, A.G. (1990). Upstream sequences other than AAUAAA are required for efficient messenger RNA 3'-end formation in plants. *Plant Cell*, 2, 1261-1272.
- Mogen, B.D., MacDonald, M.H., Leggewie, G. & Hunt, A.G. (1992). Several distinct types of sequence elements are required for efficient mRNA 3' end formation in a pea *rbcS* gene. *Mol. Cell Biol.*, 12, 5406-5414.
- Montoliu, L., Puigdomenech, P. & Rigau, J. (1990a). The tub  $\alpha 3$  gene from *Zea mays*: structure and expression in dividing plant tissues. *Gene*, 94, 201-207.
- Montoliu, L., Rigau, J. & Puigdomenech, P. (1990b). Multiple polyadenylation sites are active in the  $\alpha 1$ -tubulin gene from *Zea mays*. *FEBS Lett.*, 277, 29-32.
- Mori, K. & Hamaoka, T. (1994). IP autoradiography system (BAS). *Protein, Nucleic acid and Enzyme*, 39, 181-191.
- Mukherjee, A. & Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of *FtsZ* into filaments. *J. Bacteriol.*, 176, 2754-8.
- Mullis, B.K. & Faloona, A.F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 155, 909-913.

- Murray, M.G. & Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.*, 8, 4321-4325.
- Oakley, C.E. & Oakley, B.R. (1989). Identification of  $\gamma$ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 338, 662-664.
- Oakley, B.R. (1994).  $\gamma$ -Tubulin. In J.S. Hyams and C.W. Lloyd (Eds). *Microtubules* (pp. 33-45). Wiley-Liss, New York.
- Oakley, B.R. (1995). Cell Biology: A nice ring to the centrosome. *Nature*, 378, 555-556.
- Okamura, S., Naito, K., Sonehara, S., Ohkawa, H., Kuramori, S., Tatsuta, M., Minamizono, M. & Kataoka, T. (1997). Characterization of the carrot  $\beta$ -tubulin gene coding a divergent isotype,  $\beta$ -2. *Cell Struct. Funct.*, 22, 291-298.
- Okamura, S., Okahara, K., Iida, T., Ozaki, M., Asano, S., Morita, M. & Imanaka, T. (1999). Isotype specific changes in the amount of  $\beta$ -tubulin RNA in synchronized tobacco BY2 cells. *Cell Struct. Funct.*, 24, 117-122.
- Padilla, R., Otin, C.L., Serrano, L. & Avila, J. (1993). Role of the carboxy terminal region of  $\beta$ -tubulin on microtubule dynamics through its interaction with the GTP phosphate binding region. *FEBS Lett.*, 325, 173-176.
- Panteris, E., Apostolakos, P. & Galatis, B. (1993a). Microtubule organization, mesophyll cell morphogenesis, and intercellular space formation in *Adiantum capillus veneris* leaflets. *Protoplasma*, 172, 97-110.
- Panteris, E., Apostolakos, P. & Galatis, B. (1993b). Microtubules and morphogenesis in ordinary epidermal cells of *Vigna sinensis* leaves. *Protoplasma*, 174, 91-100.
- Penhoat, A., Naville, D., Jaillard, C., Durand, P. & Begeot, M. (1997). Presence of multiple functional polyadenylation signals in the 3'-untranslated region of human corticotropin receptor cDNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1356, 249-252.
- Pirrung, K. (1999). Untersuchungen zum Vorkommen von posttranslationalen Modifikationen des Tubulins bei Pflanzen. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Proudfoot, N.J. & Brownlee, G.G. (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, 263, 211-214.
- Qiagen. (1997). Protocol for formaldehyde-agarose gel analysis - Overview and description of methods for the various starting materials. In Qiagen (Ed). *RNeasy Mini Handbook* (pp. 58-59. Second Editon. Qiagen, Hilden.
- Qin, X.Q., Giani, S. & Breviario, D. (1997). Molecular cloning of three rice  $\alpha$ -tubulin isotypes: differential expression in tissues and during flower development. *Biochimica Et Biophysica Acta Gene Structure Expression*, 1354, 19-23.

