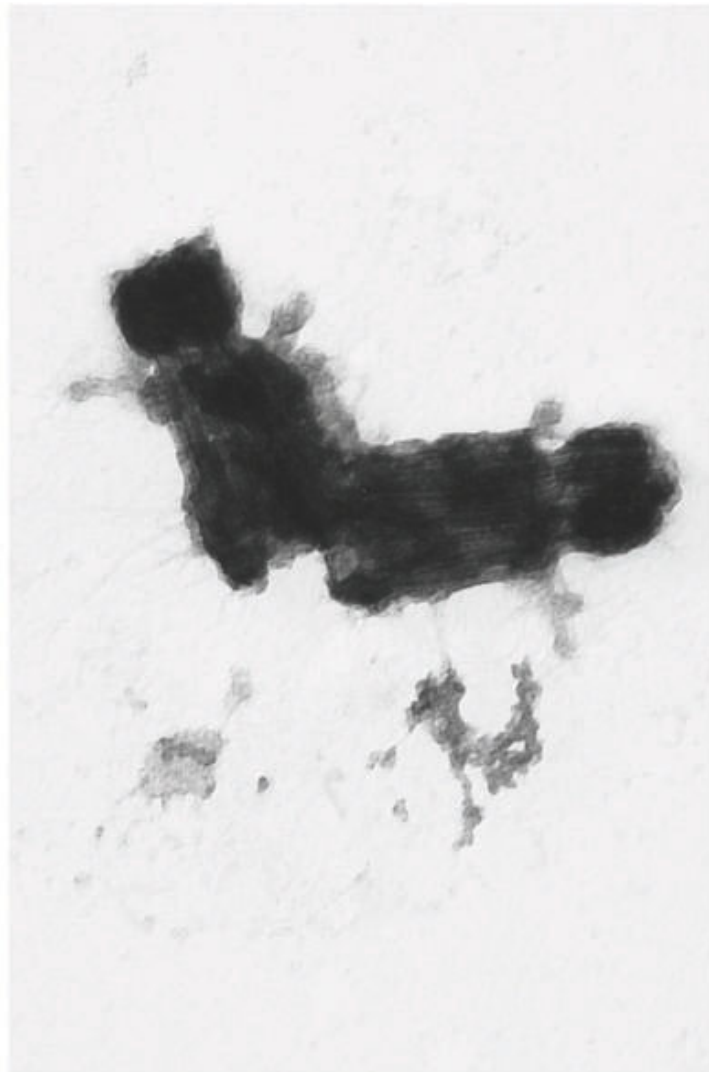


Kerstin Brachhold

---

Das Basalapparat-Subproteom  
von *Chlamydomonas reinhardtii*



Cuvillier Verlag göttingen

**Das Basalapparat-Subproteom von**  
*Chlamydomonas reinhardtii*

**Inaugural-Dissertation**  
**zur**  
**Erlangung des Doktorgrades**  
**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**  
**der Universität zu Köln**

vorgelegt von

**Kerstin Brachhold**

aus Stuttgart

CUVILLIER VERLAG, Göttingen

**2007**

### **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2007

Zugl.: Köln, Univ., Diss., 2007

978-3-86727-188-2

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Melkonian

Prof. Dr. U. I. Flügge

Tag der Disputation: 26.02.2007

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2007

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2007

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-188-2

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Deutsche Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Englische Zusammenfassung/Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als Modellorganismus</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Centrosomen und Centriolen</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3 Der Basalapparat von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b> .....	<b>8</b>
<b>2.4 Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>16</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>18</b>
3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	18
3.1.2 „Kit“-Systeme .....	21
3.1.3 Enzyme .....	21
3.1.4 Antikörper .....	21
3.1.5 Oligonukleotide.....	22
3.1.6 Membranen, Filter, Dialyse .....	22
3.1.7 Standardpuffer und -lösungen .....	22
<b>3.2 Algenstämme und Kulturbedingungen</b> .....	<b>26</b>
3.2.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cw2.....	26
3.2.2 Kulturmedium HSM („high salt concentration medium“)......	27
3.2.3 Kulturmedium TAP (Tris-Acetat-Phosphat).....	28
3.2.4 Sterilisation der Medien.....	28
<b>3.3 Präparative Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.3.1 Isolierung von Basalapparaten.....	29
3.3.2 Präparation von Cytoskeletten für die indirekte Immunfluoreszenz .....	30
3.3.3 Reinigung der rekombinanten Proteine.....	31
3.3.4 Reinigung von IgGs aus Präimmun- und Immunsereen.....	32
<b>3.4 Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>32</b>
3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	32
3.4.2 Coomassie-Färbung von Proteingelen .....	34

3.4.3 Silberfärbung von Proteingelen.....	34
3.4.4 Elektroelution .....	34
3.4.5 Dialysen.....	35
3.4.6 Gefriertrocknung von Proteinen.....	35
3.4.7 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen aus Gelen auf Membranen (Western-Blot).....	35
3.4.8 Ponceau-Färbung von PVDF-Membranen.....	36
3.4.9 Amidoschwarz-Färbung von PVDF-Membranen .....	36
3.4.10 Proteinbestimmung nach Neuhoff.....	36
3.4.11 Proteinbestimmung mit Coomassie Plus-Reagenz.....	37
<b>3.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE).....</b>	<b>37</b>
3.5.1 Probenvorbereitung .....	37
3.5.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	38
3.5.3 Zweite Dimension: Vertikale SDS-PAGE .....	39
<b>3.6 Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>40</b>
3.6.1 Befilmen der Kupfernetzchen .....	40
3.6.2 „whole mount“-Elektronenmikroskopie.....	40
3.6.3 Anfertigung von Präparaten für Ultradünnschnitte .....	40
3.6.4 Kontrastierung der Ultradünnschnitte .....	41
3.6.5 Elektronenmikroskop und Filmmaterial.....	41
<b>3.7 Antikörper .....</b>	<b>42</b>
3.7.1 Gewinnung der Antigene.....	42
3.7.2 Immunisierungen.....	42
<b>3.8 Immunologische Methoden .....</b>	<b>42</b>
3.8.1 Western-Blot .....	42
3.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten.....	43
<b>3.9 Massenspektrometrische Protein-Analytik.....</b>	<b>44</b>
3.9.1 Elektronenspray-Ionisation mit Tandem-MS Technik (ESI-MS/MS) .....	44
3.9.2 MudPIT („multidimensional protein identification technology“ ).....	44
<b>3.10 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>45</b>
3.10.1 Isolierung von Gesamt-RNA.....	45
3.10.2 cDNA-Erststrangsynthese .....	46
3.10.3 Isolierung von DNA (CTAB-Methode) .....	46

3.10.4 Vektoren und Bakterienstämme.....	47
3.10.5 Ligation.....	47
3.10.6 Transformation.....	48
3.10.7 Plasmidpräparation (Miniprep).....	49
3.10.8 Proteinexpression der partiellen cDNAs.....	49
3.10.9 Restriktionsverdau .....	50
3.10.10 Agarosegelelektrophorese.....	51
3.10.11 PCR.....	51
3.10.12 DNA-Sequenzierung.....	53
<b>3.11 Verwendete Datenbanken und Computerprogramme.....</b>	<b>54</b>
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1 Isolierung von Basalapparaten aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2. Ansätze zur Identifikation der Proteine des Basalapparates.....</b>	<b>60</b>
4.2.1 1D-Gel-Ansatz .....	60
4.2.2 MudPIT-Analyse.....	65
4.2.3 2D-Gel-Ansatz .....	69
4.2.4 Kandidaten für weitere Untersuchungen.....	72
<b>4.3 Nähere Charakterisierung von 5 potentiellen Basalapparat-Proteinen .....</b>	<b>77</b>
4.3.1 Kandidat 20: Schließen von genomischen Sequenzlücken.....	77
4.3.2 Klonierung von partiellen cDNAs für 4 Kandidaten .....	80
4.3.3 Umklonierung der partiellen cDNAs in den Expressionsvektor pETBlue-2.....	87
4.3.4 Expression der partiellen cDNAs und Reinigung der rekombinanten Proteine..	87
4.3.5 Western-Blot-Analyse der Antiseren bzw. gereinigten Antikörper.....	92
4.3.6 Lokalisation der 4 Kandidaten durch indirekte Immunfluoreszenz.....	99
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>103</b>
<b>5.1 Isolierung von Basalapparaten aus <i>C. reinhardtii</i>.....</b>	<b>103</b>
<b>5.2 Proteinzusammensetzung isolierter Basalapparate.....</b>	<b>105</b>
<b>5.3 Ansätze zur Identifikation der Proteine des Basalapparates.....</b>	<b>106</b>
<b>5.4 Vergleich der Genmodelle, die bei den unterschiedlichen Ansätzen gefunden wurden .....</b>	<b>108</b>
<b>5.5 Charakterisierung von 5 neuen, potentiellen Basalapparatproteinen .....</b>	<b>115</b>
<b>5.6 Ausblick .....</b>	<b>117</b>

<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>119</b>
<b>7 ANHANG .....</b>	<b>132</b>
7.1 Sequenzen der verwendeten Primer .....	132
7.2 Liste der identifizierten Genmodelle .....	133
<b>8 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....</b>	<b>142</b>
<b>9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>144</b>

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Der Basalapparat der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besteht aus den beiden geißeltragenden Basalkörpern sowie aus zwei Probasalkörpern und assoziierten Fibrillen und Mikrotubuli. Der ultrastrukturelle Aufbau der Basalkörper stimmt weitgehend mit dem der Centriolen tierischer Centrosomen überein: Neun ringförmig angeordnete Mikrotubulitriplets bilden einen Zylinder von ca. 400 nm Länge. In Querschnitten lassen sich verschiedene Strukturen wie das „cartwheel“ im proximalen Bereich der Basalkörper oder die Sternstruktur in der Übergangsregion zur Geißel unterscheiden. Die beiden Basalkörper sind miteinander über Verbindungsfibrillen verbunden und durch die „transitional fibers“ an der Plasmamembran angeheftet. Ausgehend von den Basalkörpern verlaufen die sogenannten Geißelwurzeln ins Zellinnere. Sie verbinden den Basalapparat mit verschiedenen Zellorganellen und sind somit an der inneren Organisation der gesamten Zelle beteiligt. Da über die Proteinzusammensetzung der Basalapparate bisher wenig bekannt war, sollte in dieser Arbeit das Proteom der Basalapparate von *C. reinhardtii* näher charakterisiert werden.

Zur Identifikation der Proteine wurde zunächst eine Reinigungsmethode für Basalapparate von *C. reinhardtii* entwickelt. Die gereinigten Basalapparate wurden anschließend elektrophoretisch in einem 1D-SDS-PAGE aufgetrennt, das komplette Gel in 51 Banden zerschnitten und die Banden massenspektrometrisch analysiert. Dieser erste Ansatz lieferte insgesamt 1123 unterschiedliche Peptide. Die Peptide konnten 124 Genmodellen, aber auch EST-Einträgen sowie genomischen Positionen, an denen sich bisher keine Genmodelle befanden, zugeordnet werden. In einem 2. Ansatz wurde ein Basalapparat-Pellet nach dem MudPIT-Verfahren („multidimensional protein identification technology“) direkt – ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung – untersucht. In diesem Ansatz wurden 450 Peptide in 295 Genmodellen identifiziert. Darüber hinaus wurden Basalapparate reproduzierbar mittels 2D-PAGE in ca. 60-75 Spots aufgetrennt.

Da zu diesem Zeitpunkt bereits eine Veröffentlichung des Proteoms der Basalkörper von *C. reinhardtii* vorlag (ebenfalls durch MudPIT ermittelt), war ein direkter Vergleich der jeweils identifizierten Genmodelle möglich. Der Vergleich der 295 mit dem MudPIT-Verfahren identifizierten Genmodelle mit dieser Veröffentlichung lieferte eine Liste von



35 z.T. bekannten (wie z.B.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, Centrin) und neuen, potentiellen Basalapparatproteinen.

Im Folgenden wurden fünf dieser neuen, potentiellen Basalapparatproteine, die bei den unterschiedlichen Ansätzen (1D-Gel-Ansatz und MudPIT-Verfahren) mit mehreren Peptiden identifiziert worden waren, näher charakterisiert. Einer dieser Kandidaten ist fälschlicherweise als mitochondrialer Translationsfaktor annotiert; hier wurden vermutlich zwei unterschiedliche Gene zu einem Modell zusammengefaßt. Für diesen Kandidaten wurde eine genomische Sequenzlücke geschlossen. Für die vier anderen Kandidaten wurden partielle cDNAs kloniert und zunächst sequenziert. Der Vergleich dieser Sequenzen mit den Genmodellen führte bei Kandidat 90 zur Entdeckung von zwei neuen Exons. Bei Kandidat 27 stellte sich heraus, dass Exon 6 um 42 bp länger ist als im Genmodell angegeben. Die cDNAs wurden in *E. coli* überexprimiert und die rekombinanten Proteine zur Erzeugung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen verwendet. In Western-Blots reagierten die Antikörper sowohl mit dem rekombinanten Protein der Bakterien als auch mit entsprechenden Proteinen in isolierten Basalapparaten. Drei der Proteine konnten mit Hilfe der Antikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie im Bereich des Basalapparates lokalisiert werden.

## 1.2 Englische Zusammenfassung/Abstract

The basal apparatus of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* consists of the two flagella-bearing basal bodies, two probasal bodies and numerous associated fibers and microtubules. The ultrastructure of the basal bodies bears resemblance to the centrioles found in animal centrosomes: nine microtubular triplets are arranged in a ring and form a cylinder with a length of about 400 nm. In cross-sections different structures like the cartwheel in the proximal region of the basal bodies or the stellate structure in the transition region towards the flagellum can be identified. The basal bodies are connected by connecting fibers and anchored to the plasmamembrane via the transitional fibers. From the basal bodies the so-called microtubular roots extend into the interior of the cell. They link the basal apparatus to different cell organelles and thus are involved in the internal organization of the entire cell. As rather little was known so far about the protein composition of the basal apparatus, the work presented here aimed at characterizing the proteome of the basal apparatus of *C. reinhardtii*.

To identify the proteins a purification method for the basal apparatus of *C. reinhardtii* was developed in a first step. The purified basal apparatus were then electrophoretically separated on a 1D-SDS-PAGE, the complete lane was cut into 51 slices and all slices were analyzed by mass spectrometry. This first approach resulted in 1123 different peptides. The peptides could be assigned to 124 gene models but also to EST-entries and genomic positions for which no gene models existed so far. In a second approach a basal apparatus pellet was directly analyzed by MudPIT (multidimensional protein identification technology) – without prior electrophoretic separation. In this approach 450 peptides in 295 gene models were identified. Furthermore basal apparatus were reproducibly separated into 60-75 spots via 2D-PAGE.

At this timepoint there was already a publication of the basal body proteom of *C. reinhardtii* (also determined by MudPIT) and therefore a direct comparison of the identified gene models was possible. Comparing the 295 gene models from the MudPIT-approach with this publication resulted in a list of 35 already known (like  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin, centrin) and new potential basal body proteins.

In the following five of these potential basal body proteins that had been identified with several peptides in the different approaches (1D-gel-approach and MudPIT-approaches) were further characterized. One of these candidates is wrongly annotated as mitochondrial translation factor; here two different genes were probably combined into one model.

For this candidate a genomic sequence gap was closed. For the other four candidates partial cDNAs were cloned and sequenced. The comparison of these sequences with the predicted gene models led – in the case of candidate 90 – to the identification of two new exons. Exon 6 of candidate 27 was found to be 42 bp longer than predicted in the gene model. The cDNAs were overexpressed in *E. coli* and the recombinant proteins were used to generate polyclonal antibodies in rabbits. In Western-Blot-analyses these antibodies not only detected the recombinant protein from the bacteria but also gave a signal on isolated basal apparatus. Three of the proteins could be localized to the basal apparatus in immunofluorescence-microscopy.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 *Chlamydomonas reinhardtii* als Modellorganismus

*Chlamydomonas reinhardtii* ist eine zweigeißelige, einzellige Grünalge mit einer Länge von ca. 10 µm. Sie besitzt einen großen becherförmigen Chloroplasten mit Pyrenoid, und ihre Zellwand besteht hauptsächlich aus Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen (Harris, 2001). Aufgrund der folgenden Vorteile ist *C. reinhardtii* als Modellorganismus mittlerweile gut etabliert:

1. *C. reinhardtii* wächst leicht in Massenkulturen heran. Die Kulturen können sowohl photoautotroph als auch heterotroph (mit Acetat als Kohlenstoffquelle) angezogen werden.
2. Die vegetativen Zellen sind in der Regel haploid und kommen in zwei unterschiedlichen Paarungstypen vor (bezeichnet mit  $mt^+$  und  $mt^-$ ). Bei Stickstoffmangel entwickeln sich Gameten aus den vegetativen Zellen. Zwei Gameten unterschiedlichen Paarungstyps können zu einer Zygote verschmelzen, die anschließend unter Reduktionsteilung auskeimt. Alle vier Meioseprodukte können in einer Tetradenanalyse untersucht werden, was *C. reinhardtii* für genetische Untersuchungen interessant macht.
3. Es sind zahlreiche Mutanten bekannt, deren Analyse bei der Aufklärung von Stoffwechselwegen helfen kann. Besonders auf dem Gebiet der Photosynthese erwies sich *C. reinhardtii* als geeigneter Modellorganismus (Levine, 1960; de Vitry und Vallon, 1999; Cahoon und Timko, 2000).
4. Das Genom ist sequenziert und über das „Joint Genome Institute“ (JGI) im Internet frei verfügbar (für Version 2.0: <http://genome.jgi-psf.org/chlre2/chlre2.home.html>). Die Größe des Genoms umfaßt ca.  $1 \times 10^8$  bp (Harris, 1989). Neben den genomischen Daten existieren auch EST-Datenbanken (z.B.: <http://www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/>).
5. Die gängigen molekularbiologischen Methoden sind bei *C. reinhardtii* anwendbar. Sowohl das Kerngenom (Kindle et al., 1989; Kindle, 1990) als auch das Chloroplasten- (Boynton et al., 1988) und Mitochondriengenom (Randolph-Anderson et al., 1993) sind transformierbar. Außerdem lassen sich Gene durch

„RNA silencing“ ausschalten (Übersichtsartikel: Schroda, 2006). Lokalisationsstudien mit *Chlamydomonas*-adaptierten GFP-Konstrukten sind ebenfalls möglich (Fuhrmann et al., 1999; Lehtreck et al., 2002; Ruiz-Binder et al., 2002).

Auch für Forschungen am Cytoskelett ist *C. reinhardtii* bestens geeignet. So wurde z.B. der „intraflagellar transport“ (IFT), der für den Aufbau und Erhalt der Geißeln verantwortlich ist, ursprünglich in dieser Alge entdeckt (Kozminski et al., 1993; Cole et al., 1998; Rosenbaum et al., 1999). Die Proteinzusammensetzung eukaryotischer Geißeln wird ebenfalls schon seit einiger Zeit mit Hilfe dieser Alge erforscht (Piperno et al., 1977; Luck 1984). Erleichtert werden diese Untersuchungen durch die Tatsache, dass sich die Geißeln von *C. reinhardtii* leicht durch pH-Schock und anschließende Zentrifugation von den Zellkörpern trennen lassen und man somit hochreine Geißelpräparationen erhalten kann. Eine weitere Auftrennung isolierter Geißeln in Membran- und Axonemenfraktion ist mit Hilfe nichtionischer Detergenzien möglich (Witman et al., 1972).

Die Veröffentlichung des Geißelproteoms (Pazour et al., 2005) zeigte, dass *C. reinhardtii* auch als Modellorganismus für die Erforschung menschlicher Krankheiten nützlich sein kann. So wurden z.B. Homologe für Polycystin und Fibrocystin gefunden, die bei bestimmten Formen von „polycystic kidney disease“ (PKD) mutiert sind (Pazour, 2004). Des Weiteren fanden sich Homologe für Hydin und Napa, die – wenn sie mutiert sind – einen Wasserkopf (Hydrocephalus) bei Mäusen hervorrufen (Davy und Robinson, 2003; Chae et al., 2004; Hong et al., 2004). Darüber hinaus wurden mehrere Homologe für Proteine identifiziert, die für männliche Sterilität bei Mäusen verantwortlich gemacht werden.

## 2.2 Centrosomen und Centriolen

Schon vor über 100 Jahren wurden Centrosomen von Theodor Boveri betrachtet und intensiv studiert (Boveri, 1901). Benannt wurden diese etwa 1 µm großen Strukturen aufgrund ihrer zentralen Lage innerhalb von Interphase-Zellen. Sie organisieren die räumliche Anordnung der Mikrotubuli nicht nur während der Interphase, sondern auch während der Mitose und können daher auch als wichtigstes mikrotubuliorganisierendes Zentrum (MTOC) der Zelle bezeichnet werden (Kellog et al., 1994). Der Centrosomenzyklus ist strikt mit dem Zellzyklus koordiniert (Doxsey, 2001). Vor der

Mitose verdoppeln sich die Centrosomen, und die beiden Tochtercentrosomen wandern zu entgegengesetzten Polen. Dort sorgen sie für die Ausbildung der bipolaren Mitosespindel und schließlich für die korrekte Verteilung der Chromosomen während der Mitose. Kommt es zu Störungen innerhalb dieses Zyklus, so können Spindeln mit mehreren bzw. mit nur einem Pol entstehen (Doxsey, 1998). Bei monopolen Spindeln ist eine korrekte Verteilung der Chromosomen nicht mehr gewährleistet, was zu einem Stop der Zellteilung führen kann. Als Folge von multipolaren Spindeln können ganze Chromosomen „verloren“ gehen, weil diese evtl. auf mehr als eine Tochterzelle verteilt werden. Darüber hinaus ist es denkbar, dass es durch die aus mehreren Richtungen auf das Chromosom einwirkenden Kräfte zu Chromosomenbrüchen kommt. Durch all diese Szenarien würden Tochterzellen mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen entstehen, was letztendlich zu genetischer Instabilität führt (Doxsey, 1998; Marshall, 2001). Abnormale Centrosomen, die Aneuploidie und genetische Instabilität hervorrufen können, wurden in vielen Krebszellen beobachtet (Übersichtsartikel: Salisbury et al., 1999).

Trotz ihrer konservierten Funktion (der Nukleation von Mikrotubuli) zeigen Centrosomen aus unterschiedlichen Organismen große Unterschiede bezüglich ihrer Morphologie. Acentrioläre Centrosomen findet man beim Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (den sogenannten kernassoziierten Körper oder „nucleus-associated body“; Kalt und Schliwa, 1993) und auch bei *Saccharomyces cerevisiae* (Spindelpolkkörper oder „spindle pole body“; Winey und Byers, 1992). Der Spindelpolkkörper (SPB) der Hefe ist eine mehrschichtige Struktur, die in die Kernmembran eingebettet ist (Byers et al., 1978).

Bei pflanzlichen Zellen gibt es kein klar strukturiertes Centrosom oder MTOC (Lambert, 1993). Viel eher scheint es sich um ein „flexibles Centrosom“ (Mazia, 1987) zu handeln, das seine Struktur während des Zellzyklus verändert. Außerdem wurde gezeigt, dass die Kernoberfläche das aktivste MTOC der Pflanze ist (Lambert, 1993).

Bei der Mehrzahl der tierischen Organismen besteht das Centrosom aus einem Centriolenpaar, das in pericentrioläres Material (PCM) eingebettet ist. Das PCM ist eine dynamische Region, die röhrenartig rund um die Centriolen strukturiert ist. Es wird vermutet, dass das PCM eine gewisse Polarität aufweist und dass die Stabilität der an unterschiedlichen Regionen des PCM gebildeten Mikrotubuli mit dem Zellzyklus variiert (Ou et al., 2004). Die Organisation des PCM wird durch das Vorhandensein der Centriolen beeinflusst. Werden die Centriolen z.B. experimentell entfernt, so löst sich das PCM – und mit ihm das Centrosom – auf (Bobinnec et al., 1998). Die meisten Mikrotubuli der

Interphase und des Spindelapparates werden nicht an den Centriolen, sondern im PCM nukleiert (Gould und Borisy, 1977). Hierbei spielt  $\gamma$ -Tubulin, das ursprünglich in dem filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans* entdeckt wurde (Oakley und Oakley, 1989), eine wichtige Rolle. In *Drosophila*-Centrosomen ist  $\gamma$ -Tubulin in ringähnlichen Strukturen lokalisiert, die Kontakt zu Mikrotubulienden haben (Moritz et al., 1995 a,b). In Extrakten von *Xenopus*-Eiern formt  $\gamma$ -Tubulin – zusammen mit Pericentrin – einen großen Proteinkomplex, der mit seinem netzartigen Gitter die Basis für die Nukleation der Mikrotubuli bilden könnte (Dictenberg et al., 1998).

Centriolen sind zylindrische, polare Strukturen, die aus neun ringförmig angeordneten Mikrotubulitriplets aufgebaut sind. Das distale Ende ist durch die Plusenden der Mikrotubuli gekennzeichnet, wohingegen das proximale Ende eine wagenradförmige Struktur, das sogenannte „cartwheel“, enthält (Marshall, 2001). Entlang einer der beiden Centriolen finden sich besondere Strukturen. Dazu gehören die distalen Anhänge, die an alle neun Mikrotubulitriplets assoziiert sind (Paintrand et al., 1992) und die sogenannten Satelliten, die über keilförmige, filamentöse Strukturen mit dem Centriol verbunden sind. In Interphasezellen sind die meisten Mikrotubuli mit ihren Minusenden in diesen Satelliten eingebettet (Vorobjev und Chentsov, 1982).

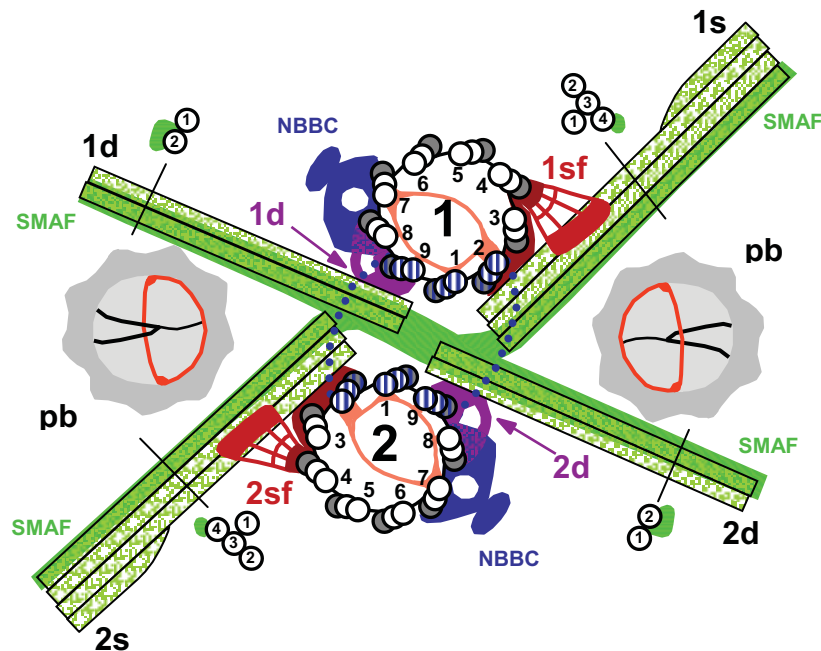
Bei tierischen Zellen ist eines der beiden Centriolen am distalen Ende gelegentlich mit einer unbeweglichen, primären Geißel (9+0-Axonema) assoziiert. Dieses Centriol wird dann als reif oder ausgewachsen bezeichnet und das andere Centriol als unreif (Rieder und Borisy, 1982). Vor der Mitose wird in der Nähe des proximalen Endes beider Centriolen je ein neues Centriol (Procentriol) gebildet und das unreife Centriol wird in ein reifes umgewandelt (Lange und Gull, 1995). Die Verteilung der Centriolen während der Mitose erfolgt dann semikonservativ, d.h. jede Tochterzelle erhält ein altes und ein junges Centriol (Kochanski und Borisy, 1990). Mittlerweile ist die Abfolge der Schritte, die bei der Bildung der Tochtercentriolen und der anschließenden Zellteilung eine wichtige Rolle spielen, näher untersucht worden. Auch einige der dabei beteiligten Proteine sind inzwischen identifiziert worden (zusammenfassend: Marshall, 2001; Beisson und Wright, 2003). Der Aufbau neuer Centriolen beginnt, wenn die Zellen in die S-Phase kommen und scheint die Aktivität bestimmter Kinasen zu benötigen. Ist z.B. in *C. elegans* die mit dem Centrosom assoziierte Kinase ZYG-1 mutiert, so können die Centriolen nicht mehr verdoppelt werden (O’Connell et al., 2001). Als erste sichtbare Struktur des neuen

Centriols ist in *Paramecium* die sogenannte „generative Scheibe“ („generative disc“) beschrieben worden (Dippell, 1968). Als nächstes wird ein Ring aus 9 einzelnen A-Mikrotubuli angelegt. Durch die Addition der B- und schließlich C-Mikrotubuli entsteht dann die typische Struktur mit den 9 ringförmig angeordneten Mikrotubulitriplets, die im nächsten Schritt verlängert wird (Marshall, 2001). Vor der Mitose kommt es zur Trennung der beiden Centriolenpaare, was durch die Phosphorylierung von Centrin ausgelöst zu werden scheint (Lutz et al., 2001). Nach der Mitose lösen sich die jungen Centriolen von den alten. An diesem Prozess ist vermutlich Ubiquitin-abhängige Proteolyse beteiligt (Freed et al., 1999). Schließlich besteht in der G1-Phase die Möglichkeit, dass die Centriolen zu geißeltragenden Basalkörpern umgewandelt werden. Hierzu muss die sogenannte Übergangsregion angelegt werden (s.u.).