- Raff, J.W. (1996). Centrosomes and microtubules: wedded with a ring. *Trends Cell Biol.*, 6, 248-251.
- Raff, E.C., Fackenthal, J.D., Hutchens, J.A., Hoyle, H.D. & Turner, F.R. (1997). Microtubule architecture specified by a  $\beta$ -tubulin isoform. *Science*, 275, 70-73.
- Reed, K.C. & Mann, D.A. (1985). Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucl. Acids Res.*, 13, 7207-7221.
- Renthal, R., Schneider, B.G., Miller, M.M. & Ludueña, R.F. (1993).  $\beta$ (IV) is the major  $\beta$ -tubulin isotype in bovine cilia. *Cell Motility Cytoskeleton*, 25, 19-29.
- Robinson, D.G. & Quader, H. (1982). The microtubule-microfibril syndrom. In C.W. Lloyd (Ed). *The Cytoskeleton in Plant Growth and Development* (pp. 109-126). Academic Press, London.
- Rogers, H.J., Greenland, A.J. & Hussey, P.J. (1993). Four members of the maize  $\beta$ -tubulin gene family are expressed in the male gametophyte. *Plant J.*, 4, 875-882.
- Roos, M.H., Boersema, A.J., Borgsteede, F.H.M., Cornelissen, J., Taylor, M. & Ruitenber, E.J. (1990). Molecular analysis of selection for benzimidazol resistance in the sheep parasite *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 43, 77-88.
- Rothnie, H.M., Reid, J. & Hohn, T. (1994). The contribution of AAUAAA and the upstream element UUUGUA to the efficiency of mRNA 3'-end formation in plants. *EMBO J.*, 13, 2200-2210.
- Rothnie, H.M. (1996). Plant mRNA 3'-end formation. *Plant. Mol. Biol.*, 32, 43-61.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning - A laboratory manual* Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.
- Sauer, P., Müller, M. & Kang, J. (1998). Quantification of DNA. *Qiagen News*, 2, 23-26.
- Schneider, B. & Herth, W. (1986). Distribution of plasma membrane rosettes and kinetics of cellulose formation in xylem development of higher plants. *Protoplasma*, 131, 142-152.
- Schock, G. (1995). Die Multigenfamilie der Glutamin-Synthase in *Brassica napus* (L.) - Molekularbiologische Charakterisierung. Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Seagull, R.W. (1990). The effects of microtubule and microfilament disrupting agents on cytoskeletal arrays and wall deposition in developing cotton fibers. *Protoplasma*, 159, 44-59.

- Silflow, C.D., Chisholm, R.L., Conner, T.W. & Ranum, L.P. (1985). The two  $\alpha$ -tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii* code for slightly different proteins. *Mol. Cell Biol.*, 5, 2389-2398.
- Silflow, C.D., Oppenheimer, D.G., Kopczak, S.D., Ploense, S.E., Ludwig, S.R., Haas, N. & Snustad, D.P. (1987). Plant tubulin genes: Structure and differential expression during development. *Dev. Genet.*, 8, 435-460.
- Silflow, C.D., Liu, B., LaVoie, M., Richardson, E.A. & Palevitz, B.A. (1999).  $\gamma$ -Tubulin in *Chlamydomonas*: Characterization of the gene and localization of the gene product in cells. *Cell Motility Cytoskeleton*, 42, 285-297.
- Smertenko, A., Blume, Y., Viklicky, V. & Draber, P. (1997). Exposure of tubulin structural domains in *Nicotiana tabacum* microtubules probed by monoclonal antibodies. *Eur. J. Cell Biol.*, 72, 104-112.
- Snustad, D.P., Haas, N.A., Kopczak, S.D. & Silflow, C.D. (1992). The small genome of *Arabidopsis* contains at least 9 expressed  $\beta$ -tubulin genes. *Plant Cell*, 4, 549-556.
- Sorri, O., Astrom, H. & Raudaskoski, M. (1996). Actin and tubulin expression and isotype pattern during tobacco pollen tube growth. *Sex. Plant Reprod.*, 9, 255-263.
- Staehelein, L.A. & Giddings, T.H. (1982). Membrane-mediated control of cell wall microfibrillar order. In S. Subtelny and P.B. Green (Eds). *Developmental Order: Its Origins and Regulation* (pp. 133-147). New York.
- Staiger, S.J. & Lloyd, C.W. (1991). The plant cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3, 33-42.
- Stenger, H. (1998). Untersuchungen zur  $\alpha$ -Tubulin Genfamilie der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Stöcker, M., Garcia Mas, J., Arus, P., Messeguer, R. & Puigdomenech, P. (1993). A highly conserved  $\alpha$ -tubulin sequence from *Prunus amygdalus*. *Plant. Mol. Biol.*, 22, 913-916.
- Straus, D.B., Walter, W.A. & Gross, C.A. (1987). The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of  $\sigma^{32}$ . *Nature*, 329, 348-351.
- Taylor, M.A., Wright, F. & Davies, H.V. (1994). Characterization of the cDNA clones of two  $\beta$ -tubulin genes and their expression in the potato plant (*Solanum tuberosum* L.). *Plant. Mol. Biol.*, 26, 1013-1018.
- Thomas, J.H., Neff, N.F. & Botstein, D. (1985). Isolation and characterization of mutations in the  $\beta$ -tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 111, 715-34.
- Thon, M.R. & Royse, D.J. (1999). Partial  $\beta$ -tubulin gene sequences for evolutionary studies in the *Basidiomycotina*. *Mycologia*, 91, 468-474.

- Uribe, X., Torres, M.A., Capellades, M., Puigdomenech, P. & Rigau, J. (1998). Maize  $\alpha$ -tubulin genes are expressed according to specific patterns of cell differentiation. *Plant Mol. Biol.*, 37, 1069-1078.
- Vassilevskaia, T.D., Bekman, E., Jackson, P., Ricardo, C.P. & Rodrigues-Pousada, C. (1996). Developmental expression and regulation by light of two closely related  $\beta$ -tubulin genes in *Lupinus albus*. *Plant Mol. Biol.*, 32, 1185-1189.
- Vaughn, K.C. & Harper, J.D.I. (1998). Microtubule organizing centers and nucleating sites in land plants. *Int. Rev. Cytol.*, 181, 75-149.
- Villasante, A., Wang, D., Dobner, P., Dolph, P., Lewis, S.A. & Cowan, N.J. (1986). Six mouse  $\alpha$ -tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: Testis-specific expression of two sister genes. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 2409-2419.
- Villemur, R., Joyce, C.M., Haas, N.A., Goddard, R.H., Kopczak, S.D., Hussey, P.J., Snustad, D.P. & Silflow, C.D. (1992). A-tubulin gene family of maize (*Zea mays* L.) - evidence for 2 ancient  $\alpha$ -tubulin genes in plants. *J. Mol. Biol.*, 227, 81-96.
- Villemur, R., Haas, N.A., Joyce, C.M., Snustad, D.P. & Silflow, C.D. (1994). Characterization of four new  $\beta$ -tubulin genes and their expression during male flower development in maize (*Zea mays* L.). *Plant. Mol. Biol.*, 24, 295-315.
- Vugrek, O. (1995). Die Myosin-Genfamilie in Pflanzen - Ein Vergleich zwischen der einzelligen Grünalge *Acetabularia cliftoni* S.-L. und der höheren Pflanze *Helianthus annuus* L. Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Ruprechts Karls-Universität Heidelberg.
- Wahl, G.M., Stern, M. & Stark, G.R. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3683-3687.
- Wang, X., Huang, J., Mukherjee, A., Cao, C. & Lutkenhaus, J. (1997). Analysis of the interaction of *FtsZ* with itself, GTP, and *FtsA*. *J. Bacteriol.*, 179, 5551-5559.
- Wehland, J., Schroeder, M. & Weber, K. (1984). Organization of microtubules in stabilized meristematic plant cells revealed by a rat monoclonal antibody reacting only with the tyrosinated form of  $\alpha$ -tubulin. *Cell Biol. Int. Rep.*, 8, 147-150.
- Wernicke, W. & Jung, G. (1992). Role of cytoskeleton in cell shaping of developing mesophyll of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Eur. J. Cell Biol.*, 57, 88-94.
- Wernicke, W., Günther, P. & Jung, G. (1993). Microtubules and cell shaping in the mesophyll of *Nigella damascena* L. *Protoplasma*, 173, 8-12.
- Whittaker, D.J. & Triplett, B.A. (1999). Gene-specific changes in  $\alpha$ -tubulin transcript accumulation in developing cotton fibers. *Plant Physiol.*, 121, 181-188.
- Williamson, R.E. (1993). Organelle movements. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 44, 181-202.