Centriolen können jedoch nicht nur in der Nähe bereits existierender Centriolen gebildet werden (s.o.), sondern es wurde auch eine de novo-Synthese beschrieben. Diese de novo-Synthese findet man bei Protisten (Fulton und Dingle, 1971; Grimes, 1973), unbefruchteten Seeigelleiern (Miki-Noumura, 1977; Kallenbach, 1985), niederen Pflanzen (Mizukami und Gall, 1966) und bei der Maus (Szollosi et al., 1972). Auch im Lebenszyklus von *C. reinhardtii* gibt es Stadien, wo es zu einer Neubildung von Centriolen kommt. In Zygoten lösen sich die Basalkörper und assoziierten Strukturen vollständig auf. Erst bei der Keimung der Zygosporangie, nachdem die Meiose begonnen hat, treten diese Strukturen wieder auf (Cavalier-Smith, 1974). Die genauen Mechanismen der de novo-Synthese sind bisher ungeklärt. Es wurde allerdings gezeigt, dass diese Synthese während der S-Phase des Zellzyklus stattfindet (Marshall et al., 2001). Die genauere Untersuchung von bestimmten *C. reinhardtii* Mutanten könnte bei der Aufklärung dieser Frage von Nutzen sein.

### **2.3 Der Basalapparat von *Chlamydomonas reinhardtii***

Der Basalapparat von *C. reinhardtii* besteht aus den beiden geißeltragenden Basalkörpern sowie aus 2 Probasalkörpern und einer ganzen Reihe assoziierter Mikrotubuli und Fibrillen (s. Abb. 1). Der ultrastrukturelle Aufbau der Basalkörper stimmt weitgehend mit dem der Centriolen tierischer Centrosomen überein (Burgos und Fawcett, 1956). Auch funktional übernehmen die Basalkörper die Rolle der Centriolen. Vor dem Eintritt in die Mitose resorbiert *C. reinhardtii* die beiden Geißeln (Johnson und Porter, 1968; Cavalier-Smith, 1974), und die Basalkörper werden an die Spindelpole verlagert (Gaffal, 1988; Marshall und Rosenbaum, 2000).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Basalapparates von *C. reinhardtii*

Querschnitt durch den Basalapparat (aus Geimer und Melkonian, 2004): Dargestellt sind die beiden Basalkörper (bezeichnet mit 1 und 2), die Probaskörper (pb), sowie die zwei- und viersträngigen Geißelwurzeln (1d, 2d, 1s, 2s) mit den assoziierten „striated microtubule associated fibres“ (SMAF) in grün. Die distale Verbindungsfasrille ist durch die gestrichelte blaue Linie angedeutet und die Triplets, an die sie angeheftet ist, sind blau schraffiert. Ebenfalls eingezeichnet sind die linken (in rot, 1sf und 2sf) und rechten (in lila, 1d und 2d) Fibrillen, die die Basalkörper mit den vier- bzw. zweisträngigen Geißelwurzeln verbinden. In den Probaskörpern ist die Eichel („acorn“, in rot) sowie das V-förmige Filamentsystem zu sehen. In den Basalkörpern ist die Eichel, die eigentlich nicht in dieser Ebene zu sehen ist, ebenfalls zum besseren Verständnis ihrer Lage eingezeichnet.

Erste ultrastrukturelle Studien zum Aufbau des Basalapparates von *C. reinhardtii* fanden bereits vor über 30 Jahren statt (Ringo, 1967; Cavalier-Smith, 1974). Ausgehend von den beiden Basalkörpern ziehen vier- und zweisträngige mikrotubuläre Geißelwurzeln kreuzförmig nach dem 4-2-4-2-Schema ins Zellinnere (Goodenough und Weiss, 1978). Sie verbinden den Basalapparat mit verschiedenen Zellorganellen (Augenfleck, kontraktile Vakuole, Golgiapparat) und sind somit an der inneren Organisation der gesamten Zelle beteiligt. Neben den mikrotubulären findet man auch noch 2 Typen von fibrillären Geißelwurzeln: System-I- und System-II-Fibrillen (Melkonian, 1980). Die System-I-Fibrillen sind aus 2 nm-Filamenten aufgebaut und mit den mikrotubulären Geißelwurzeln assoziiert. Sie werden auch als SMAFs bezeichnet („striated microtubule-associated fibers“) und sind aus SF-Assemblin aufgebaut. Die System-II-Fibrillen erstrecken sich von

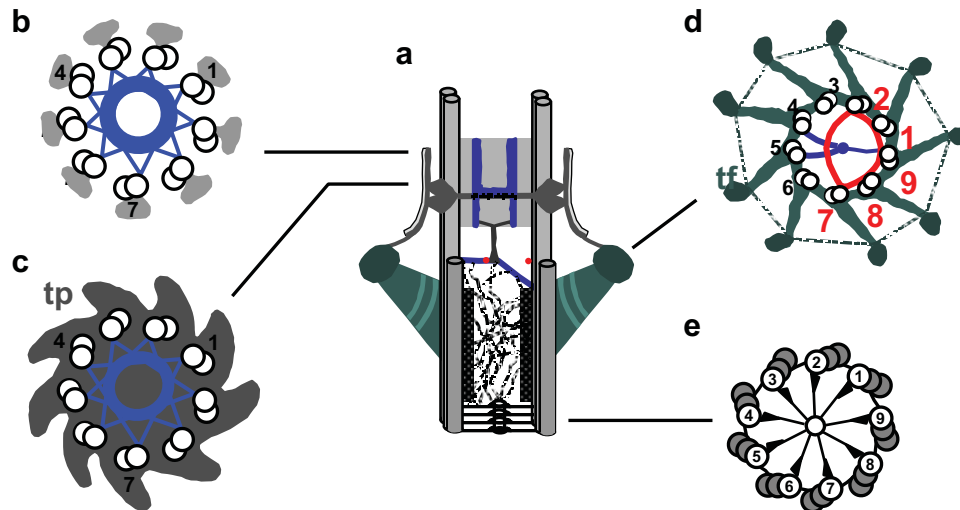


den Basalkörpern ins Cytoplasma und sind oft mit dem Zellkern verbunden. Sie werden dann auch als „nucleus basal body connector“ (NBBC) bezeichnet (Wright et al., 1985). Darüber hinaus gibt es noch linke Fibrillen, die die Basalkörper mit den viersträngigen Geißelwurzeln verbinden sowie rechte Fibrillen, die eine Verbindung zu den zweisträngigen Wurzeln herstellen.

Die beiden Basalkörper sind distal über eine quergestreifte Verbindungsfibrille miteinander verbunden, und am proximalen Ende befinden sich 2 weitere Verbindungsfibrillen (Ringo, 1967). Vor kurzem wurde die Existenz einer dritten proximalen Verbindungsfibrille zwischen den beiden Basalkörpern von *C. reinhardtii* beschrieben (Geimer und Melkonian, 2004). Diese „mediane proximale Verbindungsfibrille“ wurde bei Zoosporen der Grünalge *Chlorosarcinopsis* entdeckt (Melkonian, 1978) und ist – im Gegensatz zu den beiden anderen proximalen Verbindungsfibrillen – nicht quergestreift.

Die Basalkörper selbst sind etwa 400 nm lange, zylindrische Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 200 nm. In Querschnitten lassen sich von den Basalkörpern zu den Geißeln folgende Strukturen unterscheiden (s. Abb. 2 ):

1. Eine wagenradförmige Struktur, das sogenannte „cartwheel“ (Abb. 2 e): Um einen zentralen Tubulus („Nabe“) herum sind 9 Mikrotubulitriplets rotationssymmetrisch angeordnet, wobei der A-Mikrotubulus eines jeden Triplets über ein Filament („Speiche“) mit dem zentralen Tubulus verbunden ist. Diese Struktur wird bereits in den Probasalkörpern angelegt.
2. „Eigentlicher“ Basalkörper: Der zentrale Tubulus des „cartwheels“ ist nicht mehr vorhanden, außen sind weiterhin die Mikrotubulitriplets vorhanden. In diesem Bereich befinden sich auch die distale Verbindungsfibrille und die sogenannten „transitional fibers“. Diese Fibrillen sind an allen 9 Mikrotubulitriplets assoziiert und verankern die Basalkörper an der Plasmamembran.
3. Übergangsregion („transition region“) zwischen „eigentlichem“ Basalkörper und Geißel. Im Längsschnitt erscheint diese Region H-förmig. Im Querschnitt kann man eine proximale und distale Sternstruktur (Lang, 1963) und die dazwischenliegende „transitional plate“ unterscheiden (Abb. 2 b und c). Im Bereich der Übergangsregion sind nur noch Mikrotubulidupletts (aus A- und B-Mikrotubulus) vorhanden, die sich dann auch in den Geißeln weiter fortsetzen.



**Abb. 2: Längs- und Querschnitte durch einen Basalkörper von *C. reinhardtii***

Die Zeichnungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Geimer zur Verfügung gestellt (modifiziert nach Geimer und Melkonian, 2004).

a: Längsschnitt. In blau dargestellt ist die H-förmige Übergangsregion. Die roten Punkte kennzeichnen die Lokalisation der Eichel. Auf dieser Höhe ist auch die V-förmige Struktur (ebenfalls blau) zu sehen. Am proximalen Ende des Basalkörpers ist das „cartwheel“ erkennbar.

b-e: unterschiedliche Querschnitte von distal nach proximal

b: Distale Sternstruktur

c: „Transitional plate“

d: Querschnitt auf Höhe der „transitional fibers“ (tf). Die Eichel (rot) ist mit ganz bestimmten Mikrotubulidupletts assoziiert. In blau ist die V-förmige Struktur dargestellt.

e: „Cartwheel“. Die A-Mikrotubuli der Triplets sind über ein Filament mit dem zentralen Tubulus verbunden.

Trotz intensiver ultrastruktureller Untersuchung der Basalapparate, wurde erst vor kurzem mit der Eichel („acorn“) eine neue Struktur in den Basalkörpern entdeckt, die einen frühen Marker für radiale Asymmetrie darstellt (Geimer und Melkonian, 2004). In Querschnitten stellt sich die Eichel als ein Filament von ca. 10 nm Durchmesser dar, das am distalen Ende des Basalkörpers (im Bereich des Übergangs von Triplets zu Dupletts) an ganz spezifischen Dupletts verankert ist (Abb. 2 d). Neben der Eichel wurde ein zweites, V-förmiges System von Filamenten in der gleichen Region entdeckt, das ebenfalls mit speziellen Mikrotubuli verbunden ist. In Längsschnitten zeigte sich, dass dieses zweite System darüber hinaus mit einem weiteren Filament assoziiert ist, welches im rechten

Winkel zur V-Struktur verläuft und sich ausgehend von der Sternstruktur nach unten in das Lumen des Basalkörpers erstreckt (Abb. 2 a). Diese beiden neu entdeckten Filamentsysteme sind bereits in den Probasalkörpern angelegt (Geimer und Melkonian, 2004).

Die Basalapparate werden aber nicht nur ultrastrukturell, sondern auch hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung intensiv untersucht. So sind mittlerweile einige Proteine samt ihrer Lokalisation bekannt. Neben  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, die als Heterodimere die Protofilamente der Mikrotubuli aufbauen, wurden im Lauf der Zeit weitere Tubuline entdeckt (Übersichtsartikel: Dutcher, 2003). Das bereits erwähnte  $\gamma$ -Tubulin findet sich auch bei *C. reinhardtii* und konnte durch indirekte Immunfluoreszenz und Immunogold-elektronenmikroskopie in der Nähe der Basalkörper nachgewiesen werden (Dibbayawan et al., 1995; Silflow et al., 1999). Ein weiteres Mitglied der Tubulinfamilie ist  $\delta$ -Tubulin, das in *Chlamydomonas* als Produkt des *UNI3*-Gens identifiziert wurde (Dutcher und Trabuco, 1998). Ist *UNI3* mutiert, so findet sich neben Zellen mit 2 Geißeln auch ein erhöhter Anteil an Zellen, die nur eine oder gar keine Geißel besitzen und bei denen die Positionierung der Teilungsfurche gestört ist. Darüber hinaus deckte die elektronenmikroskopische Untersuchung weitere strukturelle Unterschiede zu Wildtyp-Zellen auf: Am proximalen Ende wiesen die Basalkörper Mikrotubulidupletts statt der üblichen Triplets auf (Dutcher und Trabuco, 1998). Die Sternstruktur, die normalerweise in der Übergangsregion zu finden ist, wurde auch in der proximalen Region der Basalkörper entdeckt, und es kam zur Ausbildung von unvollständigen distalen Verbindungsfibrillen (O'Toole et al., 2003). Vor kurzem wurde  $\epsilon$ -Tubulin identifiziert und konnte dem *BLD2*-Gen zugeordnet werden. Durch Immunfluoreszenz wurde eine Lokalisation an den Basalkörpern nachgewiesen (Dutcher et al., 2002). Die Auswirkungen einer Mutation dieses Gens sind schon seit langem bekannt (Goodenough und St. Clair, 1975). *Bld2*-Zellen besitzen keine Geißeln (daher auch ihr Name *bld* = „bald“), und die Anordnung der mikrotubulären Geißelwurzeln und der Teilungsfurche sind gestört. Ein Großteil der Zellen scheint keine Basalkörper zu besitzen (Ehler et al., 1995). Sind diese jedoch vorhanden, so bestehen sie aus einem Ring von 9 einzelnen Mikrotubuli statt der üblichen Triplets (Goodenough und St. Clair, 1975). Daher wird vermutet, dass  $\epsilon$ -Tubulin für den Aufbau bzw. die Stabilisierung der Dupletts bzw. Triplets benötigt wird.

Centrin (auch bekannt als Caltractin), das erstmals in der Grünalge *Tetraselmis striata* identifiziert wurde (Salisbury et al., 1984), ist ein 20 kDa-Protein aus der Familie der

Calcium-bindenden EF-Hand-Proteine mit Verwandtschaft zu den Calmodulinen (Huang et al., 1988). Inzwischen sind die Protein- bzw. cDNA-Sequenzen von Centrinen und Centrinhomologen aus den unterschiedlichsten Organismen bekannt: *Homo sapiens* (Lee und Huang, 1993; Errabolu et al., 1994), *Mus musculus* (Ogawa und Shimizu, 1993), den Protozoen *Naegleria gruberi* (Levy et al., 1996) und *Giardia lamblia* (Meng et al., 1996), den Grünalgen *Spermatozopsis similis* (Bhattacharya et al., 1993; Steinkötter, 1997) und *Scherffelia dubia* (Bhattacharya et al., 1993) sowie aus höheren Pflanzen (Cordeiro et al., 1998). Bei Protisten ist Centrin oft Bestandteil eines filamentösen Motilitätssystems. Die Calciumbindung an Centrin führt vermutlich zu einem „supercoiling“ von Filamenten und damit zur schnellen Kontraktion des Systems. Die Relaxation erfolgt vergleichsweise langsam und erfordert die ATP-vermittelte Entfernung der Calciumionen (Melkonian et al., 1992). In *C. reinhardtii* ist Centrin hauptsächlich in den folgenden drei Strukturen des Basalapparates lokalisiert: in der distalen Verbindungsfibrille, dem „nucleus basal body connector“ (NBBC) und in den beiden Sternstrukturen der Übergangsregion (Wright et al., 1985; Schulze et al., 1987; Salisbury et al., 1988; Sanders und Salisbury, 1989). Unter Verwendung eines GFP-Fusionsproteins konnten nicht nur in-vivo-Lokalisationsstudien durchgeführt, sondern die Centrin-Lokalisation auch während der Zellteilung beobachtet werden (Ruiz-Binder et al., 2002). Erst vor kurzem wurde Centrin durch Immunogoldelektronenmikroskopie in weiteren Strukturen des Basalapparates nachgewiesen: in den „transitional fibers“, im Lumen der Basalkörper und im V-förmigen Filamentsystem (Geimer und Melkonian, 2005). Sämtliche Centrin-haltige Strukturen bilden somit ein Gerüst, welches sich vom Zellkern bis zur Basis der Geißeln erstreckt. Eine Mutation (ein G nach A-Basenaustausch) des Centringens *VFL2* führt zu Defekten in der Sternstruktur, der distalen Verbindungsfibrille und im NBBC. Darüber hinaus besitzen diese Zellen eine variable Anzahl von Geißeln (VFL steht für „variable flagella number“) und sind in der korrekten Positionierung und der Verteilung der Basalkörper auf die Tochterzellen gestört (Wright et al., 1985; Jarvik und Suhan, 1991; Taillon et al., 1992). Außerdem zeigt diese Mutante ein gestörtes Phototaxis- und aberrantes Schwimmverhalten (Kuchka und Jarvik, 1982). Wird die Expression von Centrin durch einen RNAi-Ansatz extrem reduziert (auf ca. 5 %), beobachtet man einen ähnlichen Phänotyp wie bei der *vfl2*-Mutante: eine variable Anzahl von Geißeln sowie Defekte der Centrin-haltigen Strukturen (Koblenz et al., 2003). Allerdings treten hier vermehrt Zellen ohne Geißeln auf. Des weiteren wurden zahlreiche Basalkörper ohne bzw. mit nur sehr kurzen Geißeln gefunden.

Neben Centrin gibt es zwei weitere *VFL*-Gene, die bisher allerdings weniger gut charakterisiert sind. *VFL1* kodiert ein 128 kDa-Protein, das am distalen Ende im Lumen der Basalkörper lokalisiert ist (Silflow et al., 2001). Die Immunogoldelektronenmikroskopie zeigte eine asymmetrische Verteilung der Goldpartikel, mit einer Häufung auf der Seite, die jeweils zum anderen Basalkörper zeigt. Diese Verteilung korreliert mit der oben beschriebenen Eichel (Geimer und Melkonian, 2004). Vfl1p könnte daher Teil dieser Struktur sein und eine Rolle bei der korrekten Anordnung der beiden Basalkörper zueinander spielen. Ist *VFL1* mutiert, so finden sich Zellen mit bis zu 10 Geißeln (Adams et al., 1985). Außerdem besitzen diese Mutanten eine veränderte distale Verbindungsfibrille (oder diese fehlt komplett) und eine reduzierte Anzahl von Geißelwurzeln. Darüber hinaus zeigten sie eine große Variabilität bezüglich der Zellgröße. Die *vfl3*-Mutante zeichnet sich ebenfalls durch fehlende oder unvollständig ausgebildete Verbindungsfibrillen zwischen den beiden Basalkörpern aus (Wright et al., 1983). Des Weiteren waren der Abstand und Winkel zwischen den Basalkörpern äußerst variabel.

Ein weiteres, bereits bekanntes Protein ist SF-Assemblin, das in den „striated microtubule-associated fibers“ (SMAFs) lokalisiert ist und das in der Grünalge *Spermatozopsis similis* erstmals gefunden wurde (Lechtreck und Melkonian, 1991; Weber et al., 1993). Ein polyklonaler Antikörper gegen SF-Assemblin aus *S. similis*, der exklusiv mit den SMAFs von *S. similis* (Lechtreck und Melkonian, 1991) und *D. bioculata* reagiert (Lechtreck et al., 1996), wurde für die Lokalisation des *C. reinhardtii*-Proteins über indirekte Immunfluoreszenz verwendet (Lechtreck und Silflow, 1997). Es zeigte sich, dass SF-Assemblin mit allen 4 mikrotubulären Geißelwurzeln, sowohl in vegetativen Zellen als auch in Gameten, verbunden ist. Um die Verteilung von SF-Assemblin während des Zellzyklus näher zu untersuchen, wurden Doppelfluoreszenzen mit anti-Tubulin/anti-SF-Assemblin durchgeführt. Die beobachteten Veränderungen des Cytoskeletts legen nahe, dass SF-Assemblin eine Rolle beim Aufbau und der Positionierung der mikrotubulären Geißelwurzeln spielt. Für weitere *in vivo*-Studien wurde *C. reinhardtii* mit einem Fusionskonstrukt aus GFP und SF-Assemblin transformiert (Lechtreck et al., 2002). Die GFP-markierten Fibrillen waren größer als die Wildtyp-Fibrillen und depolymerisierten bei Hitzeschock. Mit Hilfe von Deletionen wurde darüber hinaus gezeigt, dass der C-Terminus eine entscheidende Rolle bei der Bildung der SMAFs spielt. Des Weiteren wurde die Expression von SF-Assemblin über Antisense-Konstrukte stark verringert. Diese Stämme zeigten oft Zellen mit weniger als 2 Geißeln. Daher wird vermutet, dass SF-Assemblin

bzw. die SMAFs eine Funktion beim Zusammenbau bzw. der Aufrechterhaltung der Geißeln haben.

In einem Screen von ca. 10.000 Mutanten für Zellen, die keine Geißeln ausbilden, wurde der *BLD10*-Lokus identifiziert (Matsuura et al., 2004). *Bld10*-Mutanten zeigen Mitosedefekte mit aberranten Spindeln und gestörter Mikrotubuliorganisation innerhalb der Zelle. Außerdem scheinen Basalkörper völlig zu fehlen. *BLD10* kodiert ein 170 kDa großes „coiled-coil“-Protein, das mit Hilfe von Immunogoldelektronenmikroskopie am „cartwheel“ lokalisiert werden konnte. Daher wird angenommen, dass Bld10p eine essentielle Rolle in den frühen Stadien des Aufbaus der Basalkörper spielt.

In der Grünalge *Spermatozopsis similis* wurden 2 weitere Proteine des Basalapparates identifiziert: BAp90 und BAp95 (Geimer et al., 1998 a,b). Beide Proteine kommen vermutlich auch in *C. reinhardtii* vor, da die polyklonalen Antikörper, die gegen die *S. similis*-Proteine erzeugt wurden, in der indirekten Immunfluoreszenz auch bei isolierten Cytoskeletonen von *C. reinhardtii* ein Signal ergaben. BAp90 ist ein 90 kDa-Protein, das durch Immunogoldelektronenmikroskopie vor allem in den proximalen Platten („proximal plates“) zwischen den beiden Basalkörpern in *S. similis* lokalisiert wurde (Geimer et al., 1998 a). Das zweite Protein, BAp95, ist in den gestreiften sf-Fibrillen lokalisiert, die die Basalkörper mit den 5-strängigen Geißelwurzeln verbinden (Geimer et al., 1998 b). Das rekombinante Protein war in der Lage, in-vitro gestreifte Fibrillen mit einer Periodizität von 98 nm auszubilden und scheint daher der Hauptbestandteil der sf-Fibrillen in *S. similis* zu sein.

Nicht nur einzelne Proteine des Basalapparates sind mittlerweile identifiziert worden; es gibt auch erste Veröffentlichungen zur Erfassung des gesamten Proteoms. In einem vergleichenden Bioinformatikansatz (Li et al., 2004) wurde zunächst ein gemeinsames Proteom von *C. reinhardtii* und *H. sapiens* gebildet. Von diesem wurde dann das Proteom von *A. thaliana* abgezogen. Dadurch wurden fast 700 Proteine identifiziert, die ausschließlich in Organismen mit Geißeln und Basalkörpern vorkommen. In diesem FABB-Proteom („Flagellar Apparatus-Basal Body“-Proteom) befanden sich 88 % der bereits von *C. reinhardtii* bekannten Geißel- und Basalkörperproteine. Mit Hilfe von quantitativer RT-PCR und eines RNAi-Ansatzes wurden die Daten validiert und neue potentielle Geißel- und Basalkörperproteine identifiziert. In einem zweiten Ansatz (Keller et al., 2005) wurden gereinigte Basalkörper massenspektrometrisch mit dem MudPIT-Verfahren („multidimensional protein identification technology“) analysiert. Hierbei wurde

nicht nur die Fraktion gemessen, die die Basalkörper enthielt, sondern auch 2 benachbarte Fraktionen wurden der MudPIT-Analyse unterzogen. Proteine, die sich in allen 3 Fraktionen befanden, wurden als Kontaminationen gewertet und von der Basalkörperfraktion subtrahiert. Auch mit diesem Verfahren wurde die Mehrzahl der bereits bekannten Centriolen-/Basalkörperproteine entdeckt. Darüber hinaus wurden 45 bisher nicht annotierte Proteine in der Basalkörperfraktion identifiziert. Des Weiteren wurden 2 unterschiedliche Klassen von Proteinen definiert: BUG („basal-body proteins with upregulated genes“) und POC („proteome of centriole“). Die BUG-Proteine werden von Genen kodiert, deren Expression bei der Regeneration von Geißeln hochreguliert ist, und die daher vermutlich eine Rolle beim Zusammenbau oder der Funktion der Geißeln spielen. Die POC-Proteine wurden durch Datenbankvergleiche validiert (z.B. mit Proteomdaten menschlicher Centrosomen und Geißeln). Ihre Expression ist bei der Geißelregeneration nicht hochreguliert. Schließlich wurden GFP-Konstrukte mit 2 BUG- und 2 POC-Proteinen transient in HeLa-Zellen exprimiert und so ihre Lokalisation an den Centriolen nachgewiesen.

## 2.4 Fragestellung der Arbeit

Obwohl Centriolen bzw. Basalapparate schon seit Jahrzehnten intensiv untersucht werden, ist über ihre Proteinzusammensetzung bisher eher wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das Proteom der Basalapparate von *Chlamydomonas reinhardtii* näher zu charakterisieren. In einem ersten Schritt sollte eine Reinigungsmethode für dieses Organell entwickelt werden, um möglichst sauberes Material in präparativem Maßstab zur Verfügung zu haben. Als Ausgangspunkt diente ein Protokoll, das zur Isolation von Basalapparaten aus der einzelligen Grünalge *Spermatozopsis similis* entwickelt wurde (Geimer, 1998). Um Kontaminationen mit Zellwandresten zu minimieren und um den Zellaufschluß zu erleichtern, wurde mit einer Zellwandmutante von *C. reinhardtii* (cw2) gearbeitet.

Zur Identifikation der Proteine sollten massenspektrometrische Verfahren angewendet werden. Die Proteine sollten dabei zunächst elektrophoretisch getrennt werden (über 1D- und 2D-Gele), um einzelne Banden bzw. Spots zu untersuchen. Auch die direkte Analyse eines Basalapparatpellets mittels MudPIT („multidimensional protein identification technology“) wurde vorgenommen. Einige bisher unbekannte Proteine sollten anschließend näher charakterisiert werden. Dazu wurden diese in *E. coli* überexprimiert, um die

rekombinanten Proteine für die Erzeugung polyklonaler Antikörper zu verwenden. Mit Hilfe dieser Antikörper sollten Lokalisationsstudien (indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie) durchgeführt werden.



## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	Merck
Acrylamid: N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5 : 1), Rotiphorese Gel 30	Roth
Agar	Fluka
Agarose NA	Amersham
Agarose	PeqLab
Amidoschwarz 10 B	Serva
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Fisher
Ammoniummolybdat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O)	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	ICN
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Roth
5-Brom-4-Chlor-3-Indolphosphat-Toluidinsalz (X-Phosphat)	Roth
5-Brom-4-Chlor-3-Indol-β-D-Galaktopyranosid (X-Gal)	AppliChem
Bromphenolblau	Sigma
iso-Butanol	Baker
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Merck
Carbenicillin	Sigma
CHAPS (PlusOne)	Amersham
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Roth
2,4-Diazobicyclo-[2.2.2]-oktan (DABCO)	Sigma
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT PlusOne)	Amersham
DNA-Probenpuffer (6 x)	Fermentas
DNA-Standard: MassRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas
DryStrip Cover Fluid (PlusOne)	Amersham
Eisensulfat (FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Merck

Epon 812	Serva
Essigsäure (CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H)	Roth
Ethanol	AppliChem
Ethidiumbromid	AppliChem
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (Na <sub>2</sub> -EDTA; Titriplex III)	Merck
Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Fischgelatine	Sigma
Formaldehyd	Sigma
Formaldehyd (EM-grade), 16 %	Serva
D(+)-Glucose-Monohydrat (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> x H <sub>2</sub> O)	Merck
Glutaraldehyd (EM-grade), 25 %	Serva
Glycerol, 87 % (PlusOne)	Amersham
Glycin	ICN
Harnstoff (PlusOne)	Amersham
Hefeextrakt	Difco
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure (HEPES)	Roth
Immobiline DryStrip Gele	Amersham
Iodacetamid	Fluka
IPG-Puffer	Amersham
Isopropanol	Merck
Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid (IPTG)	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck
Kobalt(II)-chlorid-Hexahydrat (CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	Merck
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Roth
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O)	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma

Methanol	AppliChem
3-Methyl-1-butanol (Isoamylalkohol)	Sigma
Natriumacetat-Trihydrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Merck
Natriumcitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck
Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )	Merck
Natriumthiosulfat-Pentahydrat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )	Roth
4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid (NBT)	Roth
Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ )	Plano
PEG 400	AppliChem
Pioloform	Plano
Poly-L-Lysin-Lösung	Sigma
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Sigma
Ponceau-S	Sigma
Propylenoxid	Serva
Salzsäure ( $\text{HCl}$ )	Roth
Saccharose	MP Biomedicals
SDS-Proteinstandards: PageRuler Protein Ladder	Fermentas
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas
Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ )	Roth
Serva Blau G-250 (Coomassie Brilliant Blau)	Serva
Tetracyclin	AppliChem
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (Temed)	Roth
Thioharnstoff	Fluka
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, PlusOne)	Amersham
Tris-HCl	Roth
Triton X-100	Sigma
Trizol-Reagenz	Invitrogen

Trypton	AppliChem
Uranylacetat	TAAB
Wasser (HPLC-Qualität)	Sigma
Zinksulfat (ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Merck

### 3.1.2 „Kit“-Systeme

Coomassie Plus – The Better Bradford™ Assay Kit	Pierce
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
pGEM–T Easy Vector System	Promega
His-Bind Kit	Novagen
BugBuster Protein Extraction Reagent	Novagen
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	ABI
pETBlue-2 Perfectly Blunt Cloning Kit	Novagen
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas

### 3.1.3 Enzyme

EcoRV (10 U/μl)	Gibco BRL
NotI (10 U/μl)	Fermentas
T4 DNA-Ligase (1 U/μl)	Gibco BRL
Benzonase Nuklease (25 U/μl)	Novagen
rLysozym (30 U/μl)	Novagen
High Fidelity PCR Enzyme Mix (5 U/μl)	Fermentas
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Biotherm

### 3.1.4 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Monoklonal Maus Anti-α-Tubulin (DM-1A)	ICN
Monoklonal Maus Anti-„His-Tag“	Novagen

#### Sekundäre Antikörper

Ziege Anti-Kaninchen-IgG (H+L) Alkalische Phosphatase-Konjugat	Sigma
Ziege Anti-Maus-IgG (H+L) Alkalische Phosphatase-Konjugat	Sigma

Ziege Anti-Kaninchen-IgG Cy3-Konjugat	Dionova
Ziege Anti-Maus-IgG Cy3-Konjugat	Dionova

### 3.1.5 Oligonukleotide

Sämtliche Primer wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

### 3.1.6 Membranen, Filter, Dialyse

Chromatographie Papier 3MM Chr	Whatman
D-Tube Dialyzer Maxi, MWCO 12-14 kDa	Novagen
Mikrodialysemembran (Typ US, Porengröße 0,025 µm)	Millipore
Immobilon-P PVDF-Membran (0,45 µm)	Millipore
Celluloseacetatmembran (12200)	Sartorius
Elutrap-Membran BT 1 (glycerinfeucht)	Schleicher & Schuell
Bio-Trap-Membran BT 2 (trocken)	Schleicher & Schuell
Sterilfilter Minisart (Porengröße 0,2 bzw. 0,45 µm)	Sartorius

### 3.1.7 Standardpuffer und -lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	90 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	0,1 % (w/v) Amidoschwarz 10 B
Amidoschwarz-Entfärbelösung	90 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 9,5
	100 mM NaCl
	5 mM MgCl <sub>2</sub>
Bindepuffer	0,02 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0
	0,05 % Natriumazid
Blockpuffer (Western-Blot)	TBS-Tween mit 3 % (w/v) Fischgelatine

Blockpuffer (Immunfluoreszenz)	Na-PBS-Puffer mit 0,05 % (v/v) Tween 20 3 % (w/v) BSA 0,1 % (v/v) Fischgelatine pH 7,4
Coomassie-Färbelösung	10 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Methanol 0,1 % (w/v) Serva Blau G-250
Coomassie-Entfärbelösung	7 % (v/v) Essigsäure 10 % (v/v) Methanol
CTAB-Puffer	2 % (w/v) CTAB 1,4 M NaCl 20 mM EDTA 10 mM Tris-HCl, pH 8 0,2 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol (wurde jeweils frisch zugegeben)
2D-Agarose	0,5 % (w/v) Agarose NA 0,002 % (w/v) Bromphenolblau in SDS-Elektrophoresepuffer
2D-Equilibrierungspuffer	6 M Harnstoff 50 mM Tris 2 % (w/v) SDS 30 % (v/v) Glycerol
2D-Gelüberschichtungspuffer	0,375 M Tris, pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS

2D-Probenpuffer	9 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % (w/v) CHAPS 60 mM DTT 2 % (v/v) IPG-Puffer 0,002 % (w/v) Bromphenolblau
2D-Rehydratationspuffer	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 2 % (w/v) CHAPS 100 mM DTT 2 % (v/v) IPG-Puffer 0,002 % (w/v) Bromphenolblau
Elutionspuffer	0,1 M Natriumcitrat, pH 3,0 0,05 % Natriumazid
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Agar
LB-Medium	5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 10 g/l Trypton pH 7,0 eingestellt mit NaOH
MT-Puffer	30 mM HEPES 15 mM KCl 5 mM EGTA pH 7,0 eingestellt mit KOH
MT <sup>Mg<sup>2+</sup></sup> -Puffer	MT-Puffer mit 5 mM MgSO <sub>4</sub>
Na-PBS-Puffer	150 mM NaCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 eingestellt mit NaOH

Na-PBS-Tween	Na-PBS-Puffer mit 0,05 % (v/v) Tween 20
NBT-Stammlösung	75 mg NBT in 1 ml 70 % (v/v) DMF
Ponceau S-Färbelösung	3 % (v/v) Essigsäure 0,2 % (w/v) Ponceau-S
Protein-Probenpuffer (4 x) (SDS-Probenpuffer)	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 4 mM EDTA 40 % (v/v) Glycerin 8 % (w/v) SDS 2 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,8 % (w/v) SDS
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Stabilisierungspuffer	5 % (w/v) DABCO in einem Gemisch aus Na-PBS-Puffer und Glycerol (1:2)
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris 5,7 % (v/v) Essigsäure 50 mM EDTA, pH 8,0
TBS-Puffer	50 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,5 eingestellt mit HCl
TBS-Tween	TBS-Puffer mit 0,05 % (v/v) Tween 20



TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 2 mM EDTA
TE-Lysispuffer	TE-Puffer mit 3 % (v/v) Triton X-100
Transferpuffer (Western-Blot)	96 mM Glycin 12 mM Tris 10 % (v/v) Methanol
Trenngelbutter	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,8 % (w/v) SDS
X-Gal-Stammlösung	50 mg X-Gal in 1 ml DMF
X-Phosphat-Stammlösung	50 mg X-Phosphat in 1 ml DMF

## 3.2 Algenstämme und Kulturbedingungen

### 3.2.1 *Chlamydomonas reinhardtii* cw2

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm von *Chlamydomonas reinhardtii* wird in der Stammsammlung des Chlamydomonas Centers unter der Stammnummer CC-851 geführt (für Online-Bestellungen: chlamy@duke.edu). Es handelt sich hierbei um einen axenischen unialgalen Stamm aus der Gruppe der Zellwandmutanten. Der cw2 Stamm gehört zur Klasse A der Zellwandmutanten. Dies bedeutet, dass mit dem Wildtyp vergleichbare Mengen an Zellwandmaterial produziert werden, die Zellwand aber nicht mit der Plasmamembran verbunden ist (Harris, 1989).

Die für die Immunfluoreszenz verwendeten Algen wurden in sterilisiertem TAP-Medium kultiviert, für alle übrigen Kulturen wurde sterilisiertes HSM („high salt medium“) verwendet. *C. reinhardtii* wurde als 50 ml-Stammkultur in nicht belüfteten 100 ml-Erlenmeyerkolben angezogen. Eine solche Stammkultur diente als Inokulum für 2 Marburg-Gefäße. Die Marburg-Gefäße enthielten 600 ml Medium und wurden mit 0,25 l Luft/min steril belüftet. Nach 7-10 Tagen Wachstum wurden mit jeder Marburg-Flasche zwei 10 l-Kulturgefäße angeimpft. Die Massenkultur erfolgte nach dem Batch-Verfahren (Becker, 1987); die 10 l-Flaschen wurden hierbei mit 1 l Luft/min steril belüftet. Nach 10 Tagen erfolgte die erste Ernte, wobei ca. 2-3 l Algenkultur in den Gefäßen verblieben.

Die 10 l-Flaschen wurden über einen Sterilfilter mit frischem HSM auf 10 l aufgefüllt. Im Abstand von 7 und 14 Tagen erfolgten 2 weitere Ernten, bevor neue Massenkulturen angesetzt wurden.

Alle Handhabungen mit geöffneten Kulturgefäßen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Algen wurden bei einer Temperatur von  $15\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  und einem Beleuchtungszyklus von 14 h Licht und 10 h Dunkelheit kultiviert. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren des Typs „universal white“ (Osram, L58 W/25) und „warm white“ (Osram, L 58 W/31) im Verhältnis 1:1, mit einer durchschnittlichen Lichtintensität von  $20\text{-}40\text{ }\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ .

### 3.2.2 Kulturmedium HSM („high salt concentration medium“)

Dieses Medium (Sueoka, 1960) enthält die folgenden Komponenten:

Stammlösung	Endkonzentration im Medium
1. $\text{NH}_4\text{Cl}$	0,5 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{ H}_2\text{O}$	0,2 g/l
2. $\text{CaCl}_2 \times 2\text{ H}_2\text{O}$	0,015 g/l
3. $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{ H}_2\text{O}$	1,44 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,72 g/l
4. $\text{H}_3\text{BO}_3$	0,5 mg/l
5. $\text{MnCl}_2 \times 4\text{ H}_2\text{O}$	0,5 mg/l
6. $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{ H}_2\text{O}$	0,2 mg/l
7. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{ H}_2\text{O}$	0,02 mg/l
8. $\text{FeSO}_4 \times 7\text{ H}_2\text{O}$	6,9 mg/l
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (Titriplex III)	9,3 mg/l

Der pH-Wert des Mediums wurde mit konzentrierter HCl auf 6,95 eingestellt.

Um 100 ml der Stammlösung 8. herzustellen, wurden beide Substanzen in 80 ml A. dest. gelöst, unter Rühren aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 100 ml aufgefüllt.

### 3.2.3 Kulturmedium TAP (Tris-Acetat-Phosphat)

Dieses Medium (Gorman und Levine, 1965) enthält Acetat, das von *C. reinhardtii* zum heterotrophen Wachstum verwendet werden kann. In TAP kultivierte Zellen vermehren sich daher schneller und unabhängig vom Licht.

Dieses Medium setzt sich wie folgt zusammen:

Stammlösung	Endkonzentration im Medium
1. NH <sub>4</sub> Cl	0,4 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
2. CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	50 mg/l
3. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	108 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	56 mg/l
4. Tris	2,42 g/l
5. Essigsäure	1 ml (0,1 % (v/v))
6. Na <sub>2</sub> -EDTA (Titriplex III)	50 mg/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	4,9 mg/l
KOH	16 mg/l
7. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,4 mg/l
8. ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	22 mg/l
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	5 mg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,61 mg/l
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	1,57 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,1 mg/l

Der pH-Wert des Mediums wurde mit konzentrierter Essigsäure auf 7,0 eingestellt.

### 3.2.4 Sterilisation der Medien

In den 100 ml-Erlenmeyerkolben und den Marburg-Gefäßen wurde das Medium autoklaviert (20 min, 121 °C) und bis zur weiteren Verwendung bei 15 °C gelagert. In den 10 l-Kulturgefäßen wurde das Medium mit Kühlintervallen von 24 h dreimal tyndalisiert (3 h, 100 °C).

### 3.3 Präparative Methoden

#### 3.3.1 Isolierung von Basalapparaten

Ca. 35 bis 40 l Kulturvolumen einer Zelldichte von ca.  $6$  bis  $7 \times 10^5$  Zellen/ml wurden über Tangentialdurchflußfiltration (Millipore, Pellicon-Tangentialfluß-Kassettensystem, Filtertyp HVLP 000 C5, Porengröße  $0,45 \mu\text{m}$ ) eingeeengt und mit ca. 2 l HSM vom Filter eluiert. Die Zellsuspension wurde mit  $490 \times g$  (DuPont, Sorvall, RC 5B, GS-3,  $1.700 \text{ upm}$ ) für 15 min bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit HSM gewaschen und erneut wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 180 ml TE-Puffer resuspendiert. Um die Zellen zu entgeißeln wurde die pH-Schock-Methode angewendet. Dazu wurde die Suspension unter Rühren (Magnetrührer,  $300 \text{ upm}$ ) auf Eis durch schnelle Zugabe von 2,5 %iger Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,5 gebracht. Nach ca. 2 min wurde der pH-Wert durch Zugabe von 0,5 M KOH innerhalb von 10 bis 15 sek wieder auf ca. 7,0 bis 7,5 gebracht. Die Suspension wurde auf 50 ml Falcon-Gefäße verteilt und für 5 min bei  $190 \times g$  zentrifugiert (Hettich, ROTIXA/K,  $1.800 \text{ upm}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Der Überstand mit den Geißeln wurde durch vorsichtiges Abgießen entfernt, die Zellkörper in TE-Puffer resuspendiert und erneut wie beschrieben (s.o.) zentrifugiert. Jedes der 4 Pellets wurde anschließend in 20 ml TE-Puffer resuspendiert, und die Suspension wurde dann einer PEG-400-Behandlung unterzogen (modifiziert nach Gould, 1975). Dazu wurden die Zellen durch ca. 50 ml PEG-400 (in einem 250 ml Becherglas) „hindurchpipettiert“. Mit einer 10 ml Plastikpipette wurde direkt der Boden des Becherglases berührt und die Zellen langsam entlassen. Die Zellen stiegen durch das PEG nach oben und sammelten sich als abgegrenzte Schicht oberhalb des PEGs an. Nachdem die ganze Zellsuspension durch das PEG hindurch nach oben gestiegen war, wurde diese Schicht sofort wieder entnommen und auf Eis gelagert. Im Mikroskop zeigten die Zellen nun deutliche Veränderungen ihrer äußeren Struktur (sie waren nicht mehr rund sondern eher „verschrumpelt“). Die anschließende Lyse fand unter Rühren (Magnetrührer,  $300 \text{ upm}$ ) auf Eis statt: Zunächst wurden 100 ml eiskalter TE-Lysispuffer in einem Becherglas vorgelegt. Die PEG-behandelten Zellen wurden hinzugegeben und 5 bis 10 min gerührt. Der Erfolg der Lyse wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Die lysierten Zellen wurden vorsichtig in 50 ml Falcon-Gefäße überführt, die bereits jeweils 5 ml 50 %ige Saccharose enthielten, und für 30 min bei  $600 \times g$  ungebremst zentrifugiert (Hettich, ROTIXA/K,  $2.400 \text{ upm}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Das gelbliche Material an der Phasengrenze (ca. 5 ml) wurde mit einer Pasteurpipette

entnommen, durch auf- und abpipettieren homogenisiert und mit TE-Puffer auf 15 ml aufgefüllt. Diese Suspension wurde auf 2 diskontinuierliche Saccharosegradienten verteilt, die sich folgendermaßen zusammensetzten:

6 ml 20 %ige Saccharose

10 ml 30 %ige Saccharose

9 ml 40 %ige Saccharose

5 ml 50 %ige Saccharose

Sämtliche Saccharoselösungen wurden (w/w) in TE mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 und 0,05 % (w/v) Natriumazid angesetzt.

Nach einer zweistündigen Zentrifugation bei 12.400 x g (DuPont, Sorvall, RC 5B, HB-4, 8.700 upm, 4 °C, ungebremst) wurden die Basalapparate direkt unterhalb der 30 %/40 %-Phasengrenze mit einer Pasteurpipette entnommen (pro Gradient ca. 1,5 ml). Einige µl dieser Fraktion wurden für 1 h gegen MT-Puffer dialysiert (siehe 3.4.5), um sie später elektronenmikroskopisch zu überprüfen (siehe 3.6.2). Die restlichen Basalapparate wurden mit MT-Puffer versetzt und bei 38.700 x g pelletiert (DuPont, Sorvall, RC 5B, SS-34, 18.000 upm, 4 °C, 1 h). Das Pellet wurde nach einer kurzen Lufttrocknung bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.3.2 Präparation von Cytoskeletten für die indirekte Immunfluoreszenz

Die Zellen einer Kultur von *C. reinhardtii* cw2 wurden bei RT in Spitzboden-Reagenzgläsern bei 100 x g pelletiert (Hereaus Labofuge Ae, Stufe 2, 850 upm, 10 min) und in MT<sup>Mg<sup>2+</sup></sup>-Puffer resuspendiert. Die Zugabe von Magnesium zum MT-Puffer erhält das Kerncytoskelett, was das spätere Auffinden der Cytoskelette im Mikroskop erleichtert. Nach einer erneuten Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen in MT<sup>Mg<sup>2+</sup></sup>-Puffer resuspendiert und auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden durch Zugabe des gleichen Volumens MT<sup>Mg<sup>2+</sup></sup>-Puffer mit 3 % Triton X-100 lysiert und die Lyse wurde nach ca. 5-15 min auf Eis lichtmikroskopisch überprüft. Die Cytoskelette wurden durch Zugabe des gleichen Volumens 6 % Formaldehyd in MT<sup>Mg<sup>2+</sup></sup>-Puffer für ca. 15 min auf Eis fixiert. Mit dieser Suspension wurde die indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt (s. 3.8.2).

### 3.3.3 Reinigung der rekombinanten Proteine

#### Aufarbeitung der Bakterien

Die Aufarbeitung der Bakterien erfolgte mit Hilfe des BugBuster-Reagenz von Novagen nach Herstellerangaben. Die Bakterienpellets wurden zunächst in BugBuster-Reagenz (mit Benzonase Nuklease und rLysozym) gelöst und unter Schütteln (400 upm) für 10-20 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 16.000 x g (Sigma, 1K15, 13.375 upm, 20 min, 4 °C), um die unlöslichen Zellbestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Befand sich das rekombinante Protein in der löslichen Phase, so wurde der Überstand direkt für die Reinigung des Proteins über die Nickelsäule eingesetzt (s.u.). Lag das rekombinante Protein in den „inclusion bodies“ (unlösliche Phase) vor, wurde das Pellet in dem gleichen Volumen BugBuster-Reagenz gelöst (ohne Benzonase Nuklease und rLysozym), das ursprünglich zum Lösen der Bakterienpellets verwendet worden war. Anschließend wurde rLysozym so zugegeben, dass sich eine Konzentration des Enzyms von 1 U/ml ergab. Das Ganze wurde durch vorsichtiges Vortexen gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurde das sechsfache Volumen von 1:10 verdünntem BugBuster-Reagenz hinzugegeben und für 1 min gevortext. Es folgte eine Zentrifugation von 15 min bei 4 °C und 5.000 x g (Sorvall, RC 5B, SLA TC600, 5.500 upm). Das Pellet wurde wieder in 1:10 verdünntem BugBuster gelöst. Dazu wurde das halbe Volumen der ursprünglich eingesetzten Menge verwendet. Die Lösung wurde erneut für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (Sigma, 1K15, 5.000 x g, 7.477 upm), das Pellet abermals in 1:10 verdünntem BugBuster gelöst (s.o.) und wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde ein letztes Mal resuspendiert und für 15 min bei 4 °C und 16.000 x g (Sigma, 1K15, 13.375 upm) zentrifugiert. Das so gereinigte „inclusion bodies“-Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

#### Reinigung des rekombinanten Proteins über eine Nickel-Säule

Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgte mit Hilfe des His-Bind-„Kits“ von Novagen. Es wurden Säulen mit einem Volumen von 2,5 ml gepacktem Material verwendet. Zunächst wurde die Säule nach Herstellerangaben vorbereitet. Befand sich das rekombinante Protein in der löslichen Phase, so wurde der Überstand (s.o.) direkt auf die vorbereitete Säule aufgetragen. Das Waschen und die Elution erfolgten wie im Protokoll beschrieben, wobei bei der Elution 10 Fraktionen von je 1,5 ml gesammelt wurden. Wenn das rekombinante Protein in den „inclusion bodies“ vorlag, wurde das Pellet (s.o.) in

Bindepuffer mit 6 M Harnstoff gelöst und vor dem Auftragen auf die Säule für 1-1,5 h auf Eis inkubiert. In diesem Fall erfolgten alle Schritte (wie auch das Vorbereiten der Säule) unter denaturierenden Bedingungen (mit 6 M Harnstoff) wie im Protokoll beschrieben.

### **3.3.4 Reinigung von IgGs aus Präimmun- und Immunsereen**

Die von den Firmen gelieferten Seren waren zur Konservierung mit 0,02 % Thimerosal versetzt und wurden bis zur Reinigung der IgGs bei 4 °C gelagert. Sämtliche für die Reinigung verwendeten Pufferlösungen sowie auch die Seren wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm). Die filtrierten Seren wurden zunächst mit Hilfe von PD-10 Entsalzungssäulen (GE Healthcare; 8,3 ml Säulenvolumen) entsalzt. In einem ersten Schritt wurden die Säulen mit 25 ml Bindepuffer equilibriert. Dann wurden 2,5 ml filtriertes Serum auf die Säulen gegeben, gefolgt von 2,5 ml Bindepuffer. Das Serum wurde anschließend mit 3,5 ml Bindepuffer eluiert. Für die Reinigung der IgGs aus den so vorbereiteten Seren wurde eine Protein-A-Säule verwendet (HiTrap rProtein AFF, 1 ml Säulenvolumen, GE Healthcare). Zunächst wurden 10 ml Bindepuffer auf die Säule gegeben, gefolgt von 2 ml entsalztem Serum. Es folgte ein Waschschriff mit 10 ml Bindepuffer, bevor die IgGs mit 2 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert wurden. Zur Neutralisation wurden die IgGs sofort mit Tris-HCl pH 9,0 versetzt (ca. 150 µl auf die 2 ml). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Coomassie Plus-Reagenz bestimmt und die IgGs in Aliquots bei -20 °C eingefroren.

## **3.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli, 1970). Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer gelöst, für 5-10 min bei 100 °C in einem Heizblock aufgeköcht und 5 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415 C, 15.800 x g, 14.000 upm, RT).

#### **Minigele**

Die Gele hatten eine Höhe von 6,5 cm (ca. 0,5 cm Dichtungs-, 4,5 cm Trenn- und 1,5 cm Sammelgel), eine Breite von 8 cm und eine Dicke von 0,1 cm. Um ein Auslaufen der Gele zu verhindern wurde zunächst ein Dichtungsgel folgender Zusammensetzung gegossen:

1,5 ml Acrylamid (Rotiphorese 30 von Roth), 10 µl Temed und 15 µl APS (10 %ig). In der Regel wurden 12 %ige Trenngele verwendet, die sich folgendermaßen zusammensetzten: 1,35 ml Trenngelpuffer, 1,65 ml A. dest., 2 ml Acrylamid, 10 µl Temed und 20 µl APS. Für andere Konzentrationen wurden entsprechend geänderte Mengen an Acrylamid und A. dest. eingesetzt. Die Trenngele polymerisierten für ca. 2 h bei RT (mit iso-Butanol überschichtet), bevor das 4 %ige Sammelgel gegossen wurde (bestehend aus: 0,95 ml Sammelgelpuffer, 2,1 ml A. dest., 0,47 ml Acrylamid, 10 µl Temed und 20 µl APS). Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA/Gel (100-350 V) für ca. 1 h in einer Apparatur, die in der Feinmechanischen Werkstatt des Botanischen Instituts der Universität zu Köln angefertigt worden war (Stromversorgung durch das Power Pac 1.000 von Bio-Rad).

### **Präparative Gele**

Zur weiteren Reinigung der rekombinanten Proteine im Anschluß an die Nickel-Säule (s. 3.3.3) wurden präparative Gele mit einer Höhe von 16 cm (0,5-1 cm 1 % Agarose, 12 cm Trenngel und 3-4 cm Sammelgel) eingesetzt. Es wurden 12 %ige Sammel- und 4 %ige Trenngele verwendet, deren Polymerisation bei 15 °C ü.N. erfolgte. Die Elektrophorese wurde bei 15 mA/Gel für 45 min und anschließend 35 mA/Gel für ca. 5 h in einer Elektrophoreseapparatur (Protean II xi 2Dcell) der Firma Bio-Rad durchgeführt.

### **Gradientengel**

Zur Auftrennung der Basalapparat-Proteine für die massenspektrometrische Untersuchung (s. 3.9.1) wurde ein Gradientengel (Protean II Ready Gel, 10-20 %, Tris HCl) der Firma Bio-Rad verwendet. Die Elektrophorese wurde zunächst mit einer Stromstärke von 16 mA für 30 min und anschließend bei 24 mA für ca. 6 h durchgeführt. Als Apparatur diente hierbei die Protean II xi 2Dcell von Bio-Rad, die durch einen Thermostaten (ThermoHaake K10) auf 12 °C temperiert wurde. Die Stromversorgung erfolgte durch das Power Pac 1.000 von Bio-Rad. Nach der Elektrophorese wurde das Gel silbergefärbt (s. 3.4.3) und die Banden mit einer Rasierklinge ausgeschnitten. Die anschließende massenspektrometrische Analyse (s. 3.9.1) wurde am Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie der Universität Jena durchgeführt.



### **Eichproteine (Marker)**

Die Bestimmung unbekannter Molekulargewichte erfolgte anhand von Eichgeraden, die auf der Basis der Rf-Werte von Markerproteinen erstellt wurden. Folgende Molekulargewichtstandards wurden verwendet (beide von Fermentas):

- PageRuler Protein Ladder (Größen in kDa): 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10
- PageRuler Prestained Protein Ladder (Größen in kDa): 170, 130, 100, 70 (rote Bande), 55, 40, 35, 25, 15, 10

### **3.4.2 Coomassie-Färbung von Proteingelen**

Um die Proteine in SDS-Gelen sichtbar zu machen, wurden die Gele zunächst für ca. 10 min in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend in der Entfärbelösung entfärbt. Die Entfärbelösung wurde dabei mehrmals gewechselt.

### **3.4.3 Silberfärbung von Proteingelen**

Für die Silberfärbung wurde ein Protokoll verwendet, das mit einer anschließenden Massenspektrometrie kompatibel ist. Dazu wurden die Gele zunächst ü.N. mit 10 % Essigsäure (v/v)/40 % Ethanol (v/v) auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Gele für 30 min in einer 0,2 %igen Natriumthiosulfatlösung (0,5 g Natriumthiosulfat, 17 g Na-acetat und 75 ml Ethanol auf 250 ml A. dest.) inkubiert. Es folgten drei 5minütige Waschschrte in A. dest., bevor das Gel für 20-60 min in einer 0,25 %igen Silbernitratlösung inkubiert wurde. Nach zwei einminütigen Waschschrten mit A. dest. erfolgte die Entwicklung in einer 2,5 %igen Natriumcarbonatlösung, die zusätzlich 400 µl/l Formaldehyd enthielt. Nach ca. 5 min wurde die Reaktion mit einer 1,5 %igen EDTA-Lösung für mind. 10 min abgestoppt. Vor dem Ausschneiden der Proteine für die Massenspektrometrie wurde das Gel noch zweimal 5 min mit A. dest. gewaschen.

### **3.4.4 Elektroelution**

Für die Elektroelution stand eine Elutionskammer zur Verfügung, die in der Feinmechanischen Werkstatt des Botanischen Instituts der Universität zu Köln angefertigt worden war. Die coomassiegefärbten Gelstücke wurden zerkleinert und in die mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllte Kammer gelegt. Die Elution fand bei 4 °C für 12-15 h bei

120 V statt. Vor Abschluß der Elution wurde das Gerät für ca. 20 sek umgepolt, um an der Dialysemembran aggregiertes Protein in das Eluat zurückzuführen.

### **3.4.5 Dialysen**

Zur Neutralisierung des pH-Wertes und zur Entfernung von Tris-HCl und Glycin wurden die elektroeluierten Proteine (s. 3.4.4) gegen 5 mM Ammoniumbicarbonat dialysiert. Für die Dialyse wurde das D-Tube Dialyzer Maxi Kit (mit einem MWCO von 12-14 kDa) der Firma Novagen verwendet. Die Dialyseeinheit wurde zunächst – wie im Protokoll beschrieben – mit A. dest. befüllt und für mindestens 5 min stehen gelassen. Dann wurde das Wasser wieder entfernt und die zu dialysierende Probe eingefüllt. Die Dialyse fand ü.N. bei 4 °C unter Rühren (Magnetrührer, ca. 100-200 upm) statt, wobei das Volumen des Dialysepuffers das ca. 1.000fache der zu dialysierenden Probe betrug.

### **Mikrodialyse**

Vor der Anfertigung der „whole mount“-Präparate für die Elektronenmikroskopie (s. 3.6.2) wurden die Proben ca. 1 h gegen MT-Puffer dialysiert, um die Saccharose zu entfernen. Hierzu wurden ca. 30 µl der zu dialysierenden Probe auf Membranfilter gegeben, die auf dem Dialysepuffer flottierten. Das Volumen des Puffers betrug ca. das 1.000fache der zu dialysierenden Probe.

### **3.4.6 Gefriertrocknung von Proteinen**

Nach der Dialyse (s. 3.4.5) wurden die Proteine bei -80 °C für einige Stunden eingefroren. Die Lyophilisierung wurde dann ü.N. in einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha I-5; Christ) durchgeführt. Die so gewonnenen Proteine wurden anschließend als Antigene für die Immunisierung von Kaninchen verwendet (s. 3.7.2).