- Wu, L., Ueda, T. & Messing, J. (1993). 3'-end processing of the maize 27 kDa zein mRNA. *Plant J.*, 4, 535-544.
- Wu, L., Ueda, T. & Messing, J. (1994). Sequence and spatial requirements for the tissue- and species-independent 3'-end processing mechanism of plant mRNA. *Mol. Cell Biol.*, 14, 6829-6838.
- Wu, L., Ueda, T. & Messing, J. (1995). The formation of mRNA 3'-ends in plants. *Plant J.*, 8, 323-329.
- Yamada, T., Maki, S. & Higashiyama, T. (1993). Nucleotide sequence of a *Chlorella vulgaris*  $\alpha$ -tubulin gene. *Plant Physiol.*, 103, 1467.
- Yamamoto, E., Zeng, L.H. & Baird, W.V. (1998).  $\alpha$ -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica*. *Plant Cell*, 10, 297-308.
- Yamamoto, E. & Baird, W.V. (1999). Molecular characterization of four  $\beta$ -tubulin genes from dinitroaniline susceptible and resistant biotypes of *Eleusine indica*. *Plant Mol. Biol.*, 39, 45-61.
- Yoshimura, T., Demura, T., Igarashi, M. & Fukuda, H. (1996). Differential expression of three genes for different  $\beta$ -tubulin isotypes during the initial culture of *Zinnia* mesophyll cells that divide and differentiate into tracheary elements. *Plant Cell Physiol.*, 37, 1167-1176.
- Yuan, M., Shaw, P.J., Warn, R.M. & Lloyd, C.W. (1994). Dynamic reorientation of cortical microtubules, from transverse to longitudinal, in living plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 6050-6053.
- Zheng, Y., Jung, M.K. & Oakley, B.R. (1991).  $\gamma$ -tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell*, 65, 817-823.
- Zukowski, D. (1994). Untersuchungen zur Cytomorphogenese der Mesophyllzellen von *Hordeum vulgare* L. und *Triticum aestivum* L. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.





## 7.2 Quellenverweise der Tubulin-Gene

Die Sequenzen, mit denen Sequenzvergleiche und phylogenetischen Analysen durchgeführt wurden, stammen entweder aus der vorliegenden Arbeit oder aus der Genbank. Sie können über die Zugriffsnummern (Accession number) abgerufen werden. Die Zugriffsnummern sind jeweils in Klammern aufgeführt.

### *Arabidopsis thaliana*

$\alpha$ -Tubulin	ATHTUBA (M17189)	LUDWIG et al. (1987)
	ATHTUB1A (M21414)	LUDWIG et al. (1988)
	ATHTUBA2A (M84696)	KOPCZAK et al. (1992)
	ATHTUBA4A (M84697)	KOPCZAK et al. (1992)
	ATHTUBA5A (M84698)	KOPCZAK et al. (1992)
	ATHTUBA6A (M84699)	KOPCZAK et al. (1992)
$\gamma$ -Tubulin	ATTUBG2 (U03990)	LIU et al. (1994)
	ATU02069 (U02069)	LIU et al. (1994)

### *Anemia phyllitidis*

$\alpha$ -Tubulin	APTUBA1A (X69183)	(unveröffentlicht)
	APTUBA2A (X69184)	(unveröffentlicht)
$\gamma$ -Tubulin	APTUBGA (X69188)	FUCHS et al. (1993)

### *Avena sativa*

$\alpha$ -Tubulin	ASATUBULP (X97446)	(unveröffentlicht)
-------------------	--------------------	--------------------

### *Chlamydomonas reinhardtii*

$\alpha$ -Tubulin	CRTBA1A (M11447)	SILFLOW et al. (1985)
	CRTBA2A (M11448)	SILFLOW et al. (1985)
$\gamma$ -Tubulin	CRU31545 (U31545)	SILFLOW et al. (1999)

### *Chlorella vulgaris*

$\alpha$ -Tubulin	CHLTUA1 (D16504)	YAMADA et al. (1993)
-------------------	------------------	----------------------