### **3.4.7 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen aus Gelen auf Membranen (Western-Blot)**

Für den Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine PVDF-Membran wurde das Tankblot-Verfahren angewendet. Hierzu stand eine in der Feinmechanischen Werkstatt des Botanischen Instituts der Universität zu Köln angefertigte Kammer zur Verfügung. Zur Vorbereitung wurde die PVDF-Membran zunächst ca. 15 sek in Methanol, anschließend für ca. 2 min in A. dest. und schließlich für mind. 5 min in 4 °C

kaltem Transferpuffer inkubiert. Die Vliese und das Whatman-Chromatographiepapier wurden ebenfalls in kaltem Transferpuffer getränkt. Die Blotapparatur wurde mit Eis gekühlt, und der Transfer erfolgte bei 100 V innerhalb von 1 h. Der Blot wurde folgendermaßen zusammengesetzt:

Kathode (+)  
    gelochte Acrylplatte  
    Vlies  
    Whatman-Chromatographiepapier  
    PVDF-Membran  
    Polyacrylamid-Gel  
    Whatman-Chromatographiepapier  
    Vlies  
    gelochte Acrylplatte  
Anode (-)

#### **3.4.8 Ponceau-Färbung von PVDF-Membranen**

Zur Überprüfung des Transfererfolges und zum besseren Schneiden der Membran wurde diese für ca. 3-5 min in der Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte anschließend in A. dest.

#### **3.4.9 Amidoschwarz-Färbung von PVDF-Membranen**

Zum Nachweis der Proteine mit Amidoschwarz (Batteiger et al., 1982) wurde die Transfermembran ca. 5 min in der Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte für 5-10 min in Entfärbelösung, die mehrmals gewechselt wurde. Anschließend wurde die Membran zwischen Filterpapier getrocknet.

#### **3.4.10 Proteinbestimmung nach Neuhoff**

Die Proteinbestimmung erfolgte modifiziert nach Neuhoff et al. (1979). Zunächst wurde die zu untersuchende Probe in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5-10 min bei 100 °C in einem Heizblock aufgeköcht. Jeweils 5 µl der Probe wurden auf eine Celluloseacetatmembran aufgetragen. Nachdem der Tropfen getrocknet war, wurde die Membran für ca. 5 min in Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert und anschließend in

Entfärbelösung entfärbt, wobei diese mehrmals gewechselt wurde. Nach vollständigem Trocknen wurde die Membran in 1 ml DMSO unter Schütteln aufgelöst und die Absorption bei 630 nm in einem Spektralphotometer (Kontron, Uvikon 810) gemessen. Als Nullabgleich diente ein gleich behandeltes, in DMSO aufgelöstes Membranstück, das nur den SDS-Probenpuffer enthielt. Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden, die im Bereich von 0,5-5 µg/µl BSA lag.

#### **3.4.11 Proteinbestimmung mit Coomassie Plus-Reagenz**

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des „Coomassie Plus - The Better Bradford<sup>TM</sup> Assay Kits“ von Pierce nach dem „Standard Test Tube Protocol“. Hierzu wurden 50 µl der zu untersuchenden Probe in einem Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Anschließend wurden 1,5 ml des auf RT gebrachten Coomassie Plus-Reagenz hinzugegeben und das Ganze gut geschüttelt. Die Proben wurden für 10 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer bestimmt (Kontron, Uvikon 810). Als Referenzwert diente eine gleich behandelte Probe, die nur A. dest. enthielt. Die Berechnung der Proteinmengen erfolgte mit Hilfe einer Eichgerade, die im Bereich von 25-1.000 µg/ml BSA lag.

### **3.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE)**

Zur Trennung der Proteine während der isoelektrischen Fokussierung (IEF) dienen immobilisierte pH-Gradienten (Görg et al., 1988). Um Kontaminationen zu vermeiden wurden sämtliche Geräte mit Reinigern auf Ammoniakbasis (Sigmaclean) gereinigt, es wurde auf staubfreies und sauberes Arbeiten geachtet, und bei der Durchführung der 2D-PAGE wurden immer puderfreie Handschuhe getragen. Zudem wurden nur reinste Chemikalien (PlusOne, Amersham, Fluka) verwendet, und zum Ansetzen von Proben- und Rehydratationspuffer wurde HPLC-Wasser verwendet. Alle Lösungen wurden steril filtriert (0,45 µm) und lagerten als Aliquots bei -20 °C. DTT und IPG-Puffer wurden erst frisch vor Gebrauch zugegeben und Harnstoff niemals über 37 °C erhitzt.

#### **3.5.1 Probenvorbereitung**

Isolierte Basalapparate wurden in 2D-Probenpuffer resuspendiert (34 µl je Basalapparat-Pellet). Jeweils 2 gut resuspendierte Basalapparat-Pellets wurden vereinigt und 10-15 min

auf 30-35 °C erwärmt. Anschließend wurde die Probe bei RT für 1 h inkubiert, damit die Proteine gut in Lösung gingen.

### **3.5.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

#### **Rehydratisierung der Gelstreifen**

Zu der Proteinprobe (s. 3.5.1) wurden 272 µl 2D-Rehydratationspuffer gegeben. Die 340 µl Lösung wurden gleichmäßig und luftblasenfrei in der Vertiefung der Rehydratations-Schale verteilt. Die Schutzfolie des „Immobiline Dry-Strips“ wurde vorsichtig abgezogen, der Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten auf die Rehydratationslösung gelegt und mit 3 ml Paraffin-Öl (DryStrip Cover-Fluid von Amersham) überschichtet. Verwendet wurden 18 cm lange Streifen mit einem pI-Bereich von 3-10 (Immobiline Dry Strip 3-10 NL). Die Rehydratation erfolgte bei RT ü.N.

#### **Elektrophorese**

Der rehydrierte IPG-Streifen wurde mit A. dest. gespült und in die entsprechende Halterung auf der gekühlten (20 °C) Keramikplatte des Multiphor II Geräts (Amersham) gelegt. Die Elektroden wurden angeschlossen und der Streifen mit DryStrip Cover-Fluid überschichtet. Für die Elektrophorese stand der 2303 Multidrive XL 3,5 kV „Power Supply“ von Pharmacia zur Verfügung. Die Elektrophorese wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt (insgesamt 25 kVh):

- 1 min bei 500 V
- 10 min bei 800 V
- 10 min bei 1.000 V
- 15 min bei 1.500 V
- 15 min bei 2.000 V
- 20 min bei 2.500 V
- 20 min bei 3.000 V
- 6 h 20 min bei 3.500 V

Der Streifen wurden nach Beendigung der IEF bis zur Durchführung der 2. Dimension bei -80 °C in einer gut verschlossenen Petrischale gelagert.

### 3.5.3 Zweite Dimension: Vertikale SDS-PAGE

In der 2. Dimension wurden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-PAGE getrennt. Dafür stand eine Elektrophoreseapparatur von Bio-Rad (Protean II xi 2Dcell) zur Verfügung, die durch einen Thermostaten (ThermoHaake K10) auf 12 °C temperiert wurde.

#### Equilibrierung der IPG-Streifen

Um die aufgetrennten Proteine im IPG-Streifen an die Bedingungen der SDS-PAGE anzupassen, wurden die Streifen zwei Equilibrierungsschritten von jeweils 15 min bei RT auf einem Schüttler unterzogen. Zunächst wurden die Streifen in einer Petrischale zur Reduktion der Disulfidbrücken mit DTT inkubiert (10 ml 2D-Equilibrierungspuffer mit 100 mg frisch zugegebenem DTT). Im 2. Schritt wurden die freien Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste durch Inkubation mit Iodacetamid (10 ml 2D-Equilibrierungspuffer mit 250 mg frisch zugegebenem Iodacetamid) alkyliert.

#### SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine wurden 11 %ige SDS-Gele (ohne Sammelgel) verwendet. Diese setzten sich wie folgt zusammen: 9,4 ml Trenngelpuffer, 13 ml Acrylamid (Rotiphorese Gel 30), 12,6 ml HPLC-Wasser, 70 µl Temed, 140 µl APS. Die Polymerisation erfolgte für 1-2 h bei RT (überschichtet mit iso-Butanol) und weiter bei 15 °C ü.N. (überschichtet mit 2D-Gelüberschichtungspuffer). Vor der Elektrophorese wurden die equilibrierten IPG-Streifen auf einer sauberen Glasplatte mit einer frischen Rasierklinge von 18 cm auf 15 cm zurechtgeschnitten. Es wurden 2 cm auf der sauren und 1 cm auf der basischen Seite entfernt. Ein so vorbereiteter Streifen wurde horizontal auf einem fertig polymerisierten SDS-Gel platziert, wobei die saure Seite immer links lag. Der IPG-Streifen wurde anschließend mit einer 60 °C warmen 2D-Agaroselösung überschichtet. Die Elektrophorese fand bei zunächst 15 mA/Gel für 45 min und dann bei 30 mA/Gel für 4-6 h statt.

## **3.6 Elektronenmikroskopie**

### **3.6.1 Befilmen der Kupfernetzchen**

Zum Beschichten der Kupfernetzchen („3,05 mm mesh grids“, Plano GmbH, Göttingen) wurde eine 0,25 %ige (w/v) Pioloformlösung (in Chloroform) verwendet. Ein gereinigter Objektträger wurde in die Pioloformlösung getaucht und anschließend luftgetrocknet. Der Pioloformfilm wurde vom Objektträger auf A. dest. überführt und der flottierende Film vorsichtig mit den Kupfernetzchen belegt. Die befilmten Netzchen wurden mit Parafilm von der Wasseroberfläche abgenommen und luftgetrocknet.

### **3.6.2 „whole mount“-Elektronenmikroskopie**

Um zu überprüfen, ob die Basalapparate frei von möglichen Kontaminationen waren, wurden „whole mount“-Präparate angefertigt. Dazu wurden 7 µl der dialysierten Probe (s. 3.4.5) auf ein mit Pioloform befilmtes „mesh grid“ aufgebracht. Nach 60 min Inkubation in einer feuchten Kammer bei RT wurde der Tropfen mit Hilfe eines Filterpapiers wieder abgesaugt. Die Negativ-Kontrastierung erfolgte durch Auftragen von 7 µl einer 2 %igen Uranylacetatlösung ((w/v) in A. dest.), die nach ca. 90 sek mit einem Filterpapier abgesaugt wurde. Die Uranylacetatlösung wurde in 2 ml Aliquots bei 4 °C gelagert und direkt vor Gebrauch für ca. 5 min bei 15.800 x g zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415 C, 14.000 upm, RT).

### **3.6.3 Anfertigung von Präparaten für Ultradünnschnitte**

Ein Basalapparatpellet, das wie unter 3.3.1 beschrieben gewonnen wurde, wurde mit 2,5 %igem Glutaraldehyd (in MT-Puffer) für 20 min auf Eis fixiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen einer 4 %igen Tanninlösung ((w/v) in MT-Puffer, pH 7,0) zugegeben und das Ganze für 25 min bei RT inkubiert. Das Pellet wurde zweimal mit MT-Puffer gewaschen und mit einer 2 %igen Osmiumtetroxidlösung ((w/v) in A. dest) versetzt. Es folgten eine 20minütige Inkubation auf Eis und erneutes zweimaliges Waschen mit MT-Puffer, bevor das Pellet in Agar eingebettet wurde (Agar Noble, 2 % (w/v) in A. dest.). Das eingebettete Pellet wurde der folgenden Entwässerungsreihe unterzogen: 50 % Ethanol und 70 % Ethanol (jeweils 15 min auf Eis), 70 % und 90 % Ethanol (jeweils 15 min bei -20 °C). Anschließend wurde das Agarblöckchen ü.N. in 100 %igem Ethanol bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgten eine Inkubation in 1:1 Ethanol/Propylenoxid (v/v) und

zwei Inkubationen in Propylenoxid (jeweils 15 min, -20 °C). Als nächstes wurde das eingebettete Pellet mit 1:1 Epon/Propylenoxid (v/v) versetzt und im geschlossenen Eppendorfgefäß für 12-20 h bei RT stehen gelassen. Am folgenden Tag wurde das Eppendorfgefäß geöffnet, um das Propylenoxid abdampfen zu lassen. Nach dem Verdampfen des Propylenoxids wurde das Agarblöckchen in frisches Epon überführt und in die Brennform gegeben. Die Aushärtung des Epons erfolgte bei 65 °C für ca. 12-24 h. Die Dünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser (Delaware Diamond Knives, Wilmington, Delaware, USA) auf einem Ultramikrotom MT 6000-XL der Firma RCM (Tuscon, Arizona, USA) angefertigt.

#### **3.6.4 Kontrastierung der Ultradünnschnitte**

Zur Kontrastierung wurden die Ultradünnschnitte zunächst für ca. 20-25 min mit einer 2 %igen Uranylacetatlösung ((w/v) in A. dest.) inkubiert und anschließend mit A. dest. gewaschen. Es folgte eine ca. 3minütige Inkubation mit Bleicitrat und erneutes Waschen der Netzchen in A. dest.

Die Bleicitratlösung wurde folgendermaßen angesetzt: 2,1 ml einer Natriumcitratlösung (4,15 g in 50 ml A. dest.) wurden mit 2,1 ml einer Bleinitratlösung (3,13 g in 50 ml A. dest.) gemischt. Der entstehende weiße Niederschlag wurde durch Zugabe von 0,8 ml 1 M NaOH aufgelöst. Sowohl die Uranylacetat- als auch die Bleicitratlösung wurden in Aliquots bei 4 °C gelagert und direkt vor Gebrauch für ca. 5 min bei 15.800 x g zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415 C, 14.000 upm, RT).

#### **3.6.5 Elektronenmikroskop und Filmmaterial**

Zur Betrachtung der elektronenmikroskopischen Präparate stand ein Transmissions-Elektronenmikroskop Philips CM 10 zur Verfügung. Die Dokumentation erfolgte mit einer Plattenkamera vom Format 65 x 90 mm (Fotomaterial: Scientia Film 23D56 P3 AH, Agfa Gevaert, Leverkusen).



## 3.7 Antikörper

### 3.7.1 Gewinnung der Antigene

Die rekombinanten Proteine wurden durch Überexpression partieller cDNAs in *E. coli* gewonnen (s. 3.10.8) und gereinigt (s. 3.3.3). Nach der Reinigung über die Ni-Säule wurden die Eluate, die das rekombinante Protein enthielten, zur weiteren Reinigung durch präparative SDS-PAGE (s. 3.4.1) getrennt und die Gele mit Coomassie gefärbt (s. 3.4.2). Die Banden, die das rekombinante Protein enthielten, wurden mit einer Rasierklinge ausgeschnitten, die Proteine elektroeluiert (s. 3.4.4), dialysiert (s. 3.4.5) und gefriergetrocknet (s. 3.4.6).

### 3.7.2 Immunisierungen

Für die Antigene 27, 90 und 156 wurden die Immunisierungen von der Firma Biogenes (Köpenicker Str. 325, 12555 Berlin) durchgeführt. Die Immunisierung für das Antigen 31 übernahm die Firma Davids Biotechnologie (Röntgenstr. 3, 93055 Regensburg). Für jedes der 4 Antigene wurden 2 Kaninchen immunisiert. Am ersten Tag erfolgte die Entnahme von Präimmenserum sowie die erste Immunisierung. Bei der Firma Biogenes fanden weitere Immunisierungen am 7., 14. und 28. Tag statt. Davids Biotechnologie nahm 2 weitere Injektionen am 14. und 21. Tag vor. Die Entnahme von einigen ml Immenserum wurde jeweils am 28. Tag vorgenommen. Nach Testen dieses Serums im Western-Blot bluteten die Tiere ca. am 35.-40. Tag aus.

## 3.8 Immunologische Methoden

### 3.8.1 Western-Blot

Zur immunologischen Analyse von Proteinen wurden diese in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.4.1) und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert (s. 3.4.7). Zur Überprüfung des Transfererfolges und zum besseren Schneiden der Membran wurde diese mit Ponceau gefärbt (s. 3.4.8). Zunächst nicht benötigte Membranstreifen wurden bis zur ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. Die für eine immunologische Analyse eingesetzten Membranstreifen wurden bei 4 °C ü.N. in Blockpuffer abgesättigt. Alle weiteren Schritte wurden bei RT auf einem Schüttler durchgeführt. Zuerst erfolgte eine 90minütige Inkubation mit dem primären Antikörper

(1:1.000-1:5.000 in Blockpuffer). Nach viermaligem Waschen von je 5 min in TBS-Puffer erfolgte eine 90minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen bzw. anti-Maus-IgG Alkalische Phosphatase-Konjugat, 1:2.000 in Blockpuffer). Die Membranstreifen wurden wiederum viermal 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte anschließend in einer frisch angesetzten Substratlösung (10 ml AP-Puffer, 50 µl NBT-Stammlösung, 40 µl X-Phosphat-Stammlösung). Nach 1-3 min wurde die Farbreaktion in essigsauerm A. dest. abgestoppt und die Membranstreifen zwischen Filterpapier getrocknet.

### **3.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten**

Während der Isolation der Cytoskelette (s. 3.3.2) wurden die „Multiwell“-Objektträger (Roth) gründlich mit Methanol und A. dest. gereinigt, mit poly-L-Lysin-Lösung (0,1 % (w/v) in A. dest.) beschichtet, anschließend mit A. dest. gespült und getrocknet. Die fixierten Cytoskelette wurden auf die vorbereiteten Objektträger pipettiert und zur Adhäsion für ca. 30 min bei RT inkubiert. Um ein Austrocknen der Tropfen zu verhindern, wurden alle Inkubationen in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Objektträger wurden dann mit Na-PBS-Puffer gespült, vorsichtig getrocknet und die Vertiefungen mit Blockpuffer überschichtet. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Objektträger erneut mit Na-PBS gespült und getrocknet. Es folgten eine 90minütige Inkubation mit dem primären Antikörper (1:100-1:200 in Blockpuffer) bei 37 °C und ein weiterer Waschschrift mit PBS. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen- bzw. anti-Maus-IgG Cy3-Konjugat, 1:200 in Blockpuffer) fand ebenfalls für 90 min bei 37 °C statt. Nach dieser Inkubation wurden die Objektträger ein letztes Mal mit Na-PBS gewaschen und getrocknet. Um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern, wurde in jede Vertiefung ein Tropfen Stabilisierungspuffer gegeben. Ein Deckglas wurde luftblasenfrei aufgelegt, überschüssige Flüssigkeit wurde mit Hilfe eines Filterpapiers abgesaugt, und das Präparat wurde mit Nagellack verschlossen.

Arbeitsschritte und Inkubationen mit Fluorochromen wurden im Halbdunkeln durchgeführt. Die fertigen Präparate wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Für die Betrachtung der Präparate stand ein Nikon-Fluoreszenzmikroskop (Eclipse E-800 mit 100er-PlanApo-Ölimmersionsobjektiv) zur Verfügung. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer digitalen Kamera (Visitron System RT Monochrome) und der MetaMorph Bildverarbeitungssoftware (Version 6.3r4).

### 3.9 Massenspektrometrische Protein-Analytik

#### 3.9.1 Elektronenspray-Ionisation mit Tandem-MS Technik (ESI-MS/MS)

Die MS-Analyse der Gelbanden wurde an der Universität Jena am Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie von Frau Hawat durchgeführt (Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. M. Mittag). Die aus dem silbergefärbten Gradientengel (s. 3.4.1) ausgeschnittenen Banden wurden hierzu zunächst tryptisch verdaut. Die Peptide wurden über eine „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC) aufgetrennt (HPLC-Nano Flow Setup – dynamisches Spray) mit einem angeschlossenen Autosampler (Dionex) mit 1 µl Injektionsvolumen. An der HPLC wurde zur Trennung der Peptidgemische eine 75 µm ø x 150 mm PepMap C18 Säule mit 3 µm Partikelgröße und 100 Å Porendurchmesser benutzt. Für die Massenspektrometrie stand das Massenspektrometer LCQ Deca XP mit Quadropol Ionenfalle der Firma ThermoFinnigan (Thermo Electron Corp.) zur Verfügung. Zur Fragmentierung der Ionen in der Ionenfalle wurde Helium-Gas verwendet. Die angelegte Spannung für die Ionisierung bzw. Ionenerzeugung betrug 1,40 kV. Die Spektren wurden mit der Software Xcalibur (ThermoFinnigan) erstellt. Zur Auswertung stand das Computerprogramm Sequest (ThermoFinnigan) zur Verfügung. Als  $X_{\text{Corr}}$ -Werte wurden verwendet: 1,5 für einwertige Ionen, 2,0 für zweiwertige und 2,5 für dreiwertige Ionen.

Es wurden folgende Datenbanken durchsucht:

1. JGI (Version 2.0): <http://genome.jgi-psf.org/chlre2/chlre2.home.html>  
Diese Datenbank enthält die genomischen DNA-Sequenzen von *C. reinhardtii* sowie auch Genmodelle.
2. KAZUSA: <http://www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/>  
In dieser Datenbank befinden sich EST-Daten.
3. EST-Datenbank des *Chlamydomonas*-Centers: <http://www.chlamy.org/search.html>

#### 3.9.2 MudPIT („multidimensional protein identification technology“)

Die MudPIT-Analyse wurde am Proteincenter der Ruhr-Universität Bochum von Herrn Dr. Wolters vorgenommen. Bei dieser Methode entfällt die vorherige Auftrennung über ein Gel, so dass auch Proteine identifiziert werden können, die sonst nur selten gefunden werden. Dazu gehören z.B. Proteine mit extremen pIs bzw. Molekulargewichten, sowie Membranproteine und Proteine, die nur in geringer Menge vorliegen (Washburn et al., 2001). Für die MudPIT-Analyse wurde ein Basalapparat-Pellet verwendet, das – wie in

Abschnitt 3.3.1 beschrieben – gewonnen wurde. Nach dem tryptischen Verdau des Pellets wurden die Peptide über HPLC mit angeschlossenen Autosampler (Dionex) aufgetrennt. Die Säule bestand aus drei Phasen: 12 cm Eclipse XDB C<sub>18</sub> (Hewlett Packard), 4 cm SCX (starker Kationenaustauscher, Whatman) und 3 cm „reverse-phase“ Material (Hewlett Packard). Die Durchflußrate der Säule wurde auf 0,15-0,25 µl/min eingestellt. Für die Massenspektrometrie kam ein LTQ-Gerät mit Ionenfalle zum Einsatz (Thermo Electron Corp.), wobei die angelegte Spannung zur Ionisierung 1,80 kV betrug. Die Erstellung der Spektren erfolgte mit Hilfe der Software Xcalibur. Hierbei wurde zunächst das komplette Spektrum zwischen 350 und 2000 m/z aufgenommen und anschließend die drei intensivsten Ionen für einen MS/MS-Scan ausgewählt. Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Sequest. Folgende X<sub>corr</sub>-Werte wurden verwendet: 1,8 für einwertige Ionen, 2,5 für zwei- und 3,5 für dreiwertige Ionen. Es wurden nur die Genmodelle der Version 2.0 der JGI-Datenbank durchsucht (<http://genome.jgi-psf.org/chlre2/chlre2.home.html>).

### 3.10 Molekularbiologische Methoden

#### 3.10.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. reinhardtii* cw2 wurden die Zellen (ca. 600 ml) zunächst bei ca. 500 x g pelletiert (DuPont, Sorvall, RC 5B, SLA-600TC, 1.700 upm, 10 min) und das Pellet in wenigen ml Medium resuspendiert. Die folgenden Schritte fanden unter einer Sterilbank statt, um mögliche Kontaminationen zu verhindern. Der Zellaufschluß erfolgte durch Mörsern unter flüssigem Stickstoff. Anschließend wurden jeweils 0,25 ml Probe und 0,75 ml Trizol-Lösung in einem 2 ml-Eppendorfgefäß vereinigt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform je Eppendorfgefäß und kräftigem Schütteln für ca. 15 sek, erfolgte eine weitere Inkubation von 2-15 min bei RT. Die Proben wurden anschließend für 15 min bei 4 °C und 12.000 x g (gekühlte Tischzentrifuge 1K15 von Sigma 11.500 upm) zentrifugiert, wobei es zu einer Phasentrennung kam. Die obere, wässrige Phase wurde entnommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurden 0,5 ml Isopropanol je Eppendorfgefäß hinzugegeben und das Ganze für 10 min bei RT inkubiert. Die RNA wurde durch eine 10minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 x g (Sigma, 1K15, 11.500 upm) pelletiert, jedes der Pellets mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen und erneut

bei 4 °C für 5 min zentrifugiert (Sigma, 1K15, 7.500 x g, 9.100 upm). Der Überstand wurde entnommen, die Pellets wurden unter der Sterilbank luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.10.2 cDNA-Erststrangsynthese

Der Erststrang der cDNA wurde mit Hilfe des „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits“ gewonnen. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA von *C. reinhardtii* cw2. Ein wie unter 3.10.1 beschrieben gewonnenes Pellet wurde in 80 µl DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 4-5 µg Gesamt-RNA und der im „Kit“ enthaltene oligo(dT)<sub>18</sub>- bzw. selbst entworfene sequenzspezifische Primer verwendet.

### 3.10.3 Isolierung von DNA (CTAB-Methode)

Als Ausgangsmaterial für die Isolation dienten ca. 25 ml einer Kultur von *C. reinhardtii* cw2. Die Zellen wurden durch wiederholte Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Eppendorf-Zentrifuge 5415 C, 15.800 x g, 14.000 upm, RT, 30 sek) in einem 2 ml Eppendorfgefäß gesammelt. Zu dem so gewonnenen Pellet wurden 900 µl CTAB-Puffer und einige Glaskügelchen (ø 425-600 µm) gegeben und gemischt. Das Ganze wurde für 4 min bei 95 °C inkubiert, wobei das Eppendorf-Gefäß nach jeder min kurz gevortext wurde. Anschließend folgte eine 15minütige Inkubation bei 65 °C mit häufigem Schütteln. Zu den nun gut aufgeschlossenen Zellen wurde das gleiche Volumen eines Gemisches aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) gegeben, für 1 min gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 5415 C, 15.800 x g, 14.000 upm, RT, 5 min) getrennt, die obere Phase wurde entnommen (ca. 900 µl) und zur Fällung der DNA mit 600 µl Isopropanol versetzt. Die DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415 C, 15.800 x g, 14.000 upm, RT, 5 min), das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und kurz luftgetrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 75 µl autoklaviertem A. dest. gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 3.10.4 Vektoren und Bakterienstämme

#### Vektoren

Für Standardklonierungen zur Sequenzierung wurde der Vektor pGem-T Easy (Promega) verwendet. Die partiellen cDNAs wurden in den Vektor pETBlue-2 (Novagen) kloniert, um sie für die Antigengewinnung überzuexprimieren.

Dieser Vektor besitzt C-terminal ein „HSV“- und ein „His-Tag“ (6 Histidine). Das „His-Tag“ wurde für die Reinigung des rekombinanten Proteins über eine Nickelsäule verwendet (s. 3.3.3).

#### Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die *E. coli* Stämme JM109 von Promega (für Standardklonierungen) sowie NovaBlue und Tuner<sup>TM</sup>(DE3)pLacI von Novagen (für die Überexpression) verwendet.

### 3.10.5 Ligation

Vor der Ligation in die entsprechenden Vektoren wurde entweder die PCR direkt oder aus dem Gel ausgeschnittene PCR-Produkte mit Hilfe des „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systems“ gereinigt. Alle Ligationen wurden ü.N. bei 4 °C durchgeführt.

#### Ligation in pGem-T Easy

Die Ligationen wurden mit Hilfe des pGem-T Easy Kits durchgeführt. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Ein 10 µl Ligationsansatz enthielt:

- 1 µl Vektor (50 ng)
- 5 µl 2 x Ligationspuffer
- 1 µl T4-DNA-Ligase
- Insert
- A. dest.

Die Mengen von Insert und A. dest. wurden so gewählt, dass sich ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 ergab.

### **Ligation in pETBlue-2**

Vor der Ligation wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym NotI und das Insert (PCR-Produkt) mit den Enzymen NotI und EcoRV verdaut (s. 3.10.9). Ein 10 µl Ligationsansatz enthielt:

2 µl 5 x Ligations-Puffer (Gibco BRL)

1 µl T4 DNA-Ligase (Gibco BRL)

Vektor

Insert

A. dest.

Die Mengen von Insert, A. dest. und Vektor wurden so gewählt, dass sich ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 ergab.

### **3.10.6 Transformation**

#### **Transformation von *E. coli* JM109**

Die Transformation wurde mit Hilfe des pGem-T Easy Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden 50 µl der Zellen vorsichtig mit 2 µl eines Ligationsansatzes (s. 3.10.5) vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Bakterienzellen erfolgte über Hitzeschock (45-50 sek bei exakt 42 °C in einem Wasserbad). Nach der Wärmebehandlung wurde der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 950 µl SOC-Medium hinzugegeben und das Ganze für 1,5 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Platten selektioniert, die 50 µg/ml Ampicillin enthielten. Um eine Blau/Weiß-Selektion durchführen zu können, enthielten die Platten zusätzlich 70 µg/ml X-Gal und 20 µg/ml IPTG.

#### **Transformation von *E. coli* NovaBlue**

Nach der Ligation in den pETBlue-2-Expressionsvektor wurde das Plasmid zunächst in den *E. coli*-Stamm NovaBlue transformiert. Dieser Stamm ermöglicht eine Blau/Weiß-Selektion und nach Isolation der Plasmide kann der Erfolg der Ligation durch eine Sequenzierung überprüft werden (insbesondere, ob sich das Insert im korrekten Leseraster für die Expression befindet).

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. In einem Eppendorfgefäß wurden 20 µl Zellen mit 1 µl eines Ligationsansatzes (s. 3.10.5) vermischt, 5 min auf Eis inkubiert und für 30 sek einem Hitzeschock bei 42 °C in einem Wasserbad unterzogen. Nach einer Inkubation von 2 min auf Eis wurden 80 µl SOC-Medium hinzugegeben. Die Bakterien wurden dann direkt auf LB-Platten ausplattiert, die 50 µg/ml Ampicillin, 12,5 µg/ml Tetracyclin, 70 µg/ml X-Gal und 20 µg/ml IPTG enthielten.

### **Transformation von *E. coli* Tuner<sup>TM</sup>(DE3)pLacI**

Nachdem die aus den NovaBlue isolierten Plasmide durch eine Sequenzierung überprüft worden waren, wurden die korrekten Plasmide in den Expressionsstamm Tuner<sup>TM</sup>(DE3)pLacI transformiert. Dazu wurde 1 µl einer 1:50-Verdünnung der Plasmidpräparation mit 20 µl Zellen, die auf Eis aufgetaut worden waren, vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach 30 sek Hitzeschock bei 42 °C in einem Wasserbad folgte eine weitere Inkubation auf Eis (für 2 min). Anschließend wurden 80 µl SOC-Medium zugegeben, und die Zellen wurden für 60 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion wurden die Bakterien auf LB-Platten mit 1 % Glucose, 50 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert.

### **3.10.7 Plasmidpräparation (Miniprep)**

Zur Isolation von Plasmiden aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Als Ausgangsmaterial dienten 3-4 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika. Abweichend vom Protokoll wurde die DNA mit 35 µl A. dest. eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (Eppendorf BioPhotometer). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Plasmide bei -20 °C gelagert.

### **3.10.8 Proteinexpression der partiellen cDNAs**

Für die Expression wurde das pETBlue-2 System verwendet. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Zunächst wurde eine Vorkultur in ca. 3 ml LB mit 1 % Glucose, 50 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol angelegt. Diese Vorkultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-1 bei 37 °C unter Schütteln (250 upm) inkubiert und anschließend ü.N. bei 4 °C gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen



pelletiert (Hettich, ROTIXA/K, 3.000 upm, 5 min) und in ca. 3 ml frischem Medium (s.o.) resuspendiert. Diese Vorkultur diente als Inokulum für 100 ml Medium. Die 100 ml-Kultur wurde unter Schütteln (250 upm) bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1 inkubiert. Dann wurde die Hälfte der Kultur in einen autoklavierten Erlenmeyerkolben überführt (uninduzierte Kontrolle). Bei den anderen 50 ml wurde die Proteinexpression durch 250 µM IPTG induziert. Beide Kulturen wurden für 3 h unter Schütteln (250 upm) bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (Hettich, ROTIXA/K, 3.000 upm, 12 min) und die Pellets bis zum Zellaufschluß (s. 3.3.3) bei -20 °C gelagert. Anhand dieser Pellets wurde zunächst überprüft, in welcher Fraktion der Bakterien (lösliche Fraktion oder „inclusion bodies“) sich das rekombinante Protein befand. Um genug rekombinantes Protein für die Antikörper-Produktion zu gewinnen, wurde das Volumen der Kultur auf 500 ml erhöht.

### **3.10.9 Restriktionsverdau**

Alle enzymatischen Restriktionen wurden für 90 min bei 37 °C durchgeführt. Um das Enzym NotI zu inaktivieren, wurden die Proben nach dem Verdau für 20 min bei 65 °C inkubiert. EcoRV wird durch diese Wärmebehandlung nicht deaktiviert. Zur Entfernung der bei der Restriktion abgespaltenen kleinen DNA-Fragmente wurden Säulen (MicroSpin S-400 HR, Amersham) eingesetzt.

#### **Restriktionsverdau gereinigter PCR-Produkte**

Um die PCR-Produkte, an die durch PCR die entsprechenden Restriktionsschnittstellen angehängt worden waren (s. 3.10.11), in den Vektor pETBlue-2 ligieren zu können (s. 3.10.5), wurden diese mit NotI und EcoRV verdaut. Der Puffer wurde so gewählt, dass beide Enzyme eine möglichst hohe Aktivität aufwiesen. Eine Standardreaktion von 10 µl enthielt:

1 µl 10 x Puffer (REact 3, Invitrogen)

1 µl NotI (10 U)

1 µl EcoRV (10 U)

gereinigtes PCR-Produkt

A. dest.

Die Mengen an PCR-Produkt und A. dest. wurden so gewählt, dass die 5-10fache für die spätere Ligation nötige Menge an PCR-Produkt verdaut wurde. Waren z.B. für die spätere Ligation 21 ng Insert nötig (für ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1), so wurden im Restriktionsverdau 105 bis 210 ng gereinigtes PCR-Produkt eingesetzt.

### **Restriktionsverdau des Vektors pETBlue-2**

Dieser Vektor war bereits an der EcoRV-Schnittstelle linearisiert, d.h. er lag als „blunt“-Vektor vor. Eine Standardreaktion von 10 µl enthielt:

- 1 µl 10 x Puffer (Puffer 0, Fermentas)
- 1 µl NotI (10 U)
- Vektor pETBlue-2
- A. dest.

Die Mengen an Vektor und A. dest. wurden so eingestellt, dass das ca. 1,5-2fache der später für die Ligation benötigten Menge an Vektor verdaut wurde.

### **3.10.10 Agarosegelelektrophorese**

Es wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele (in TAE-Puffer) verwendet, die Ethidiumbromid in der Endkonzentration von 0,5 µg/ml enthielten. Die zu analysierenden Proben wurden mit DNA-Probenpuffer gemischt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80-100 V für ca. 1 h durchgeführt, wobei TAE als Laufpuffer diente. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem System (Digit Store Duo) der Firma INTAS (Göttingen). Als Marker diente der MassRuler™ DNA Ladder Mix von Fermentas (Größen in bp): 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80.

### **3.10.11 PCR**

Alle Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Primus 96 plus) der Firma MWG-Biotech durchgeführt. Nach Ablauf der 30 Zyklen erfolgte jeweils eine 7minütige Inkubation bei 68 °C und die Kühlung der Proben bei 8 °C bis zu ihrer Entnahme.

**Genomische DNA als „template“**

Um in den Genmodellen vorhandene genomische Sequenzlücken zu schließen, wurde wie unter 3.10.3 beschrieben gewonnene DNA als „template“ eingesetzt. Die Reaktion enthielt:

- 5 µl 10 x Puffer (Biotherm, mit MgCl<sub>2</sub>)
- 2,5 µl DNA
- 5 µl dNTPs (2 mM)
- 5 µl „forward“ Primer (50 pmol)
- 5 µl „reverse“ Primer (50 pmol)
- 26,9 µl Wasser
- 0,6 µl Taq-Polymerase (Biotherm)

Folgende Reaktionsbedingungen wurden verwendet:

- 95 °C für 5 min
- 30 Zyklen à 95 °C für 1 min
- 55 °C für 2 min
- 68 °C für 3 min

**Erststrang-cDNA als „template“**

Um (partielle) cDNAs für die spätere Expression zur Antikörperproduktion zu generieren, wurde wie unter 3.10.2 beschrieben gewonnene Erststrang-cDNA als „template“ verwendet. Eine Standardreaktion enthielt:

- 2,5 µl 10 x Puffer (Biotherm, mit MgCl<sub>2</sub>)
- 1,5 µl DMSO
- 2,5 µl Erststrang-cDNA
- 2,5 µl dNTPs (2 mM)
- 2 µl „forward“ Primer (20 pmol)
- 2 µl „reverse“ Primer (20 pmol)
- 11,7 µl Wasser
- 0,3 µl Taq-Polymerase (Biotherm)

Es wurden die folgenden Reaktionsbedingungen angewendet:

95 °C für 5 min  
30 Zyklen à 95 °C für 1 min  
51 bzw. 54 oder 55 °C (je nach T<sub>m</sub> der Primer) für 2 min  
68 °C für 3 min

### **Plasmid-DNA als „template“**

Zum Einfügen von Restriktionsschnittstellen für die Umklonierung der partiellen cDNAs in den Expressionsvektor wurden PCRs mit den jeweiligen Plasmiden als „template“ durchgeführt. Eine Standardreaktion enthielt:

2,5 µl 10 x Puffer (Fermentas)  
1 µl Plasmid (150-300 ng)  
2,5 µl dNTPs (2 mM)  
2 µl „forward“ Primer (20 pmol)  
2 µl „reverse“ Primer (20 pmol)  
14,7 µl Wasser  
0,3 µl Polymerase („High Fidelity PCR Enzyme Mix“, Fermentas)

Die Reaktion fand unter den folgenden Bedingungen statt:

95 °C für 5 min  
30 Zyklen à 95 °C für 45 sek  
55 °C für 30 sek  
68 °C für 1 min

### **3.10.12 DNA-Sequenzierung**

Sämtliche Sequenzierungen wurden durch ein Servicelabor der Universität Köln (Institut für Genetik) durchgeführt. Dafür stand ein ABI 3100 Sequenzierer mit 16 Kapillaren zur Verfügung.

Eine 2,5 µl Sequenzreaktion enthielt die folgenden Komponenten:

0,5 µl Plasmid (200-300 ng)

0,2 µl Primer

0,5 µl Big Dye Version 1.1

1,3 µl Wasser

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Primus 96 plus) der Firma MWG-Biotech unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

94 °C für 2 min

35 Zyklen à 94 °C für 20 sek

50 °C für 30 sek (53 °C bei Verwendung der internen Primer für die genomische Sequenzlücke)

60 °C für 2 min (oder 1 min 50 sek)

Nach den 35 Zyklen folgten ein 6minütiger Schritt bei 60 °C und die Kühlung der Proben bei 8 °C bis zu ihrer Entnahme. Abschließend wurde die Reaktion mit 17,5 µl Wasser auf insgesamt 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

### **3.11 Verwendete Datenbanken und Computerprogramme**

#### **Computergestützte Sequenzanalyse**

Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden als ABI-Dateien übermittelt. Das Korrekturlesen und die weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme Chromas und Genedoc.

#### ***Chlamydomonas*-Datenbanken**

Genomische Sequenzen sowie Genmodelle wurden der Datenbank des „Joint Genome Institutes“ (JGI) entnommen. Zunächst wurde Version 2.0 verwendet. Im Verlauf dieser Arbeit erschien eine neuere Version 3.0 der Datenbank. Die Datenbanken sind unter folgenden Links abrufbar:

Version 2.0: <http://genome.jgi-psf.org/chlre2/chlre2.home.html>

Version 3.0: <http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>

EST-Daten von *C. reinhardtii* finden sich unter:

1. <http://www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/>
2. <http://www.chlamy.org/search.html>

### **Blasts**

Wurden bisher nicht annotierte Genmodelle durch in der Massenspektrometrie gemessene Peptide identifiziert, so wurden diese Genmodelle bei NCBI geblastet (blastp). Fanden sich keine Genmodelle, so wurde stattdessen das offene Leseraster rund um das Peptid bzw. die Nukleotidsequenz geblastet (blastn bzw. tblastn). Verwendet wurde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

### **Expasy**

Expasy („Expert Protein Analysis System“) bietet verschiedene Programme für die Proteinanalyse. Das ProtParam-Programm wurde zur Berechnung der Größen von Genmodellen verwendet. Mit dem Translate-Programm wurden Nukleotidsequenzen in Proteinsequenzen umgeschrieben. Diese Programme findet man unter:

<http://www.expasy.org>

### **Vorhersage von „coiled coil“-Bereichen**

Um zu überprüfen, ob ein Genmodell „coiled coil“-Regionen besitzt, wurde das Programm COILS verwendet: <http://www.ch.embnet.org/software/COILS-form.html>

## 4 ERGEBNISSE

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation der Proteine des Basalapparates der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Dazu wurde zunächst eine Methode zur Gewinnung möglichst reiner Basalapparate entwickelt. Mit Hilfe von unterschiedlichen massenspektrometrischen Verfahren wurden – neben einigen bereits bekannten Basalapparatproteinen – viele neue, bisher nicht annotierte Proteine identifiziert. Fünf dieser Proteine, die mit jeweils mehreren Peptiden eine relativ gute Sequenzabdeckung zeigten, wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt. Bei einem dieser Kandidaten wurde eine genomische Sequenzlücke geschlossen. Für die anderen vier Kandidaten wurden partielle cDNAs kloniert. Diese cDNAs wurden in *E. coli* überexprimiert und die rekombinanten Proteine zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet. Mit Hilfe dieser Antikörper konnten drei der neuen Proteine durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie am Basalapparat von *C. reinhardtii* lokalisiert werden.

### 4.1 Isolierung von Basalapparaten aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Protokolls zur Isolierung von Basalapparaten aus *Chlamydomonas reinhardtii* diente der von Geimer (1998) entwickelte Ansatz zur Reinigung von Basalapparaten aus der einzelligen Grünalge *Spermatozopsis similis*. Bei dieser Methode werden zunächst Cytoskelette unter Verwendung eines ionenarmen Puffers (TE-Puffer) nach Extraktion der Zellen mit einem nichtionischen Detergens isoliert. Nach mechanischer Desintegration der Cytoskelette werden reine Basalapparat-Fraktionen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation gewonnen. Bei dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Protokoll wurde ebenfalls TE-Puffer verwendet. Die Abtrennung der Geißeln erfolgte jedoch bereits vor der Lyse der Zellen durch die pH-Schock-Methode und zweimalige Zentrifugation. Durch diese Vorgehensweise konnte die Verunreinigung mit an Basalkörpern assoziierten Axonemenresten stark herabgesetzt werden. Die von den Geißeln befreiten Zellkörper wurden anschließend einer PEG-Behandlung unterzogen (modifiziert nach Gould, 1975). Dieser Schritt bewirkte einerseits, dass sich die Zellen leichter lysieren ließen. Zum anderen zeigte die elektronenmikroskopische Auswertung von „whole mounts“, dass die Menge an kontaminierenden Zellwandüberresten in den gereinigten Basalapparat-Fraktionen deutlich reduziert werden konnte. Nach der Lyse der

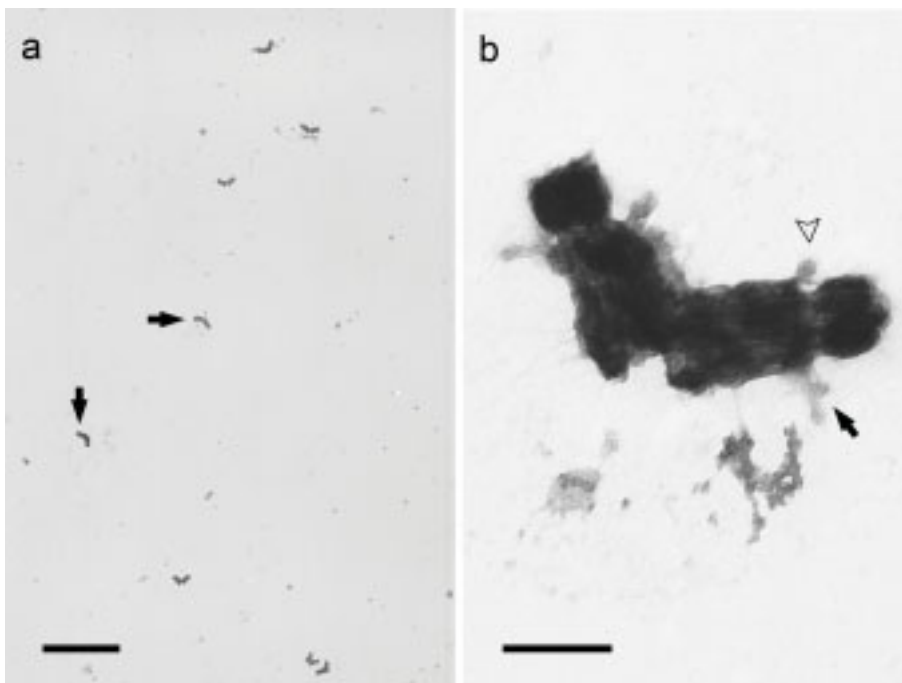
Zellen erfolgte eine Zentrifugation auf 50 %ige Saccharosekissen, was bereits zur Entfernung einiger unerwünschter Bestandteile (wie z.B. Stärkekörner) führte. Außerdem erleichterte die Verwendung eines solchen Kissens das Abnehmen der Basalapparate. Die weitere Reinigung erfolgte über einen diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten. Die Ausbeute betrug ca. 20 µg Basalapparatproteine von ungefähr 40 l Algenkultur.

Die elektronenmikroskopische Auswertung von „whole mounts“ (s. Abb. 3 a) zeigt, dass so gewonnene Basalapparat-Fractionen zu 95-98 % frei von mikrotubulären Verunreinigungen sind. Zur Bestimmung dieser Reinheit wurden jeweils 10 Felder eines „whole mount“-Kupfernetzchens ausgewertet. Gezählt wurden die Basalapparate ohne und mit axonemalen Mikrotubuliresten, sowie freie Bruchstücke von Axonemen. Ausgehend von dieser Gesamtzahl an „Partikeln“ wurde der Anteil an Basalapparaten ohne axonemale Mikrotubulireste bestimmt, der reproduzierbar bei 95-98 % lag. Auch andere Verunreinigungen wie Reste des Zellkerns oder der Zellwand sind kaum vorhanden. In Abbildung 3 b sind zwei Basalkörper im Detail zu sehen. Die Basalkörper sind frei von axonemalen Mikrotubuli, d.h. die Entgeißelung durch pH-Schock war erfolgreich. Die mikrotubulären Geißelwurzeln wurden bei der Präparation nicht erhalten. Zum distalen Ende der Basalkörper hin sind die „transitional fibers“ erkennbar (Pfeil), über welche die Basalkörper an der Plasmamembran verankert sind. Die distale Verbindungsfibrille, die die beiden Basalkörper miteinander verbindet, ist evtl. noch in Ansätzen vorhanden (Pfeilspitze). Probasalkörper wurden in den „whole mounts“ nicht beobachtet.

Abbildung 4 zeigt unterschiedliche Dünnschnitte von gereinigten Basalapparaten, wobei Abbildung a einen Längsschnitt und die Abbildungen b bis e verschiedene Querschnitte von distal nach proximal (keine Serienschnitte) darstellen. Im Längsschnitt ist bei dem waagrecht liegenden Basalkörper am distalen Ende die H-förmige Übergangsregion und der Bereich, an dem die Triplets beginnen, sichtbar. An dem anderen, leicht schräg angeschnittenen Basalkörper, sind die „transitional fibers“ erkennbar (Pfeilspitze in Abb. 4 a). Zwischen den beiden Basalkörpern ist die Ansatzstelle der distalen Verbindungsfibrille zu sehen (Pfeil). Das „cartwheel“, welches normalerweise am proximalen Ende der Basalkörper lokalisiert ist, fehlt. Die schwarzen globulären Partikel kommen vermutlich von der Kontrastierung der Dünnschnitte mit Bleicitrat. Abbildung 4 b zeigt einen Querschnitt am distalen Ende der distalen Sternstruktur. Die äußeren Mikrotubulidupletts sind gut sichtbar. In Abbildung 4 c ist die proximale Sternstruktur zu sehen. Auffällig ist hier, dass anstelle der zu erwartenden Mikrotubulidupletts nur neun einzelne Mikrotubuli

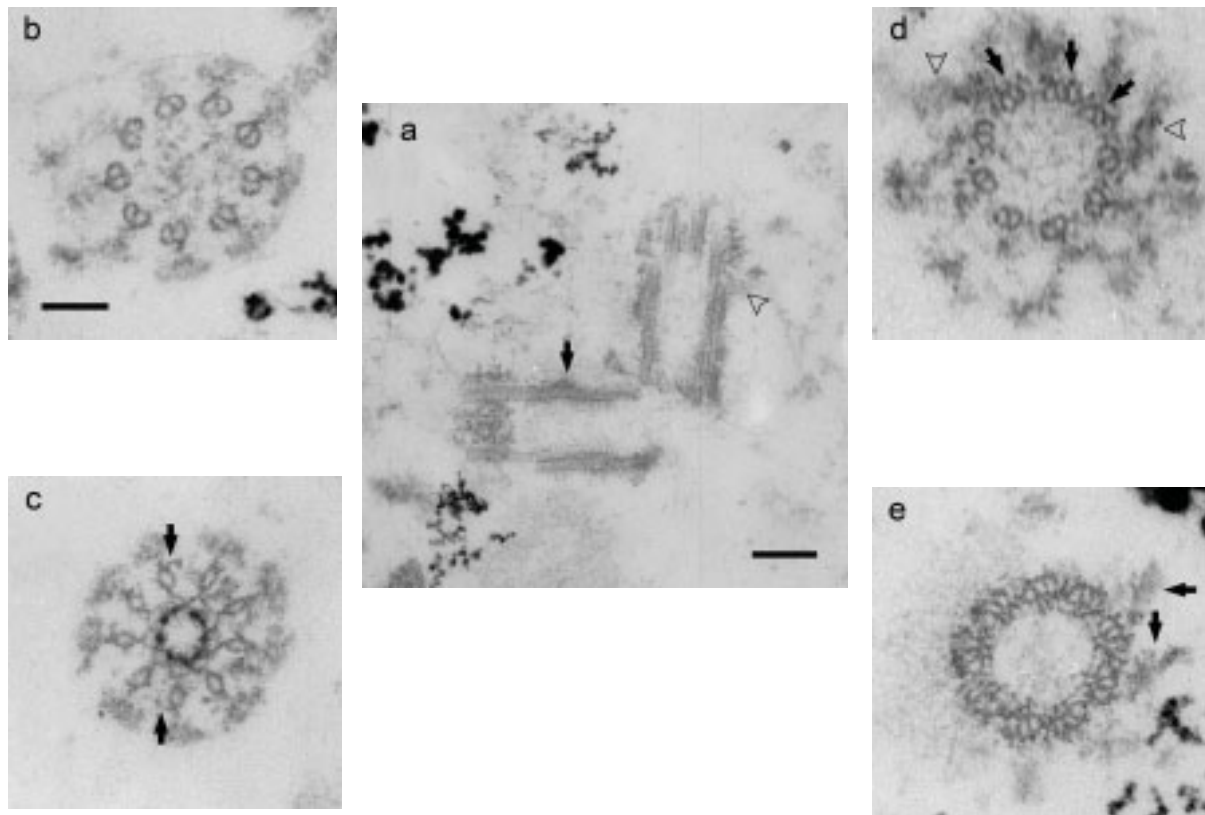


erkennbar sind. An einigen Stellen (Pfeile) scheinen Reste des zweiten Mikrotubulus noch vorhanden zu sein. Der Basalkörper in Abbildung 4 d ist leicht schräg angeschnitten, so dass z.T. noch Mikrotubulidupletts, z.T. aber auch schon -tripletts (Pfeile) sichtbar sind. Im Lumen des Basalkörpers kann man fibrilläre Strukturen erkennen. Dieser Querschnitt liegt auf Höhe der „transitional fibers“ (Pfeilspitzen). In Abbildung 4 e ist ein Querschnitt durch den „eigentlichen“ Basalkörper mit den Mikrotubulitripletts dargestellt. Auf der rechten Seite sind wiederum die „transitional fibers“ (Pfeile) erkennbar. Das „amorphe Material“ auf der linken Seite kennzeichnet die Ansatzstelle der distalen Verbindungsfibrille.



**Abb. 3:** „Whole mount“-Aufnahmen von gereinigten Basalapparaten

- a:** Übersichtsaufnahme gereinigter Basalapparate. Die Präparation enthält neben Basalapparaten (Pfeile) geringe Mengen an Verunreinigungen (vermutlich Zellwand- bzw. Zellkernreste). Maßstab: 4  $\mu$ m
- b:** Detailaufnahme eines Basalkörperpaares. Zum distalen Ende hin sind die „transitional fibers“ erkennbar (Pfeil). Die mikrotubulären Geißelwurzeln wurden bei der Präparation nicht erhalten. Von der distalen Verbindungsfibrille sind evtl. noch Reste vorhanden (Pfeilspitze). Maßstab: 250 nm



**Abb. 4: Ultradünnschnitte von gereinigten Basalapparaten**

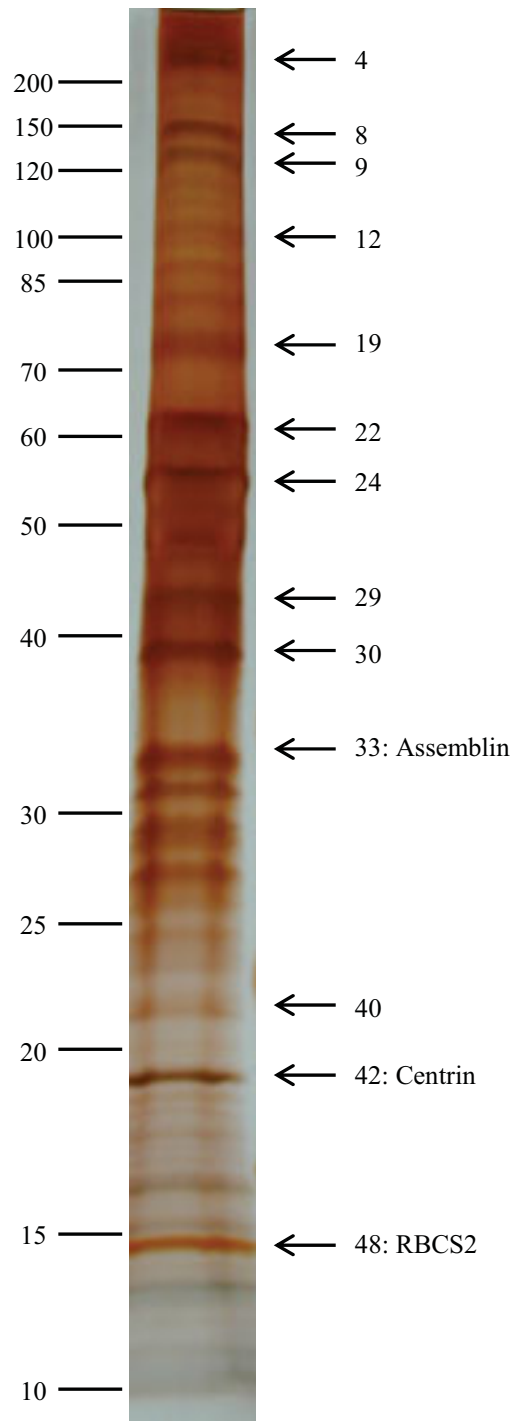
- a:** Längsschnitt durch ein Basalkörperpaar. Der rechte Basalkörper ist leicht schräg angeschnitten. Zum distalen Ende hin sind die „transitional fibers“ erkennbar (Pfeilspitze). An dem anderen Basalkörper ist die H-förmige Übergangsregion und der Bereich, an dem die Triplets beginnen, sichtbar. Zwischen den beiden Basalkörpern liegt die Ansatzstelle der distalen Verbindungsfibrille (Pfeil). Maßstab: 170 nm
- b-e:** Unterschiedliche Querschnitte (keine Serienschnitte) von distal nach proximal. Maßstab: 100 nm
- b:** Distales Ende der distalen Sternstruktur.
- c:** Proximale Sternstruktur. Statt der erwarteten Mikrotubulidupletts liegen nur einzelne Mikrotubuli vor. An einigen Stellen (Pfeile) scheinen Reste des zweiten Mikrotubulus noch vorhanden zu sein.
- d:** Querschnitt auf Höhe der „transitional fibers“ (Pfeilspitzen). Der Basalkörper ist leicht schräg angeschnitten, so dass an einigen Stellen noch Mikrotubulidupletts, an anderen Stellen schon -tripletts (Pfeile) zu sehen sind.
- e:** „Eigentlicher“ Basalkörper mit Mikrotubulitripletts. Das amorphe Material auf der linken Seite stellt die Ansatzstelle der distalen Verbindungsfibrille dar. Rechts sind „transitional fibers“ (Pfeile) erkennbar.

## **4.2. Ansätze zur Identifikation der Proteine des Basalapparates**

Sämtliche Genmodelle, die bei den beiden massenspektrometrischen Verfahren gefunden wurden, sind im Anhang aufgelistet.

### **4.2.1 1D-Gel-Ansatz**

Zur Identifikation der Proteine des Basalapparates wurde zunächst ein 1D-Gel-Ansatz gewählt. Hierzu wurden 2 Basalapparatpellets vereinigt (ca. 40 µg Protein) und über ein Gradientengel elektrophoretisch getrennt. In Abb. 5 ist das silbergefärbte Gel dargestellt. Um auch weniger häufige Proteine sichtbar zu machen, wurde das Gel länger als üblich in der Entwicklerlösung belassen, was zu einer verstärkten Anfärbung einiger Banden führte. In der Abbildung sind mehr als 35 konkrete Banden sichtbar. Die gesamte Spur, also auch Bereiche, die nicht angefärbt waren, wurde in jeweils 1-3 mm breite Banden zerschnitten. Die Banden wurden von 1 bis 51 durchnummeriert, wobei Nummer 1 die Bande mit dem höchsten und Nummer 51 die Bande mit dem niedrigsten Molekulargewicht darstellt. Die 51 Banden wurden nach tryptischem Verdau an der Universität Jena (Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie) massenspektrometrisch untersucht. Die Nummern einiger Banden sind exemplarisch in Abb. 5 eingezeichnet. Ebenfalls dargestellt sind die Positionen, bei denen SF-Assemblin, Centrin und RBCS2 gefunden wurden.