### *Chloromonas spec.*

$\alpha$ -Tubulin	AF032876 (AF032876)	(unveröffentlicht)
	AF032877 (AF032877)	(unveröffentlicht)

### *Eleusine indica*

$\alpha$ -Tubulin	AF008120 (AF008120)	YAMAMOTO & BAIRD (1999)
	AF008121 (AF008121)	YAMAMOTO & BAIRD (1999)
	AF008122 (AF008122)	YAMAMOTO & BAIRD (1999)

### *Homo sapiens*

$\gamma$ -Tubulin	HUMGTUB (M61764)	ZHENG et al. (1991)
-------------------	------------------	---------------------

***Mus musculus***

$\alpha$ -Tubulin      MUSTUBA2M (M13446)      VILLASANTE et al. (1986)

***Nicotiana tabacum***

$\gamma$ -Tubulin      NTGTUB      KAUTZ (1999)

***Oryza sativa***

$\alpha$ -Tubulin      AF030548 (AF030548)      (unveröffentlicht)  
                          OSTA111 (X91806)      QIN et al. (1997)  
                          OSTA136 (X91807)      QIN et al. (1997)  
                          OSTA274 (X91808)      QIN et al. (1997)  
 $\gamma$ -Tubulin      AF036957 (AF036957)      (unveröffentlicht)

***Pisum sativum***

$\alpha$ -Tubulin      PS12589 (U12589)      BRIERLY et al. (1995)

***Prunus amygdalus***

$\alpha$ -Tubulin      PAATUB (X67162)      STÖCKER et al. (1993)

***Triticum aestivum***

$\alpha$ -Tubulin      TAU76558 (U76558)      (unveröffentlicht)

$\beta$ -Tubulin      TAU76754 (U76754)      (unveröffentlicht)  
                          TAU76895 (U76895)      (unveröffentlicht)  
                          TAU76896 (U76896)      (unveröffentlicht)

***Zea mays***

$\alpha$ -Tubulin      ZMALTUB1(X15704)      MONTOLIU et al. (1990)  
                          ZMALTUB2(X15704)      MONTOLIU et al. (1990)  
                          ZMALTUB3 (X63176)      VILLEMUR et al. (1992)  
                          ZMTUA4 (X73980)      DOLFINI et al. (1993)  
                          ZMALTUB5 (X63177)      VILLEMUR et al. (1992)  
                          ZMALTUB6 (X63178)      VILLEMUR et al. (1992)  
 $\gamma$ -Tubulin      ZMGAMTU (X80375)      LOPEZ et al. (1995)  
                          ZMGAMTUB (X78891)      (unveröffentlicht)

***Volvox carteri***

$\alpha$ -Tubulin      VCA2T (L24546)      MAGES et al. (1988), MAGES et al. (1995)

Jan Schröder  
Am Königsborn 3a  
55126 Mainz

## Lebenslauf

	08.04.1966	geboren in Ravensburg
Schulbildung	Aug. 1973 - Juli 1976 Sept. 1976 - Juli 1977 Sept. 1977 - Juni 1979 Juni 1979 - Juli 1983 Sept. 1983 - Mai 1986 1986	Volksschule Hallbergmoos Volksschule Kipfenberg Willibald-Gymnasium Eichstätt Gymnasium Casimirianum Coburg Liebigsschule Gießen Abitur (Note 1,9)
Zivildienst	Aug. 1986 - März 1988	Mobiler sozialer Hilfsdienst Gießen
Biologiestudium	Sept. 1988 - Sept. 1994 April 1991 Juni 1993 - Sept. 1994  Sept. 1994 Okt. 1994 - Jan. 1995	Justus-Liebig-Universität Gießen Vordiplom (sehr gut) Diplomarbeit zum Thema: „Versuche zur Anreicherung Cytoskelett-assoziiierter Proteine aus <i>Spirogyra crassa</i> und <i>Chara corallina</i> .“ Diplom (sehr gut) Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.
Promotionsstudium	März 1995 - Feb. 2000 März 1995 -	Johannes Gutenberg-Universität Mainz Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Allgemeine Botanik der Johannes-Gutenberg Universität Mainz, Leitung des S1-Genlabors der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Wernicke.