**Abb. 5: SDS-PAGE von gereinigten Basalapparaten**

Gereinigte Basalapparate von *C. reinhardtii* wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE, 10-20 %, ca. 40 µg Protein) und das Gel mit Silber gefärbt. Die gesamte Spur wurde in 51 Banden zerschnitten und diese massenspektrometrisch untersucht. Die Positionen der Molekulargewicht-Standardproteine [kDa] sind links angegeben. Auf der rechten Seite sind die Nummern einiger Banden exemplarisch eingezeichnet. In Bande 33 wurde SF-Assemblin nachgewiesen. Bei Bande 42 handelt es sich um Centrin, und in Bande 48 wurde die kleine Untereinheit der RUBISCO identifiziert.

Die massenspektrometrische Analyse der 51 Banden lieferte insgesamt 1123 unterschiedliche Peptide, die 124 Genmodellen sowie 500 EST-Einträgen und 499 genomischen Scaffold-Positionen zugeordnet werden konnten. Für die meisten der Genmodelle (106) wurde nur jeweils 1 Peptid gefunden. Die Genmodelle, die mit mindestens zwei Peptiden identifiziert wurden, sind in Tabelle 1 dargestellt.  $\beta$ -Tubulin ist in Version 2.0 der Datenbank mit 2 Genmodellen vertreten. Bei einem dieser Genmodelle fehlen im vorderen Bereich allerdings 73 Aminosäuren. Dieses Modell wurde daher nicht in Tabelle 1 aufgenommen. Neben der Anzahl der gefundenen Peptide und der Nummer des Genmodells zeigt die Tabelle außerdem die berechnete Größe des jeweiligen Modells sowie die Nummern und das Molekulargewicht der Gelbanden, in denen die Peptide identifiziert wurden. In rot gedruckte Annotationen beziehen sich auf Version 2.0 der JGI-Datenbank. Die übrigen Annotationen wurden entweder über Blasts ermittelt oder aus dem Centriolen-Proteom entnommen (Keller et al., 2005). Mit BUG sind Proteine bezeichnet, deren Expression bei der Geißelregeneration hochreguliert ist („basal-body proteins with upregulated genes“) und die POC-Proteine („proteome of centriole“) wurden aufgrund von Datenbankvergleichen bei centriolären Proteinen eingeordnet (Keller et al., 2005).

Unter den Proteinen, die mit mehreren Peptiden identifiziert wurden, befinden sich bereits bekannte Basalapparatproteine wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, Centrin und SF-Assemblin. Die Peptide, die für diese Proteine gefunden wurden, verteilen sich jeweils gleichmäßig über das gesamte Protein. Die Abdeckungen reichen dabei von knapp 12 % ( $\alpha$ -Tubulin) bis 33 % (Centrin). Das Protein SFI1 ist ebenfalls ein centrosomales Protein. Es besitzt Bindestellen für Centrin und ist im Spindelpolkkörper der Hefe lokalisiert (Kilmartin, 2003). Die kleine Untereinheit der RUBISCO (RBCS2) sowie die Malatsynthase stellen Kontaminationen dar, die mit 3 bzw. 5 Peptiden gefunden wurden. Tabelle 1 enthält darüber hinaus mehrere Proteine, die bisher nicht annotiert sind und daher Basalapparatproteine sein könnten. Viele dieser Proteine verfügen über sogenannte „coiled coil“-Bereiche. Bei dieser Struktur handelt es sich um Motive aus 7 Aminosäuren oder Vielfachen davon („Heptad-Repeats“), die  $\alpha$ -Helices ausbilden. Durch hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten bilden mehrere solcher Helices die „coiled coil“-Struktur aus. Diese Struktur spielt bei Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle.

Peptid-Anzahl	Genmodell	Annotation	Größe des Modells	Nr. und Größe der Gelbände
2	162993	„coiled coil“-Protein	94,6 kDa	Bande 11 110 kDa
2	159932	„coiled coil“-Protein	83,5 kDa	Banden 13/14 90 kDa
2	154863	Actin, IDA5 („inner dynein arm“)	41,8 kDa	Banden 7/34 170/32 kDa
2	163629	SFI1-like (5 Sfi-Repeats), POC4	87 kDa	Bande 11 110 kDa
2	172124	„coiled coil“-Protein	102,3 kDa	Banden 11/47 110/14 kDa
3	168407	Keine Annotation	109,3 kDa	Bande 19 70 kDa
3	168391	RBCS2	15 kDa	Bande 48 15 kDa
4	152719	SF-Assemblin	31,1 kDa	Bande 33 34 kDa
5	156177	Centrin (VFL2)	21,4 kDa	Bande 42 19 kDa
5	161716	„coiled coil“-Protein, BUG27, Kandidat 27	41,5 kDa	Banden 27/28/31 47-39 kDa
5	168551	Malatsynthase (MAS)	67,1 kDa	Banden 10/22-24/26 120/60-55/50 kDa
5	154911	$\alpha$ -Tubulin (TUA2)	49,6 kDa	Banden 26/27 50-48 kDa
7	171207	„coiled coil“-Protein, Kandidat 90	44,4 kDa	Bande 19 74 kDa
7	156421	„coiled coil“-Protein, BUG23, Kandidat 156	44,5 kDa	Banden 25/26 52-50 kDa
7	162995	Bester Hit bei Blasts: hypothetisches 67,8 kDa <i>Arabidopsis</i> -Protein, Kandidat 31	63,2 kDa	Banden 21-23 65-58 kDa
8	169905	$\beta$ -Tubulin (TUB1)	49,6 kDa	Banden 25-27 52-48 kDa
9	159547	EEF1 (mitochondrialer Translationsfaktor Tu), Kandidat 20	120,6 kDa	Banden 8-12 150-100 kDa

**Tabelle 1: Übersicht über die Genmodelle, die mit 2 oder mehr Peptiden im 1D-Gel-Ansatz gefunden wurden**

Die Nummern der Genmodelle wurden der Version 2.0 der *Chlamydomonas*-Datenbank von JGI entnommen. Rot gedruckte Annotationen wurden ebenfalls aus dieser Datenbank übernommen. Die übrigen Annotationen wurden entweder durch Blasts ermittelt oder beziehen sich auf das *Chlamydomonas*-Centriolen-Proteom (Keller et al., 2005), von wo auch die Bezeichnungen BUG („basal-body proteins with upregulated genes“) bzw. POC („proteome of centriole“) stammen. Die Nummern der Kandidaten wurden nach dem „Scaffold“ vergeben, auf dem das Genmodell liegt. Die Größe der Genmodelle wurde mit dem ProtParam-Programm von ExPASy berechnet. In der letzten Spalte stehen jeweils die Nummer und ungefähre apparente Molekularmasse der Gelbände, in der die Peptide gefunden wurden. Die unterschiedlichen Zahlen ergeben sich dadurch, dass die Peptide zu einigen Genmodellen z.T. in mehreren Gelbänden vorlagen.

Für weitere Untersuchungen (s. 4.2.4) wurden vier Proteine ausgewählt, die mit 5 bzw. 7 Peptiden eine relativ gute Abdeckung der Genmodelle zeigten. Die genauere Analyse des mit EEF1 annotierten Genmodells zeigt, dass es sich hier vermutlich um 2 unterschiedliche Gene handelt, die zu einem Modell zusammengefaßt wurden (s. 4.2.4). Daher wurde beschlossen, auch dieses Protein näher zu untersuchen. Alle 5 Kandidaten wurden später auch von Keller et al. (2005) identifiziert, wobei EEF1 aufgrund seiner Annotation der Liste mit Kontaminationen zugeordnet wurde. Die Nummerierung der Kandidaten erfolgte nach dem genomischen „Scaffold“ aus der JGI-Datenbank (Version 2.0), auf dem die Genmodelle liegen. Auch unter den Genmodellen, die nur mit einem Peptid gefunden wurden, befinden sich weitere potentiell interessante Proteine. Da die Identifikation durch nur 1 Peptid jedoch das Risiko birgt, dass es sich hierbei um ein falsch positives Protein handelt, wurden diese Proteine nicht weiter untersucht. In Bande 10 des 1D-Gels wurde das Genmodell 155111 identifiziert. Dieses Modell ist bisher nicht annotiert, weist aber eine gewisse Ähnlichkeit zu dem Basalapparatprotein BAp90 von *S. similis* auf. Allerdings bezieht sich diese Ähnlichkeit nur auf 34 % des Proteins mit einer Identität von 9 %. Die geringe Abdeckung und Identität ergeben sich unter anderem dadurch, dass das Modell eine Sequenzlücke von 434 Aminosäuren aufweist. Bei einer Gesamtgröße des Modells von 936 Aminosäuren entspricht diese Lücke also knapp der Hälfte des gesamten Modells. In den Banden 5 und 16 wurde ein Peptid gefunden, dessen zugehöriges Genmodell (158951) ebenfalls bisher nicht annotiert ist. Die Größe, bei der Bande 5 aus dem Gel ausgeschnitten wurde (knapp über 200 kDa), stimmt gut mit der Größe des Genmodells (215 kDa) überein. Bande 16 befindet sich allerdings bei ca. 85 kDa. Dieses Genmodell hat Ähnlichkeit zu dem menschlichen centrosomalen Protein CEP2. Die Ähnlichkeit erstreckt sich in diesem Fall über 79 % der Proteinsequenz, bei einer Identität von 13 %. Ein weiteres Modell (168675), dessen Peptid in Bande 11 des 1D-Gels gefunden wurde, ist als RIB72 annotiert. Dieses 72 kDa große Protein ist im sogenannten „ribbon“ der Geißeln lokalisiert (Ikeda et al., 2003). Das „ribbon“ ist eine Struktur aus 3 Protofilamenten, die mit den A-Mikrotubuli assoziiert ist und eine wichtige Rolle bei der dreidimensionalen Anordnung der unterschiedlichen Geißelkomponenten spielt. RIB72 wurde auch im Geißelproteom von *C. reinhardtii* gefunden (Pazour et al., 2005). Da sich die A-Mikrotubuli der Geißeln in den Basalkörpern fortsetzen, ist eine Lokalisation dieses Proteins in den Basalkörpern wahrscheinlich, auch wenn Ikeda et al. (2003) bei

Immunfluoreszenzexperimenten mit einem anti-RIB72-Antikörper keine Fluoreszenz an den Basalkörpern beobachtet haben.

Neben den beiden bereits genannten Verunreinigungen (Malatsynthase und RBCS2) wurden weitere Proteine gefunden, die als Kontaminationen gelten können. Hierzu gehören ribosomale Proteine (wie L12 und S3), sowie Histone (z.B. H4). All diese Proteine wurden allerdings nur durch jeweils ein Peptid identifiziert.

Die Analyse der Peptide, die keinem Genmodell, sondern ESTs bzw. genomischen „Scaffold“-Positionen zugeordnet worden waren, erbrachte keine weiterführenden Ergebnisse. Die ESTs wurden jeweils nur durch ein Peptid identifiziert. Auch bei den genomischen „Scaffolds“ befanden sich nie mehrere Peptide in einem Bereich, was evtl. die Aufstellung eines neuen Genmodells ermöglicht hätte. Darüber hinaus gab es zu Beginn Probleme mit den Peptiddaten, die aus Jena übermittelt wurden. So kam es des öfteren vor, dass sich innerhalb von Peptiden, die einem genomischen „Scaffold“ zugeordnet werden konnten, auf genomischer Ebene eigentlich ein Stop-Codon befand. D.h. beim „Übersetzen“ der Datenbank und dem anschließenden Durchsuchen aller 6 Leseraster wurde dieses Stop-Codon offenbar übersehen und somit ein eigentlich nicht existierendes Peptid ermittelt. Dieses Problem konnte erst im Laufe der Zeit behoben werden. Aus diesen Gründen wurde bei der Analyse der massenspektrometrischen Daten des 1D-Gel-Ansatzes nur mit den Genmodellen gearbeitet.

#### **4.2.2 MudPIT-Analyse**

Um weitere potentielle Basalapparatproteine zu finden bzw. um die bereits gefundenen Proteine zu bestätigen, wurde ein zweiter Ansatz gewählt. Bei einem gelbasierten Ansatz wie unter 4.2.1 beschrieben, kann es vorkommen, dass nicht alle Proteine in das Gel hineinwandern. Darüber hinaus ist es vorstellbar, dass sich einige der Peptide nach dem tryptischen Verdau nur schwer bzw. gar nicht mehr wieder aus dem Gel herauslösen lassen. Dies kann dazu führen, dass evtl. nicht alle Proteine detektiert werden können.

Aus diesem Grund wurde mit dem MudPIT-Verfahren ein direkterer Ansatz gewählt. Hierbei wurde ein Pellet von gereinigten Basalapparaten (ca. 20 µg Protein) direkt tryptisch verdaut und analysiert. Im Gegensatz zum 1D-Ansatz wurden die gefundenen Peptide nur den Genmodellen aus Version 2.0 der JGI-Datenbank zugeordnet.



Der MudPIT-Ansatz lieferte 450 unterschiedliche Peptide, die sich auf insgesamt 295 Genmodelle verteilen. Wie schon beim 1D-Gel-Ansatz wurden auch hier die meisten Modelle (220) nur durch ein Peptid identifiziert. Die Genmodelle wurden mit dem zu diesem Zeitpunkt bereits bekannten Basalkörperproteom verglichen. Das von Keller et al. (2005) ermittelte Proteom war ebenfalls durch ein MudPIT-Verfahren identifiziert worden. Tabelle 2 zeigt bereits bekannte und neue, potentielle Basalkörperproteine, die in diesen beiden MudPIT-Ansätzen gefunden wurden. Neben der Anzahl der ermittelten Peptide für das jeweilige Genmodell ist in Tabelle 2 auch dargestellt, ob dieses Protein im Geißelproteom vorkommt (GP), und ob es im 1D-Ansatz gefunden wurde. Die beiden Tubuline zeigen mit 8 bzw. 10 Peptiden auch im MudPIT-Ansatz eine gute Abdeckung. Weitere bekannte Proteine, die auch schon im 1D-Ansatz entdeckt wurden, sind RIB72, SF-Assemblin und Centrin.

Darüber hinaus gibt es einige bereits annotierte Proteine, die im 1D-Ansatz nicht identifiziert wurden (s. Tabelle 2). So wurde z.B. das „cartwheel“-Protein BLD10 hier mit 3 Peptiden gefunden. Das Genmodell 168881 ist als Tektin annotiert. Für Tektine ist eine Lokalisation in Centriolen und axonemalen Mikrotubuli schon seit einiger Zeit bekannt (Steffen und Link, 1988; Stephens und Lemieux, 1998). Hierbei handelt es sich um ca. 45-55 kDa große Proteine, die Ähnlichkeit zu Proteinen der Intermediärfilamente besitzen. Diese Ähnlichkeit umfaßt die Löslichkeitseigenschaften, Aminosäurezusammensetzung und hohen Anteil an  $\alpha$ -Helices. Auch für das Hitzeschockprotein HSP90A wurde eine centrosomale Lokalisation über Immunfluoreszenzmikroskopie in *Drosophila* nachgewiesen (Lange et al., 2000). Ist HSP90 in *Drosophila* mutiert bzw. behandelt man Säugerzellen mit einem HSP90-Inhibitor, so kommt es zu abnormaler Auftrennung und Reifung der Centrosomen. Des weiteren wurden dort aberrante Spindeln beobachtet, die zu Problemen bei der Verteilung der Chromosomen führen. Eine Rolle von HSP90 bei der korrekten Funktionsweise der Centrosomen wird daher angenommen. OFD1 und NPHP-4 sind Proteine, die in mutiertem Zustand eine Rolle bei Nierenkrankheiten spielen. OFD1 („oral-facial-digital“) ist während des gesamten Zellzyklus mit menschlichen Centrosomen assoziiert. Im Nierenepithel, also in postmitotischen, differenzierten Zellen, ist dieses Protein an den Basalkörpern lokalisiert, die an der Basis der primären Cilien sitzen (Romio et al., 2004). NPHP-4 (Nephrocystin-4) zeigt eine ähnliche Lokalisation und ist mit  $\alpha$ -Tubulin assoziiert (Mollet et al., 2005). Der Elongationsfaktor EF1A2 zeigt gewisse Ähnlichkeit zu EF-1 $\alpha$ , der durch Immunfluoreszenzmikroskopie in den Cilien von

*Tetrahymena* und *Paramecium* nachgewiesen wurde (Ueno et al., 2003). Auch in anderen Organismen ist er mit Mikrotubuli assoziiert (Durso und Cyr, 1994; Ohta et al., 1990; Kuriyama et al., 1990), so dass eine Lokalisation auch in den Basalkörpern nicht auszuschließen ist. EF-1 $\alpha$  wurde als Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-bindendes Protein identifiziert, und es wird vermutet, dass es die Interaktion von Calmodulin mit den Mikrotubuli vermittelt (Ueno et al., 2003).

Sowohl die in dieser Arbeit durchgeführte MudPIT-Analyse als auch Keller et al. (2005) bestätigen die 5 Kandidaten, die aufgrund des 1D-Gel-Ansatzes für weitere Untersuchungen ausgewählt worden waren. Von den 295 Genmodellen, die durch die MudPIT-Analyse gefunden wurden, war Kandidat 31 das Protein, welches durch die meisten Peptide identifiziert wurde. Mit 12 unterschiedlichen Peptiden wurden für diesen Kandidaten sogar mehr Peptide ermittelt als für  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Tubulin.

Betrachtet man die neuen, bisher nicht annotierten Proteine in Tabelle 2, so fällt der hohe Anteil an „coiled coil“-Proteinen ins Auge. Dies wurde bereits beim 1D-Ansatz beobachtet. Hier bieten sich weitere Kandidaten für zukünftige nähere Untersuchungen an.

Genmodell	Annotation bzw. Domänen	Anzahl der Peptide	1D-Gel-Ansatz	GP
162995	Hypothetisches <i>Arabidopsis</i> Protein, <b>Kandidat 31</b>	12	+ (7)	-
169905	$\beta$ -Tubulin	10	+ (8)	+ (34)
154911	$\alpha$ -Tubulin	8	+ (5)	+ (35)
152450	Elongationsfaktor EF1A2	7	-	+ (32)
153659	In FABB, Domäne: EF-Hand, POC15	5	-	-
170900	„coiled-coil“-Protein	5	+ (1)	-
168881	<b>Tektin</b> , in FABB	4	-	+ (24)
170075	„coiled-coil“-Protein	4	-	-
157801	OFD1 (LisH-Domäne), BUG11	3	-	-
159547	<b>EEF1, Kandidat 20</b>	3	+ (9)	-
159932	„coiled-coil“-Protein	3	+ (2)	+ (1)
161716	„coiled-coil“-Protein, BUG27, <b>Kandidat 27</b>	3	+ (5)	-
162499	POC1	3	-	-
168432	BLD10, in FABB	3	-	+ (1)
171207	„coiled-coil“-Protein, <b>Kandidat 90</b>	3	+ (7)	-
156177	<b>VFL2 (Centrin)</b>	2	+ (5)	+ (6)
156421	„coiled-coil“-Protein, BUG23, <b>Kandidat 156</b>	2	+ (7)	-
156598	In FABB, Domäne: „P-loop“, POC2	2	-	-
157125	„coiled-coil“-Protein	2	-	-
162352	BAP95 ( <i>S. similis</i> )	2	-	-
164333	NPHP-4 (Nephrocystin-4), in FABB, POC10	2	-	-
168999	Keine Annotation	2	-	-
152527	Keine Annotation	1	-	-
152719	<b>SF-Assemblin</b>	1	+ (4)	-
155808	Centrin3, Domäne: EF-Hand, POC6	1	-	-

Genmodell	Annotation bzw. Domänen	Anzahl der Peptide	1D-Gel-Ansatz	GP
156907	„coiled-coil“-Protein	1	-	-
157754	Keine Annotation	1	-	-
159234	Keine Annotation	1	-	-
163597	CEP290, POC3	1	-	-
164517	Hypothetisches Protein des menschlichen Centrosoms, in FABB, POC11	1	-	-
166376	Ähnlichkeit mit RIB72 (DM10-Domäne), POC9, in FABB	1	-	-
167712	In FABB, POC18	1	-	-
168675	RIB72, in FABB	1	+ (1)	+ (44)
168906	Cgcr-4 Protein, FAP63	1	-	+ (23)
169301	HSP90A	1	-	+ (2)

**Tabelle 2: Übersicht über bereits bekannte und neue, potentielle Basalkörperproteine, die mit dem MudPIT-Verfahren identifiziert wurden**

Sämtliche in dieser Tabelle dargestellten Proteine wurden auch von Keller et al. (2005) gefunden. Von dort stammen auch die Bezeichnungen BUG („basal-body proteins with upregulated genes“) bzw. POC („proteome of centriole“). Die Nummern der Genmodelle wurden der Version 2.0 der *Chlamydomonas*-Datenbank von JGI entnommen. Rot gedruckte Annotationen wurden ebenfalls aus dieser Datenbank übernommen. FAP („flagellar associated protein“) steht für Proteine aus dem Geißelproteom (Pazour et al., 2005), und mit FABB sind Proteine bezeichnet, die in dem vergleichenden Bioinformatik-Ansatz gefunden wurden (Li et al., 2004). In der dritten Spalte steht jeweils die Anzahl der Peptide, die im MudPIT-Verfahren gefunden wurde. In den letzten beiden Spalten ist vermerkt, ob diese Proteine im 1D-Gel-Ansatz bzw. im Geißelproteom (GP; Pazour et al., 2005) enthalten waren. Die Zahlen in den Klammern geben an, wieviele Peptide dabei gemessen wurden.

Neben den in Tabelle 2 dargestellten Proteinen, die in beiden MudPIT-Analysen gefunden wurden, lieferte die in Bochum durchgeführte Messung auch einige interessante Genmodelle, die nicht im Proteom von Keller et al. (2005) enthalten sind. Mit jeweils zwei Peptiden wurden die Genmodelle 152443 und 155096 identifiziert. Bei den vier Peptiden, die gemessen wurden, handelte es sich in allen Fällen um zweiwertige Ionen, deren  $X_{\text{Corr}}$ -Werte zwischen 4,0 und 5,8 lagen. Diese Werte befinden sich damit deutlich über dem minimalen  $X_{\text{Corr}}$  von 2,5 für zweiwertige Ionen. Die beiden Genmodelle sind bisher nicht annotiert, werden aber gut durch EST-Daten unterstützt. Für zwei weitere Genmodelle wurden jeweils drei Peptide gefunden: 167609 und 157979. Das erste Modell ist mit 17 Exons und 764 Aminosäuren relativ groß. Es wird am N- und C-terminalen Ende durch einige wenige ESTs unterstützt. Bei dem zweiten Modell handelt es sich um ein „coiled coil“-Protein, das auch im Geißelproteom mit drei Peptiden (Pazour et al., 2005) und im 1D-Ansatz mit einem Peptid in Bande 8 identifiziert wurde. In Version 2.0 der Datenbank umfaßt das Modell zwei genomische Sequenzlücken von ca. 700 und ca. 1600 Nukleotiden. EST-Daten sind bisher nicht vorhanden. Mit vier Peptiden wurde das Genmodell 156687 gefunden. Annotiert ist dieses durch EST-Daten gut unterstützte

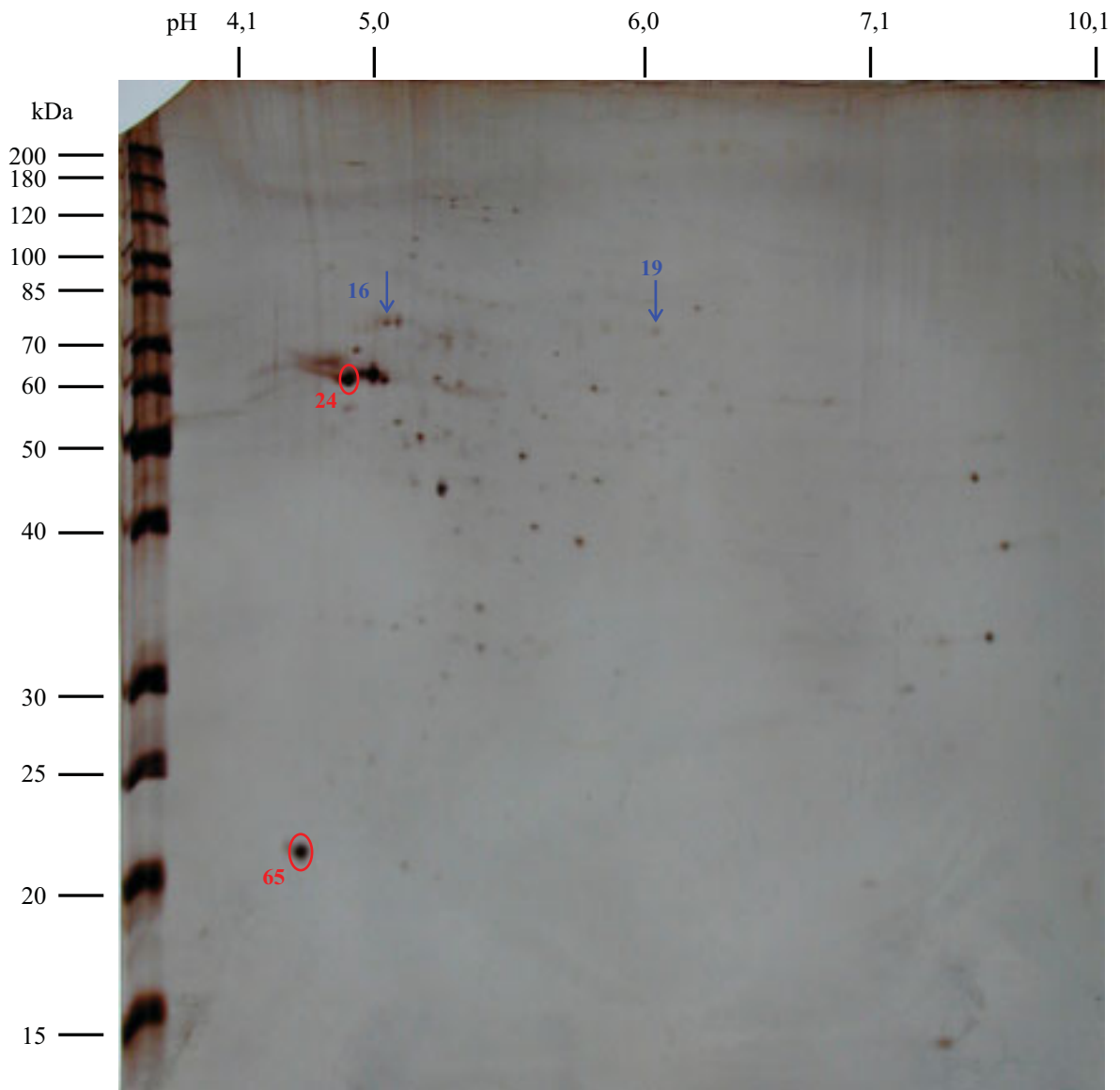
Modell als Lci5 („low CO<sub>2</sub> inducible“). Schließlich wurden noch zwei weitere bisher nicht annotierte Genmodelle durch jeweils fünf Peptide identifiziert: 161727 und 170639. Keines dieser Modelle wird bisher durch ESTs unterstützt, aber sämtliche Peptide (alles zweiwertige Ionen) zeigten gute  $X_{\text{Corr}}$ -Werte (3,8-4,3 für 161727 und 2,9-4,3 für 170639). Auch die MudPIT-Analyse lieferte neben bereits bekannten und neuen, potentiellen Basalapparatproteinen eine Reihe an Kontaminationen. Die schon im 1D-Ansatz gefundenen Proteine Malatsynthase und RBCS2 wurden hier mit vier bzw. einem Peptid identifiziert. Diese beiden Proteine finden sich auch bei Keller et al. (2005) in der Fraktion, die die Basalkörper enthält. RBCS2 ist darüber hinaus auch im Geißelproteom (Pazour et al., 2005) mit zwei Peptiden vertreten. Weitere Proteine, die auch schon im 1D-Ansatz als Kontaminationen vertreten waren, umfassen Histone und eine ganze Reihe an ribosomalen Proteinen. Diese beiden Klassen an Verunreinigungen wurden jeweils nur mit ein bis zwei Peptiden identifiziert. Für den Elongationsfaktor EF3 wurden bei der MudPIT-Analyse in Bochum sechs Peptide gefunden. Dieses Protein taucht sowohl im Geißelproteom mit acht Peptiden (Pazour et al., 2005) als auch im Basalkörperproteom (Keller et al., 2005) auf. Bei letzterem befindet es sich in der Fraktion, die auch die Basalkörper enthält. Des weiteren wurden auch noch folgende Proteine identifiziert, die den Kontaminationen zugerechnet werden können: zwei mitochondriale Porine (drei bzw. fünf Peptide), Rubisco-Activase (sieben Peptide) und MST1, ein Protein der Mastigonemen (Geißelhaare; drei Peptide). Schließlich fanden sich auch noch einige FAPs („flagellar associated proteins“) aus dem Geißelproteom (Pazour et al., 2005) mit jeweils einem bis zwei Peptiden. Bei diesen Proteinen bleibt bisher offen, ob es sich um Proteine handelt, die ausschließlich in den Geißeln lokalisiert sind, oder ob sie evtl. vielleicht auch in den Basalkörpern vorkommen. Zwei dieser FAPs befinden sich bei Keller et al. (2005) in der Liste der BUGs („basal-body proteins with upregulated genes“).

#### 4.2.3 2D-Gel-Ansatz

Bei einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE – wie unter 4.2.1 durchgeführt – können in den einzelnen Banden mehrere Proteine enthalten sein. Werden diese Banden massenspektrometrisch untersucht, ist es vorstellbar, dass die Peptide von weniger häufigen Proteinen von Peptiden der häufigeren Proteine „überdeckt“ werden. Daher wurde ein weiterer Ansatz zur Identifikation der Proteine des Basalapparates gewählt: beim 2D-Gel-Ansatz werden Proteine nicht nur gemäß ihres

Molekulargewichts, sondern auch nach ihrer Ladung getrennt. Um eine gute Fokussierung der Proteine während der ersten Dimension (isoelektrische Fokussierung, IEF) zu erreichen, mußten die Basalapparate solubilisiert und denaturiert werden. Da die IEF als Trennprinzip Ladungsunterschiede ausnutzt, wurde zur Denaturierung ein ungeladenes Detergens (CHAPS) verwendet (Perdew et al., 1983). Außerdem kamen Harnstoff und Thioharnstoff zum Einsatz. Der Probenpuffer enthielt darüber hinaus Dithiothreitol (DTT) zur Spaltung der Disulfidbrücken und zur Herstellung reduzierender Bedingungen. Im Gegensatz zu anderen Chemikalien stört diese Substanz den pH-Gradienten am wenigsten (Righetti et al., 1982).

Für den 2D-Ansatz wurden jeweils zwei Basalapparatpellets (ca. 40 µg Protein) pro Gel verwendet. Abbildung 6 zeigt ein repräsentatives, silbergefärbtes Gel. Die Basalapparate konnten mit einer guten Reproduzierbarkeit in ungefähr 60-75 Proteine aufgetrennt werden (gezählt in 7 Gelen). Die silbergefärbten Spots wurden ausgeschnitten und zunächst bei -20 °C gelagert. Der Kooperationspartner für die massenspektrometrische Analyse der Spots in Jena befand sich zu dieser Zeit in der Anschaffungsphase eines neuen Massenspektrometers. Da es dabei zu Verzögerungen kam, lagerten die Spots für mehrere Monate bei -20 °C. Eine Analyse der Spots 16 und 19 nach dieser Zeit lieferte keine brauchbaren Ergebnisse. Die Peptidlisten enthielten mehrere Dutzend Peptide, die ebensovielen Genmodellen zugeordnet waren. Auch die Messung dieser beiden Spots in Bochum durch Herrn Dr. Wolters blieb erfolglos. Es muß daher davon ausgegangen werden, dass die Spots durch die lange Lagerung nicht mehr für eine massenspektrometrische Analyse verwendet werden können. Lediglich die Spots 24 und 65 konnten in Jena identifiziert werden. Dabei handelt es sich um  $\beta$ -Tubulin (Spot 24) und Centrin (Spot 65). Für die beiden Proteine wurden 11 ( $\beta$ -Tubulin) bzw. 3 Peptide (Centrin) gemessen. Allerdings wurden auch bei dieser Analyse nicht nur Peptide für die beiden Proteine gefunden, sondern die Listen enthielten ebenfalls eine große Anzahl von weiteren Peptiden, die den unterschiedlichsten Genmodellen zugeordnet werden konnten.



**Abb. 6: Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) isolierter Basalapparate**

Ca. 40  $\mu\text{g}$  Protein wurden durch isoelektrische Fokussierung (pH-Bereich 3-10) und darauffolgende SDS-PAGE (11 %iges Gel) getrennt. Das Gel wurde silbergefärbt. Die Positionen des Molekulargewichtstandards sind links angegeben. Die Position der isoelektrischen Punkte ist von links (sauer) nach rechts (basisch) eingezeichnet. Die Spots 24 und 65 (rote Kreise) wurden als  $\beta$ -Tubulin und Centrin identifiziert. Die Spots 16 und 19 (blaue Pfeile) wurden ebenfalls massenspektrometrisch untersucht, konnten aber nicht identifiziert werden.

#### 4.2.4 Kandidaten für weitere Untersuchungen

##### Kandidat 20 (Genmodell 159547)

Dieses potentielle Basalapparat-Protein war mit 9 (1D-Gel-Ansatz) bzw. 3 Peptiden (MudPIT-Ansatz) identifiziert worden und ist in Version 2.0 der *Chlamydomonas*-Datenbank als EEF1 (mitochondrialer Translationsfaktor Tu) annotiert. Auch im Proteom von Keller et al. (2005) wurde dieses Protein in der Fraktion, die die Basalkörper enthielt, gefunden. Aufgrund der Annotation wurde es dort allerdings in die Liste der Kontaminationen eingeteilt. Das Genmodell dieses Kandidaten ist in Abb. 7 dargestellt. Die genauere Analyse dieses Modells ergab, dass die Annotation nur für den vorderen Teil zutrifft. Der hintere Teil, der sämtliche in den beiden massenspektrometrischen Verfahren identifizierten Peptide enthält, zeigt keinerlei Ähnlichkeit zu Translationsfaktoren. Vermutlich wurden hier 2 unterschiedliche Gene zu einem Genmodell verbunden. Im hinteren Teil des Modells befinden sich außerdem 2 genomische Sequenzlücken von 1241 bp und 2085 bp. Das 9. Peptid aus dem 1D-Gel-Ansatz konnte nicht in Abb. 7 dargestellt werden, da es sich ca. 100 bp hinter der 2. genomischen Sequenzlücke in einem postulierten Intron befindet. In diesem Bereich wurde wahrscheinlich bei der Aufstellung des Genmodells ein weiteres Exon „übersehen“. Das letzte Exon des Modells ist mit 7 Aminosäuren relativ kurz. Allerdings befindet sich nur 7 Nukleotide hinter dem Stop-Codon eine weitere genomische Sequenzlücke. Es ist daher denkbar, dass sich in dieser Lücke, wie auch schon in den ersten beiden genomischen Sequenzlücken, weitere Exons verbergen. Der hintere Bereich des Modells mit den Peptiden verfügt außerdem über „coiled coil“-Bereiche.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Version (Version 3.0) der JGI-Datenbank veröffentlicht. In dieser neueren Version ist EEF1 ein eigenständiges Genmodell (98182), allerdings ohne Start-Codon. Für den hinteren Teil wurde kein neues Genmodell aufgestellt.

>C\_200083 [chlre2:159547]

```

1      MAFAAGLMVGAGRRIFATTLSTLQAQASSASRPPLASENNVFNVVRRAFCYDINSRTKPHL
61     NVGTIGHVDHGKTTTLTAAITKVLAETGGSTKVVAVDQIDKAPEEKARGITINATHVEYQT
121    EKRYAHVDCPGHADVKNMITGAAQAGADTHLPIRVLAHSLSSPPASLCPPSCQMDGAI
181    LVVSAADGMPMPQTREHILLAKQVGVPRIVVFLNKCDVVEDKELQELVEMERELLSFYKF
241    PGDEIPVVVRSALAAIKGEKDDTVGKASILKLMQAVDDYVLPERATDKPFQMPIEDVFS
301    IAGRGTVVTGRIEQGIIKAGEDIEIVGLKDTIKSTVTGVEMFKKSLGQQAGDNVGLLVR
361    GIKREDVSRGQVMAKPGSIKTYKQFEAEVYALTKEEGGRHTPFTTKYKPOFFIRTADVAG
421    QITLPEGTTMVPGDNFRATIDLSAPVALEVGLRFAIRDSSKTVGAGVTAEEKSKEARAA
481    ARRERRAKKRQLETSASGSSSAETSPPAEPTAAPSPKSASAASSSPAASSSSSSST
541    SRPRPKNTVSGSTTTGRTSSSSSSNTSSGNGSGGGGFNGFAVGATVLGGIGAFLGLQQ
601    FGKTSDSSKAALAQAVERLGEKLEDKEKEKEEVKAVLQSQVEELKEEEAVMQAAKSRE
661    DELQAVAVESQAVAQLESEVAAARAAIQDKERKMLELEKQIAKMQQISIGKDQLLATK
721    DMKAQVAKLESAVNTASQQLQRAQQLASVKASLDEQTAEVAARQEALEAREAALAARQ
781    QAEELEAKNTVLVRSSVELGKMQDLQALNATRAQVTTLEKQVKEANVALVKSAKLRE
841    LEVQVPALQKELATGQALEASRAELLAARSAASDLEAKNTALIRQATASLSREGDLQA
901    LNISRAESAKLDDELKKAKAGLAAASTSASEANQRLTVAEAKVRETETQKAALVRDAQMA
961    LSRASDLQALNVFKEKSAKLDGELKSARTQLAAATSQAQAANRQWDAENALREAEQQR
1021  EKLVKTAQVAITKSTDLQALNATKQQATKLETEVKQVRGQLEAVGGRAAEAEKKLTSTS
1081  SQLEAARAEREKLGSKLEDQVAKARDAMKAAEERRAAEKAMVNMQPSCPAP*

```

#### Abb. 7: Genmodell von Kandidat 20

Die Aminosäuresequenz des Genmodells wurde der Version 2.0 der *Chlamydomonas*-Datenbank entnommen. Peptide, die durch den 1D-Gel-Ansatz identifiziert wurden, sind in rot dargestellt. Peptide, die mit Hilfe des MudPIT-Verfahrens gefunden wurden, sind blau unterstrichen. Die Unterstreichung im vorderen Teil des Modells kennzeichnet den Bereich, der Ähnlichkeit mit anderen mitochondrialen Elongationsfaktoren aufweist. Die zwei genomischen Sequenzlücken befinden sich jeweils zwischen den beiden grünen Aminosäuren. Die Introns liegen jeweils zwischen den beiden fett gedruckten Aminosäuren.

#### Kandidat 27 (Genmodell 161716)

Für diesen Kandidaten wurden 5 Peptide im 1D-Gel-Ansatz und 3 Peptide bei der MudPIT-Analyse gefunden. Die Peptide erstrecken sich über das gesamte Protein und decken insgesamt ca. 27 % des Modells ab (s. Abb. 8). Die Größe des Genmodells mit ca. 41,5 kDa und das Molekulargewicht der Gelbanden (ca. 39-47 kDa), in der die Peptide gefunden wurden, stimmen gut überein. Bei diesem Protein handelt es sich um ein „coiled-coil“-Protein. Bisher ist dieses Genmodell nicht annotiert. Es wurde aber auch im Proteom von Keller et al. (2005) identifiziert und dort in die Klasse der BUGs („basal-body proteins with upregulated genes“) eingeteilt; und zwar als BUG27. In Version 3.0 der Datenbank hat das Genmodell einen neuen Start, welcher der Aminosäure 66 des alten Modells entspricht. Das führt dazu, dass insgesamt 3 Peptide, die durch die beiden Ansätze gefunden wurden, nicht mehr Teil des Modells sind (s. Abb. 8).



>C\_270036 [chlre2:161716]

```

1      MTSSGLNLTQLKARLNRLGVDVRGGGATEGAPLSPPPAIIPRSAARSPAPQDGADPIAHE
61     RGRKGMADLFINRVERAMNSAEAQGSIIQQALNEDFGKLAVAAAEADAARSSPKPDRIK
121    KPKSAAKGARPSGLLPGPPKGLSAAVRSVDHMRSIPAHTPLSSVLAQFKEAETAWAHEKAR
181    LRREAIEERKRANKLELDYKRLQRVNEHQMLDVKALKTALKSRDSQLENASERIRELDVA
241    LQRTQEESALAIASLNAERDDLKGLLLAALQRLEAVDELMRLLEEERSKALDAAARARTE
301    VAELAESRRKLQWQSKLLEKMSEADPARHAPASAPAACPQVQLKHNKRKSEAIRRLSVD
361    QEGGGPSAAELAAADSELLDDDL*

```

#### Abb. 8: Genmodell von Kandidat 27

Die Aminosäuresequenz des Genmodells wurde der Version 2.0 der *Chlamydomonas*-Datenbank entnommen. Peptide, die durch den 1D-Gel-Ansatz identifiziert wurden, sind in rot dargestellt. Peptide, die mit Hilfe des MudPIT-Verfahrens gefunden wurden, sind blau unterstrichen. Der Start des Genmodells in Version 3.0 der Datenbank ist durch das grüne, fett gedruckte Methionin gekennzeichnet.

#### Kandidat 31 (Genmodell 162995)

Dieser Kandidat wurde mit 7 (1D-Gel-Ansatz) bzw. 12 Peptiden (MudPIT-Ansatz) gefunden (s. Abb. 9). Insgesamt umfassen die Peptide 290 der 587 Aminosäuren des Modells, was einer Abdeckung von ca. 49 % entspricht. Auch hier stimmt die Größe des Genmodells (63 kDa) sehr gut mit dem Molekulargewicht der Banden (58-65 kDa) überein, in denen die Peptide gemessen wurden (s. Tabelle 1). Keller et al. (2005) haben dieses Protein ebenfalls identifiziert. Die Datenbank liefert keine Annotation, aber es besteht eine gewisse Ähnlichkeit zu einem hypothetischen *Arabidopsis*-Protein von 67,8 kDa. Diese Ähnlichkeit erstreckt sich allerdings nur über einen Bereich von 12 % des Genmodells und weist in dieser Region auch nur eine Identität von 39 % auf. Als funktionelle Domäne besitzt dieser Kandidat sogenannte „Armadillo-repeats“. Es handelt sich hierbei um ein ca. 40 Aminosäuren-langes Motiv, das erstmals in *Drosophila* gefunden wurde (Riggleman et al., 1989) und das eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielt. In Version 3.0 der Datenbank ist das Modell leicht verändert. Die ersten 5 sowie die letzten beiden Exons stimmen zu 100 % mit Version 2.0 überein. Exon 6 liegt jedoch in der neuen Version an anderer Stelle und umfaßt nur noch 8 Aminosäuren. Der Start von Exon 7 ist um 27 Aminosäuren nach hinten verschoben, und Exon 8 wurde in 2 kleinere Exons unterteilt. Diese Umstrukturierung der Exon-Intron-Struktur führt dazu, dass mehrere der gemessenen Peptide in der neuen Version in postulierte Introns fallen.

>C\_310013 [chlre2:162995]

```

1      MSAYDLAEADYLTRLTVRRRLAELNATRARVEALEARASLAEEYENERRKLDLLQRLQDKY
61     SALSPIVVTDASLAIADLRHLQGVYDADLLSDPQLRALTMLHAVAFSTRITLDRFSEPGR
121    YALEGSAGVLELGASTLAMFSSRAGGAVAFAEAFVPLVKLLSPLYAPVVVNIANAIG
181    NLADDLDIRLALRSGGGIGALVRLLRPDCEASVQAAAAGALSLLAARDIVVQDSVR | YLG
241    VDLLVDLLVTADAYTAEAARYCLLSLRRGNTKNQAETIAAIRANSNVVRNVRRVDPELLR
301    FEEGTPRVKSSYAPPPMSPAALGYGYGTPTKALARPTTADSYRRSAALDSMTGALARSVS
361    PGRYRSPLAAAISASAAASPAVTALRGSLDAELARAASPLRSSLRASTLAARYSPPPASA
421    LALAEPESALGVMPEVDSDLLKRKHLIRYTAEEELATLLQEMGFDKLDRSFKLNGVAGVD
481    LLDMSEDEMVRLLLPRHKVRKLRLALQRAVALFDRIATLPRQGRLSEVELRFLAAQCGC
541    SVEVDKVVRLVRSLVRTDKLDFVTFWDFVCAYDWIAQAFRIYAIPA*
```

### Abb. 9: Genmodell von Kandidat 31

Die Aminosäuresequenz des Genmodells wurde der Version 2.0 der *Chlamydomonas*-Datenbank entnommen. Peptide, die durch den 1D-Gel-Ansatz identifiziert wurden, sind in rot dargestellt. Blau unterstrichene Peptide wurden mit Hilfe des MudPIT-Verfahrens gefunden. Gepunktete blaue Linien bzw. der senkrechte rote Strich stellen jeweils die Grenze zwischen einzelnen Peptiden dar. Die fett gedruckten Bereiche kennzeichnen Regionen, die in Version 3.0 der Datenbank in Introns liegen.

### Kandidat 90 (Genmodell 171207)

Für diesen Kandidaten wurden 7 (1D-Gel-Ansatz) bzw. 3 Peptide (MudPIT) gemessen (s. Abb. 10). Die Abdeckung des Genmodells durch die Peptide beträgt ca. 25 %. Bei Keller et al. (2005) ist dieses bisher nicht annotierte Modell in der Liste der neuen Basalkörperproteine eingetragen. Wie Kandidat 27 besitzt auch dieses Protein „coiled-coil“-Domänen. Vergleicht man die Größe des Genmodells mit dem Molekulargewicht der Gelbande, in der die Peptide gefunden wurden (s. Tabelle 1), so fällt auf, dass diese sehr unterschiedlich sind. Das Modell ist 44,4 kDa groß, wohingegen die Gelbande bei ca. 74 kDa lag. Die Betrachtung der DNA-Sequenz zeigt, dass sich direkt hinter dem postulierten Stop-Codon eine Sequenzlücke von knapp 90 bp befindet (s. Abb. 17). In der neueren Version 3.0 der Datenbank ist diese Lücke geschlossen. Allerdings wurde das letzte Exon, das in Version 2.0 mit nur 3 Aminosäuren extrem kurz war, entfernt. Das neue Modell besitzt somit kein Stop-Codon mehr, und es liegt nahe, dass noch weitere bisher nicht identifizierte Exons zu diesem Modell gehören. Dies wäre eine mögliche Erklärung für den beobachteten Größenunterschied (s. auch 4.3.2).

>C\_900023 [chlre2:171207]

```

1      MPHQRLDQQYRRRAEEKIGDFREKLKEARGELSTKDRQLEATRRLAKLKGQEKSELA AVAE
61     ESRDLSRKLGAKLSLSGGEVPELTAKLQRSKRKVTELTAQLHEAQTRRLLLAEEATRQQSA
121    EVVVLKALGLRSELPDFSGYGYDGOAQLLQSLAKSQEESAALVGQLADSGRRVNALEQQ
181    VVHLHGELERLVGARVAAEEALLGARREAADAHGRAAAATQIESLRSEIRSVVEASEAAAE
241    QGRAVHAAREAALEAQVAGLQKQVLEQEARAASARDHEVDLLRLQSRAGALEASLEGSK
301    LREGSLERDAAALREEVERLARNNQDL SMGLAAARAEAAAANAERAEDAAASTDSERRLRM
361    QAAAQMEAAATNRGAVREEQLGLDAARLRAEGATMALANERLTAEIKQTV*

```

#### Abb. 10: Genmodell von Kandidat 90

Die Aminosäuresequenz des Genmodells wurde der Version 2.0 der *Chlamydomonas*-Datenbank entnommen. Peptide, die durch den 1D-Gel-Ansatz identifiziert wurden, sind in rot dargestellt. Fett gedruckte Aminosäuren sind die Grenze zwischen einzelnen Peptiden. Die blau unterstrichenen Peptide wurden mit Hilfe des MudPIT-Verfahrens gefunden.

#### Kandidat 156 (Genmodell 156421)

Dieser Kandidat wurde mit 7 (1D-Gel-Ansatz) bzw. 2 Peptiden (MudPIT) identifiziert, wobei die Peptide insgesamt ca. 24 % des Modells abdecken (s. Abb. 11). Bisher gibt es keine Annotation für das Genmodell, es besitzt aber „coiled-coil“-Domänen. Die Größen des Genmodells (44,5 kDa) und der Gelbande (ca. 50-52 kDa) stimmen in etwa überein (s. Tabelle 1). Wie Kandidat 27 gehört auch dieses Protein zu den BUGs (Keller et al., 2005); es wird also durch ein Gen kodiert, dessen Expression bei der Regeneration von Geißeln hochreguliert ist. In Version 3.0 der Datenbank wurde das letzte Exon in 3 kleinere Exons unterteilt, was dazu führt, dass eines der Peptide nur noch zum Teil in dem neueren Modell vertreten ist. Ein weiteres Peptid fällt komplett in ein Intron.

>C\_1560001 [chlre2:156421]

```

1      MEVVVGIDQTVTIVWHARLQKSVDR LGRAIEAAEEEMDAALKRTTEIHRSQLKQKELE
61     NLELQRVIGAKERSIDSLRDTLATTKRTYESKLSQAESALALKDAEIKALSEELRVSRL
121    RDSMGLQMERVEASRRALEVDAREAEALGADVRSKSDEAAKALMALRYEKKEKEDWRLQ
181    SEDLRRQLQVMQDELRAQKEETALTKDRYEELLETRRRRAALEVEEARRRVEGEAEDFRR
241    RCEAELEDMRRRLRSEKNLRKACEKWL RSELKSREEMELLLAAVKDAATGRSVAADTAQV
301    EALIDRLRIGGGGGGSPSPTRQTRSPSLSPRGDGHVTVSVSALAPPPPPAASSGAGARA
361    LELDLLRRKLEEDNNRLKGELLAAKRMLTDRLKV*

```

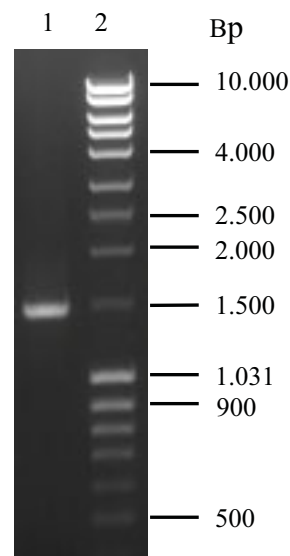
#### Abb. 11: Genmodell von Kandidat 156

Die Aminosäuresequenz des Genmodells wurde der Version 2.0 der *Chlamydomonas*-Datenbank entnommen. Peptide, die durch den 1D-Gel-Ansatz identifiziert wurden, sind in rot dargestellt. Peptide, die mit Hilfe des MudPIT-Verfahrens gefunden wurden, sind blau unterstrichen. Die fett gedruckten Aminosäuren befinden sich in Version 3.0 der Datenbank in Introns.

### 4.3 Nähere Charakterisierung von 5 potentiellen Basalapparat-Proteinen

#### 4.3.1 Kandidat 20: Schließen von genomischen Sequenzlücken

Zum Schließen der beiden genomischen Sequenzlücken wurde DNA aus *C. reinhardtii* isoliert und in einer PCR eingesetzt. Trotz mehrerer Versuche und eines „nested PCR“-Ansatzes, konnte kein korrektes PCR-Produkt für die zweite genomische Sequenzlücke erhalten werden. Für die erste, kleinere Lücke konnte ein Produkt kloniert und sequenziert werden. Das Ergebnis der PCR ist in Abb. 12 dargestellt. Die erwartete Größe von ca. 1400 bp stimmt gut mit der gefundenen Größe der Bande überein.



**Abb. 12: PCR zum Schließen der 1. genomischen Sequenzlücke von Kandidat 20**

1 %iges Agarose-Gel. In Spur 1 wurden 5 µl der PCR mit den Primern Gap1\_for und Gap1\_rev geladen. Spur 2 zeigt den Marker.

Für die Sequenzierung wurde das Produkt in den pGem-T Easy-Vektor kloniert. Zunächst wurden Sequenzierungsreaktionen mit den Primern Sp6 und T7 durchgeführt. Um die komplette Sequenz des gut 1400 bp großen Insert erhalten zu können, wurden 2 interne Primer (G1\_innen\_for und G1\_innen\_rev) konstruiert. Es wurden 3 unabhängige Klone komplett sequenziert. Ein Vergleich der so erhaltenen (Konsensus-)Sequenz mit den Datenbank-Einträgen ist in Abb. 13 dargestellt. Im vorderen Bereich (Position 61 bis 89) zeigen sich einige Unterschiede zu den von JGI ermittelten Sequenzen. Es ist unklar, ob und wieviele unabhängige Klone JGI verwendet hat, um die Sequenzen zu erstellen.



Konsensus	721	GCAGGTGGCGTCCATGCAGTCCATTGTGCAGTACAGCAAGCAGGAGCTCAGCCTGCGCGC
Version 3.0		GCAGGTGGCGTCCATGCAGTCCATTGTGCAGTACAGCAAGCAGGAGCTCAGCCTGCGCGC
Konsensus	781	GCGGGACGCCGCGGAGCTGACGCAGGTGAAGCAGGAGCTGATGACCAAGGAGCAGAAGGT
Version 3.0		GCGGGACGCCGCGGAGCTGACGCAGGTGAAGCAGGAGCTGATGACCAAGGAGCAGAAGGT
Konsensus	841	CCGAGAGATGAAGCAGCTGGTGAGTGGGGGCGGGCAACAATGGGGGGACGGGGCGGGCAG
Version 3.0		CCGAGAGATGAAGCAGCTGGTGAGTGGGGGCGGGCAACAATGGGGGGACGGGGCGGGCAG
Konsensus	901	GCGGGAGTTCGGGGGTGCGGCTGGGTGGCCATGGCCACTGGGCCACCGTACGAGAACGC
Version 3.0		GCGGGAGTTCGGGGGTGCGGCTGGGTGGCCATGGCCACTGGGCCACCGTACGAGAACGC
Konsensus	961	ATGAGGAGACCCGGGCAACTTGCGCAGCCATCCTGCGTCCGTGCAAGTACTCTAGTCGGC
Version 3.0		ATGAGGAGACCCGGGCAACTTGCGCAGCCATCCTGCGTCCGTGCAAGTACTCTAGTCGGC
Konsensus	1021	CGCCCTTTGCCTTCATTTCTCTCTGACCTGTTCCCCAACGCACCTACCTGCTCCCC
Version 3.0		CGCCCTTTGCCTTCATTTCTCTCTGACCTGTTCCCCAACGCACCTACCTGCTCCCC
Konsensus	1081	ATCCCTGGTGCTCTACTCCTTACTCTGTTTCTGTGACTCGCCCCGGGATCTTCTCTC
Version 3.0		ATCCCTGGTGCTCTACTCCTTACTCTGTTTCTGTGACTCGCCCCGGGATCTTCTCTC
Konsensus	1141	TTTCTTCTCCTCTTCGCCCCCGCAGCTTGCGGAGCTGCAGATGCAGCAGCAGTCCAGC
Version 3.0		TTTCTTCTCCTCTTCGCCCCCGCAGCTTGCGGAGCTGCAGATGCAGCAGCAGTCCAGC
Konsensus	1201	CGGTGAGATGGAGTCCATGCGCGAGGAGCTGGACAGCGCCCGGTCCATTGCCGGCGAG
Version 3.0		CGGTGAGATGGAGTCCATGCGCGAGGAGCTGGACAGCGCCCGGTCCATTGCCGGCGAG
Konsensus	1261	CTGGAGAAGCGCAACGCCTCGCTCATGCGCATGACGCAGCAGAGCCTGGGCCGCGAGGGC
Version 3.0		CTGGAGAAGCGCAACGCCTCGCTCATGCGCATGACGCAGCAGAGCCTGGGCCGCGAGGGC
Konsensus	1321	GACCTCAAGCAGGCGGTCAACAGCACCAAGGTGCGGCAGAGAGACGGGAAGCGGTGGCGT
Version 2.0		NNGGTGGCGT
Version 3.0		GACCTCAAGCAGGCGGTCAACAGCACCAAGGTGCGGCAGAGAGACGGGAAGCGGTGGCGT
Konsensus	1381	GGAGGCGGGTTGGGGGCGGGGTCGAAGATGGTAGCTACTTGTACTGGCGCTGCTGGGGAA
Version 2.0		GGAGCGGGTTGGGGGCGGGGTCGAAGATGGTAGCTACTTGTACTGGCGCTGCTGGGGAA
Version 3.0		GGAGGCGGGTTGGGGGCGGGGTCGAAGATGGTAGCTACTTGTACTGGCGCTGCTGGGGAA
Konsensus	1441	TGGCACGGTGGATTGGAATGAGGG
Version 2.0		TGGCACGGTGGATTGGAATGAGGG
Version 3.0		TGGCACGGTGGATTGGAATGAGGG

**Abb. 13: Vergleich der Sequenz der ersten genomischen Lücke von Kandidat 20 mit den Datenbank-Einträgen aus Versionen 2.0 und 3.0**

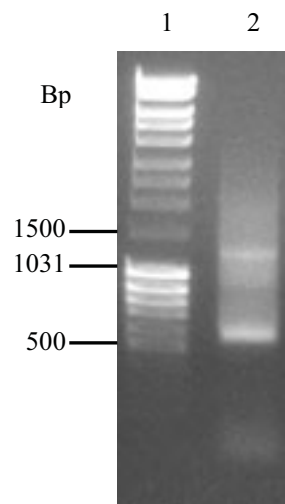
Die mit Konsensus bezeichnete Sequenz wurde bei der Sequenzierung von 3 unabhängigen Klonen ermittelt. Die beiden anderen Sequenzen wurden den Versionen 2.0 bzw. 3.0 der JGI-Datenbank entnommen. Die unterstrichenen Nukleotide entsprechen den verwendeten Primern. Die roten Nukleotide waren vor Beginn der Sequenzierung aus Version 2.0 der Datenbank bekannt. Fett gedruckte Nukleotide kennzeichnen die Unterschiede zu der später von JGI ermittelten Sequenz aus Version 3.0 bzw. Unterschiede zur bereits bekannten Sequenz aus Version 2.0.

### 4.3.2 Klonierung von partiellen cDNAs für 4 Kandidaten

Um Antikörper gegen 4 potentielle Basalkörperproteine herzustellen, sollten diese in *E. coli* überexprimiert werden. Dazu wurde zunächst Gesamt-RNA von *C. reinhardtii* isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für die Erststrangsynthese wurde entweder ein oligo-dT- (Kandidaten 31 und 90) oder ein sequenzspezifischer Primer (Kandidaten 27 und 156) verwendet. Mit dem so hergestellten Erststrang wurden in einem nachfolgenden Schritt PCRs durchgeführt, um die cDNAs zu erhalten. Der Versuch, komplette, „full-length“ cDNAs zu erhalten, war für keinen der 4 Kandidaten erfolgreich. Daher wurden schließlich Primer verwendet, die cDNAs von ca. 400-670 bp lieferten. In den PCRs wurde DMSO verwendet, welches besonders bei GC-reichen Sequenzen zur Trennung der beiden Stränge hilfreich ist. Als Positivkontrolle dienten Primer für Centrin, die ein Produkt von ca. 500 bp lieferten.

#### Kandidat 27

Bei der reversen Transkription wurde für die Erststrangsynthese der Primer C\_270036\_rev verwendet. Dieser bindet ca. 150 bp hinter dem postulierten Stop-Codon in der 3'-UTR („untranslated region“). Die folgende PCR wurde mit den Primern 27\_E4\_for und 27\_E7\_rev durchgeführt, die in Exons 4 bzw. 7 binden. Da die Bande nach der ersten PCR zu schwach für eine Klonierung war, wurde hier zur Reamplifizierung eine zweite PCR mit den gleichen Bedingungen durchgeführt. Dabei diente 1 µl der ursprünglichen PCR als „template“. Das Ergebnis dieser Reamplifizierung ist in Abb. 14 dargestellt. Neben der für die partielle cDNA erwarteten Größe von ca. 520 bp taucht eine weitere, größere Bande bei ca. 1200 bp auf dem Gel auf. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Verunreinigung mit genomischer DNA, d.h. um ein Produkt, das sowohl die Exons als auch Introns umfaßt. Unter Verwendung der oben genannten Primer auf genomischer DNA sollte sich bei einer PCR ein Produkt von 1226 bp ergeben, was sehr gut mit der beobachteten Bande übereinstimmt. Aufgrund der genomischen Bande konnte die PCR nicht direkt aus dem Reaktionsgefäß aufgereinigt werden. Daher wurde die Bande zwischen 500 und 600 bp aus dem Gel ausgeschnitten und nach der Aufreinigung in den Vektor pGem-T Easy kloniert und sequenziert.



**Abb. 14: PCR zur Gewinnung einer partiellen cDNA für Kandidat 27**

1 %iges Agarosegel. Spur 1 zeigt den Marker. In Spur 2 wurde die 2. PCR (Reamplifizierung) geladen. Die Bande zwischen 500 und 600 bp wurde aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und in den Vektor pGem-T Easy kloniert.

Bei der Sequenzierung von 3 unabhängigen Klonen und dem Vergleich der so erhaltenen Sequenz mit der Datenbank zeigte sich, dass Exon 6 offenbar um 42 bp länger ist, als in Version 2.0 der JGI-Datenbank vorgegeben (s. Abb. 15). Dieses verlängerte Exon wird durch bereits vorhandene EST-Daten an dieser Stelle unterstützt. Offensichtlich wurden die EST-Daten jedoch bei der Aufstellung des Genmodells durch JGI nicht berücksichtigt. Auch in der neueren Version 3.0 der Datenbank sind die zusätzlichen Basenpaare noch nicht Bestandteil des Exons 6.



```

1      ATGACATCTTCGGGGTTAAATCTAACCCAGCTTAAAGCCAGACTGAACCGGCTCGGGCTAGATGTGCGAG
71     GCGGTGGCGCCACC GAAGGCGCTCCATTGAGCCCTCCACCTGCTGCAATTCCTCGCTCAGCGGCACGAAG
141    CCCAGCTCCCCAGGTACATACTCTAAGCTTGCCTCATGGCAAGCAAGGATCACTAACAAAGATTGGGGGGC
211    AGTGTGCTAACCCCTACTCCGTTGGGTTTCGTGGCGCAGGATGGTGGCGGACCAATCGCGCACGAGAGGTGG
281    GGGTCTTGCGGGGTTGCTGCAACTACTGTTGCGCCAGTCCATGTGGCGGGAGAGCTGATGGAGGTAGCC
351    GTTCATGTTTGCCTGGTGCACCTCCTGGCTGCAGGGGACGCAAGGGTATGGCGGACCTGTTCCGAGCGGATA
421    AACCGGGTGGAGCGGGCGATGAACAGCGCAGAGGCCAAGGCAGCGCCATCCAGCAGGCATTGAATGAGG
491    ACTTTGGGAAACTGGCCGTTGCGGCCGCGGAGGCCGATGCAGCACGCAGCCAAAGCCTGACCCGTTGCGC
561    CAAGGGGCTTGGGGTTCAGGTGCATTAGGGCTAGCCCCAGGAGGGCACGCTCAGGTGGCGTGAAGCGT
631    CCATGACAGTTGCCGTGTGCTGCTAACAGGATAAAGAAGCCCAAGTTCGGCCGCCAAGGGTGCACGGCCGT
701    CAGGGCTGCTGCCCGGGCCGAAGGGCCTGAGCGCCGAGTTCGTAGCGTAGACCACATGCGCAGCATCCC
771    CGCCACACGCGCGCTGTCCAGCGTGTGGCGCAATTC AAGGAGGCGGAGACGGCATGGGCGCAGGAGAAG
841    GTACGGTAGTACAGTGACACGCACCTCTCCCGCCCGCTATTCCCTGCCTCTCTAGCCAGCTTCCCCACT
911    ACGTTTTACACCGCTTCAATGCCCACTTCCCTCTCGCGCCCTCATCGCGAGTAGGCGGGCTGCGGC
981    GTGAGGCGATCGAGGAGCGCAAGCGCGCTAACCAAGCTGGAGCTCGACTACAAGCGGCTGCAGCGTGTGAA
1051   CGAGCACCATGCTGGACGCTCAAGGCGCTCAAGACGCGCTCAAGAGCCGCGACAGCCAGCTGGAGAAC
1121   GCCTCGGAGCGGATACGCGAGCTGGACGTGGCGCTGCAGCGTGGGAACTAGGCAGTGGGTTGGAGCGCT
1191   GGAGTGGGGTGGGCTTGGGGAGTGGGAGGCAATGCGTGTGTCTGTGGCGTGTGTGGAGTGCCTACCFTA
1261   AGCGGCTAGGCGCTGTGGCTGAGCAGATACGGTAGCTCACTTGCCGATCGTTGCCACAGGACGCCA
1331   GGAGGAGTCGGCACTTGCCATCGCCAGCCTGAACGCGGAGCGGGACGACCTGAAGGGGCTGCTGCTGGCG
1401   GCGCTGCAGCGTCTGGAGGCGGTGGACGAGCTGTTGCAGCGGGCGGACATCAGCTCGGCCATGATGGAGG
1471   ACAAGGCACGTGGGGGAGGGGGAGAGCGTGGGGAGCGAGTGGGAGGCGCGGCGCGCTGGTTGGGCGGC
1541   AGGGTGGGCGCAGGACTGCGCTGTGACGGCAGCATCGTAAAGCCAACCTTGACCACCTGCAGCTTGAGGACGT
1611   CTATCCGGGAGATGAATGCGGATGTTACAGAGGGGACAGTCCACGACCCGAAGACGCGGAGCCATCACA
1681   TGCTATCAGGGCCCAACTTGACTCCACCAACCCGACTTTGCTGCAAACCTCCCGCGGGCAAAGTCCGT
1751   GTGACTCCGCGCACAGTGAGTCTTAGCCAAGCCTCAACCCGGGAGATGGGGCAAAATTCGGGACTCGGCC
1821   CGTGTGCATGGTCAATGTGTGCAGATGCGGCTGCTGGAGGAAGAGCGCAGCAAGGCGCTGGACGCCGCC
1891   GCGCGGGCGCGCACCCGAGGTGGCGGAGCTGGCGGAGACCGCCGCAAGCTGCAGTGGCAGTCCAAGCTTC
1961   TGGAGAAGATGTCGAGGTGCGTGACTGCGCGCGCTCATGCACCGTGTGTCTTTGCCACAGCTCGCAA
2031   CGCGCAAGCCCATGACCATAGCACCGCAATCGAGGGCCCGCCTCCACCTCCAGGCTGACCCCGCCGC
2101   CACGCGCCGCGCTCCGCGCTGCTGCTTGCCTGCGAGGTCCAGCTGAAGCACAACAAGCGCAAGAGCGAGG
2171   CCATCCGCGGCTGCTGAGTGTGGACCAGGAGGGCGCGCCCTCCGCGCCGAGCTGGCCGCGCGGA
2241   CTCGGAGCTGCTGGACGACGACCTGTGA

```

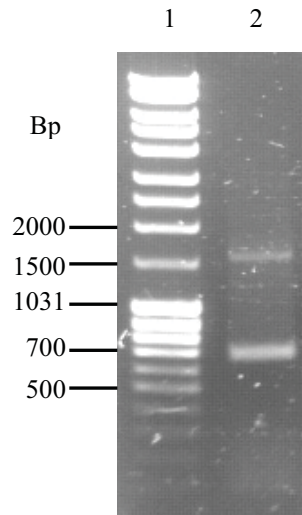
**Abb. 15: Exon-Intron-Struktur von Kandidat 27**

Die Nukleotidsequenz und die Exon-Intron-Struktur wurden der Version 2.0 der Chlamydomonas-Datenbank entnommen. Rote Nukleotide kennzeichnen Exons, schwarze die Introns. Die Sequenzen der Primer, die für die Gewinnung der partiellen cDNA verwendet wurden, sind unterstrichen. In blau gedruckte Nukleotide wurden bei der Sequenzierung der partiellen cDNA zusätzlich gefunden.

### Kandidat 31

Für diesen Kandidaten wurde bei der Erststrang-cDNA-Synthese der oligo-dT-Primer eingesetzt. Die nachfolgende PCR erfolgte mit den Primern 31\_E1\_for und 31\_E6\_rev, die die Exons 1 bis 6 des Genmodells umfassen und ein Produkt von 673 bp liefern sollten. Eine Reamplifizierung durch eine zweite PCR war für diesen Kandidaten nicht notwendig. Neben dem erwarteten Produkt ist auf dem Agarosegel in Abb. 16 eine weitere Bande zwischen 1500 und 2000 bp sichtbar. Wie schon bei Kandidat 27 handelt es sich hierbei vermutlich um eine Verunreinigung mit genomischer DNA, für die eine Größe von ca. 1700 bp erwartet wurde. Die Bande bei 700 bp wurde aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt, in Vektor pGem-T Easy kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung von mehreren unabhängigen Klonen und der Vergleich der so erhaltenen Sequenz zeigt keinerlei Unterschiede zu dem von JGI aufgestellten Genmodell in Version 2.0. Zumindest

im Bereich zwischen den Exons 1 und 6 scheint dieses Modell also richtig aufgestellt worden zu sein. In Version 3.0 der Datenbank ist Exon 6 allerdings nur noch 25 bp groß und liegt an anderer Stelle: ca. 80 bp hinter dem Ende von Exon 6 aus Version 2.0. Diese Umstrukturierung von Exon 6 des Genmodells widerspricht der in dieser Arbeit ermittelten cDNA-Sequenz.

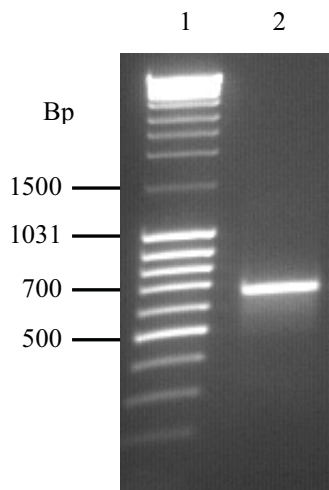


**Abb. 16: PCR zur Gewinnung einer partiellen cDNA für Kandidat 31**

1 %iges Agarosegel. In Spur 1 wurde der Marker geladen. Spur 2 zeigt das Ergebnis der PCR mit den Primern 31\_E1\_for und 31\_E6\_rev. Die Bande bei 700 bp wurde aus dem Gel ausgeschnitten und nach der Reinigung in den Vektor pGem-T Easy kloniert.

### **Kandidat 90**

Um eine partielle cDNA für Kandidat 90 zu erhalten, wurde in der Erststrangsynthese der oligo-dT-Primer verwendet. Die nachfolgende PCR erfolgte mit den Primern 90\_E3/4\_for und 90\_E9\_rev (zur Lage der Primer s. Abb. 18). Der „forward“ Primer liegt am Übergang zwischen Exons 3 und 4 und der „reverse“ Primer liegt in Exon 9. Wie schon für Kandidat 27 wurde auch hier nach der 1. PCR eine 2. PCR mit den gleichen Bedingungen wie die erste angesetzt. Das Ergebnis nach der Reamplifizierung ist in Abb. 17 dargestellt.



**Abb. 17: PCR zur Gewinnung einer partiellen cDNA für Kandidat 90**

1 %iges Agarosegel. Spur 1 zeigt den Marker. In Spur 2 wurde die 2. PCR (Reamplifizierung) geladen. Die Bande bei ca. 700 bp wurde aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und in den Vektor pGem-T Easy kloniert.

Als Größe für die partielle cDNA waren ca. 480 bp erwartet worden. Die PCR lieferte allerdings ein Produkt zwischen 600 und 700 bp. Dieses wurde aus dem Gel ausgeschnitten und nach der Aufreinigung in den Vektor pGem-T Easy kloniert und sequenziert. Die Analyse der Sequenzen von 4 unabhängigen Klonen zeigt, dass es sich bei dem klonierten PCR-Produkt trotz des beobachteten Größenunterschieds um die partielle cDNA des Kandidaten 90 handelt. Allerdings wurden 2 neue Exons gefunden, die in Abb. 18 in das Genmodell der Datenbank integriert sind. Diese beiden neuen Exons umfassen 57 bzw. 108 bp. Addiert man die neu gefundenen Basenpaare zu den erwarteten 480 bp so erhält man mit 645 bp das Produkt, das im Agarosegel beobachtet wurde. Die Größe der Bande aus dem 1D-Gel, in der die Peptide gemessen wurden, war mit ca. 74 kDa wesentlich größer als das Genmodell mit 44 kDa (s. Tabelle 1 bzw. 4.2.5). Die beiden neuen Exons mit ihren insgesamt 165 bp erhöhen die Größe des Genmodells auf ca. 50 kDa. Die noch fehlenden gut 20 kDa könnten sich in weiteren, bisher noch nicht entdeckten Exons verbergen. Betrachtet man die in Abb. 18 dargestellte Exon-Intron-Struktur, so fällt auf, dass das letzte Exon mit nur 12 Nukleotiden sehr kurz ist, und dass sich direkt hinter dem postulierten Stop-Codon eine Sequenzlücke befindet. In Version 3.0 der Datenbank ist dieses Sequenzlücke geschlossen. Allerdings wurde das letzte Exon aus dem Genmodell entfernt, so dass das neue Modell kein Stop-Codon mehr besitzt. Es liegt also nahe, dass sich im hinteren Teil noch weitere, bisher nicht identifizierte Exons befinden.

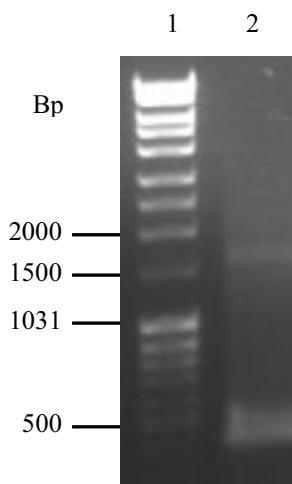
1 ATGCCGCACCAGCGCCTGGACCAGCAATATCGGCGCGCCGAGGAGAAGATAGGTGACTTCCGGGAAAAGCTGAAG  
 76 GAGGCGCGCGGCGAGCTGTCAACTAAGGACCCGGCAGCTGGAGGGCGACGCGCCGACTGCTTGCCAAGCTGGGCCAG  
 151 GAGAAGTCCGAGCTGGCGGTGGGTGGAGAACCCATGGGGTGGGGCCGGAGGGGTTGCTTTGACCATTACCAATA  
 226 GAAAACAAGAGGCACGAAGATGCAGGCGCAGGCTTAAAGGCCCGAGTCCGACGAATAGTCCGTCCACAGGTTCTG  
 301 CGTAGGGGAGGGGGCAAGGAGTGTGGCACGGAGGGATGTTGTCTCAAAGAAGCCGAGACCCAGGTCTTGCCAT  
 376 GCTCGGCGTGGCATAACAGCCTGCGTTGGCATGAATGTGCAGTCTGTGGGATCCTGGCCTCTGCAGCGGGTGGCG  
 451 GAGGAGAGCCGCGACCTGAGCCGCAAGCTGGGCGCCAAGCTGTCTGCTCAGCGGGCGGCGAAGTGCCGGAGCTCACA  
 526 GCCAAGCTGCAGCGCAGCAAGCGCAAGGTGTGTACGAATGCTGGGTAGGAACGAACAAGAAGAAAGGGTACGCA  
 601 CTGTGCATCGGAATGCGCAAGCAGGCAACAGTACGTGTGTGCTCGTATGTGTCCGTGTTGTAAGACGGGACATG  
 676 CAGCTTGAACGGTGGGGGATGCGCCCGGGCGTGTGTGCTCCTGGAGAGGGCGTGTCAAGCAGCGAGGCAGCACC  
 751 ACTCCTAGCATGGCCGGGCGGGGCACCCCGCAGGCAACAGATGGACACGCACCCGCGCTCCCAACCATATTGC  
 826 CGGTCCCGCTTCCGCAACCCACAACCCACGTGCACGGCAGTGCACAGTGGCAATGCCGCGAGTGCAGCGGAGCTGA  
 901 CGGCGCAGCTGCACGAGGGCCAGACCGGCTGTCTGGCGGAAAGAGGCCACGCGGCAGCAGTCCGGCCGAGGTGG  
 976 TAGTGTCTAAAAAGGTGGGGCAACAAGGGGAAAGACTGGGAAAAGGGGGTTGGGGCTTGGCAGCCTACGTACCGT  
 1051 GGTAAGCGGATGACTACGGGGGCTCGCGACCATCAACGAAACCACACACGCCCCGACGTCCCCCTCGCGCAC  
 1126 TTCGGTAATCGTATCGCTCAAGCCGCCAACCCGCTGTCGCGCCTGCCTGTCAGGCTCTGGGCTGCGCTCGGA  
 1201 GCTGCTGACTTCAGCGGCTATGGCTATGACGGCCAGGGCGAGCTGCTGCAGTCACTGGCCAAGGTGGGGATCAA  
 1276 GTCAGGGGGAAGTCAAAGCCTTCCCATATGGGCGGCACCGTTTATGCTTCTCCAAACGGGCGGCACCGGTGCT  
 1351 GTCTGTGCGGGCGTGAATCTACTTTGGTAGGGTGGGCCGAATACCAGTGTCTGTTCTGACTGCCATGCGCCAC  
 1426 CGCCGACACCACCCCTCCACCTCCACCCCTACCATCACTACCACCGCAGAGCCAGGAGGAGAGTGCAGCGCTG  
 1501 GTGGGGCAGTTGGCGGACAGCGGGCGGGCGGTGAACGCGCTGGAGCAGCAGGTGCGCGCGTTCTTGGGGCCGAGA  
 1576 GGTAAAGTGAAGGGCAAGGGCTAAGGAGAGCGGGCAGAGTTGAAGGGGATGGAATCCAATGCCGACAGATGAG  
 1651 GGAGATGGAGGTCAACCCAAACCCACCTTCCCCTCACTCGACCCATCTCCACACAACCCCTCACCCCTCCG  
 1726 CCTCCGCCCCACACGCAGGTGGTTCACCTTACCTGACGAGTGGAGCGGCTGGTGGCGCCGCTGTGGCGGGGA  
 1801 GGAGGGCGTGTGGGGCCAGGCGCGAGGCGGGGACGCACACGGCAGGGCGGGCCACACAGGTGTGCGCGGG  
 1876 TGCAGGGTGCCTGCGTATCGCCAGGCATGCAACCGCGGCCATGGTTGCGGCTGCGCGCCTCCAGTGTGCCCG  
 1951 CTGCGGACGTGACCAGTAGACCCTACGCCGTACCTATGCATTTTCCACACCCGCAACCCGCGCAATCAATTT  
 2026 GCCACCCAGATCCCTAACCGCACACAGATTGATTAGATGAGCTGCAGAGTGCAGTCCGCCGACCAATGGCCAC  
 2101 CTGGAGAGTGGGCTTGGCCGGACCGGGTGGGCTGGGTGGGGCCGCGTGTGGCCGTGACAAACGGGATGGG  
 2176 CGGGCTGGGCATGGGCTGGGCATGGGCTGGGCATGGGCTGGGCGACGGCCTGCAGCGGGCTTAAAAATGGGCAAC  
 2251 AGGAAAGTGGCGCAAGCGCACACGATTCCACCGGTGCTCAGCGGTACATGTTAAATGCGTGGCTGCATCA  
 2326 TGCTCCAGTCCAGGTGTTTGGCGTGTCCCGAGGGTTGACACACCAACGCAACATCAACACCTCGATACTCC  
 2401 TGGTGGACCGGCTGTGTGCTGGCCTGTGTGATAAAGAAACATGTGTGTGCGTTAGGTGCTGGCGCGGGC  
 2476 GCGCAGCTGACGACCCGCTGTGACGAGCTGGCCAGTCAAGGACAGGCGCCCTCAAGGACAAACGGCGCAGCGGACC  
 2551 GGAGCAACAAGGCACAGGTGTGCGTGCATGCGGGCTGGAGGGGTGGAGTTGGGGTTGGGGCTGCCGATGC  
 2626 CGTCCGAGTACATGCCTTAACGCGGCTGGGCGACGCGCCCTACAAGCATCTGCAGTGGATGCCAGCGGCTG  
 2701 TGGCGGGTGTCTCTAGCCTAAAACCTTGTGTCTGGCCATTACACACTCGCAGATTGAGTCCGCTGCGCAGTGA  
 2776 TCAGATCTGTGGTGGAGGCGCTGAGGCGGGCGGGAGCAGGTGTGCGGGTGGCGGTGCATGAGGAAATAGCGGC  
 2851 GGAGAAGGGCGCGCGCCTGTGACGTACGACTTCTGTCATGCTGCGCTCTCTGTCTGCTGACACGCCCTT  
 2926 ACCGCGCACACCTGCCGCTTGTCCCCTCCCTTGGCGTACACAGGGCCGAGCGGTGCACGCGGCTCGTAGGGC  
 3001 AGCTCTGGAGGCGCAGGTGGCTGGGCTGCAGAAGCAGGTGCTGGAGCAAGAGGTGAGCAGTGGGTGCAGCGGTCA  
 3076 CGTCCGCGCCTCGTGTGCGGGGTAGGAGCCAGGAACCTGGGTGGACCGGGCTTTGGCCACGTGAGCCGTACTTGGC  
 3151 AGGATAGTTTCAACAGCCAGCTTCAACACATGGCAGTGTGTACACCAGCACAGGTTGCCGCCAGGTCCAAATG  
 3226 CTACTACATACAGTCCCTTCTTGTGATGTGTGCACCTGCGCACCCCTACCTGACACACCCACCTCCCTCCCAA  
 3301 CCCCCACGCGCCTCAGGCCCGGCGCGCAGTCCGCCCCGACACAGGAGGTTGACTTGCTTCACTACAGAGCC  
 3376 GGGCAGGGGGCTTGGAGCCAGCTGGAGGGAAGCAAGCTGCGGGAGGGTCCGCTGTGAGTTTGTGGCGTGGCGG  
 3451 TGGAGGGGCTTAGACGGGGTGGGCGTAACGGGGTGGGTGGTTAGAGAGAGTGTGTGTGGATGTGTGCGTGTGTG  
 3526 GTTTCACACACAATCCCCGGCGCCGATGTTGATGCGTTATTTTGTCTCCGGCAGCCGCTGTCGGCCTGGT  
 3601 GCGACCCACGCCCCAGCAATCTCGCGCTACCTGAAATATCCCTACTCACTACCGCCCTTCCCTCCCTGCAAC  
 3676 ACCCCACAGCGAGCGTGACGCTGCTGCCCTGCGTGAGGAGGTGGAGCGGCTGGCCCGGAACAATCAGGACCTGTC  
 3751 GGTGAGTGCAGGAGCCTGCGTGGGGTGGTGCAGGGGGCTGCCTCCAGCGCACCTTCCCTTGCCTGAGACCGGCC  
 3826 GCGCCGCGCGAGTAGCGGGCCTGTTTCTGGGGCTCCGGTATGCCATGCATGCGGTGGCGCAGTCTGGACGTG  
 3901 TTTGCGCTACAGCCCTGCCTATGCAGTGTGTGTGTGCAGATGGGATTTGGCGGGCGCGGGCCGAGGCGGGC  
 3976 GCGAATGCGGAGCGCGCAGAGGATGCGGGCAGCCAGCCGACAGCGAGCGGCGCCTGCGCATGCAGGTGCGTGTG  
 4051 TTTAAAGGGACACATAACGGCTGCGTGTGCGCTCGGTGACTGGCAGCAGGCTGCACTCAAAGCAATTTAATACC  
 4126 GCTTCACATAACCGTATACACACTCGCACAAATGACCTGGTGTGCAGGCTGCAGTGCAGTGGAGGCTGCCACCAA  
 4201 CCGGGGCGGGTGCCTGAAGAGCAGTGGGTCTGGATGCGGGCGGGCTGCGGGCGGAGGGAGCCACCATGGCCCT  
 4276 GGCCAATGAGAGACTCACAGCAGAGATCAAGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGT  
 4351 GGTGGGTGGGTGGGAGTGTGATGGGACAGGGTTCAAGCAGGTTGGCGAGGTTCCATAGGGTGCAGCTGACGCCCA  
 4426 TACCCCAAGCAGACAGCAAACAGTTTGAAGNN  
 4501 NNN

Abb. 18: Exon-Intron-Struktur von Kandidat 90

Die Sequenz und die Exon-Intron-Struktur wurden der Version 2.0 der *Chlamydomonas*-Datenbank entnommen. Rote Nukleotide kennzeichnen Exons, schwarze die Introns. Die Sequenzen der Primer, die für die Gewinnung der partiellen cDNA verwendet wurden, sind fett gedruckt. Die Positionen, an denen Peptide gemessen wurden, sind unterstrichen. Die in blau fett gedruckten Nukleotide stellen 2 neue Exons dar, die bei der Sequenzierung der partiellen cDNA gefunden wurden.

**Kandidat 156**

Für die Erststrangsynthese wurde der spezifische Primer C\_1560001\_rev verwendet. Dieser bindet ca. 120 bp hinter dem postulierten Stop-Codon. Die folgende PCR wurde mit den Primern 156\_E1\_for und 156\_E5\_rev durchgeführt. Diese Primer umfassen die Exons 1 bis 5, und die erwartete Größe des PCR-Produkts beträgt ca. 400 bp. Da die Bande nach der ersten PCR zu schwach für eine Klonierung war, wurde auch hier zur Reamplifizierung eine zweite PCR mit den gleichen Bedingungen durchgeführt. Als „template“ wurde hierbei 1 µl aus der ersten PCR verwendet. Das Ergebnis der Reamplifizierung ist in Abb. 19 dargestellt. Neben der erwarteten Bande von 400 bp, die ausgeschnitten und aufgereinigt wurde, findet sich auch noch eine zweite Bande zwischen 1500 und 2000 bp. Bei dieser Bande handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine genomische Verunreinigung. Verwendet man die oben genannten Primer auf genomischer DNA, so sollte sich zwischen Exons 1 und 5 inklusive der Introns eine Größe von ca. 1600 bp ergeben, was gut mit der hier beobachteten Größe übereinstimmt. Die Analyse von 3 unabhängigen Klonen für das 400 bp-Produkt zeigt keinerlei Unterschiede zu dem von JGI aufgestellten Genmodell.



**Abb. 19: PCR zur Gewinnung einer partiellen cDNA für Kandidat 156**

1 %iges Agarosegel. In Spur 1 wurde der Marker geladen. Spur 2 zeigt das Ergebnis der Reamplifizierung. Die Bande bei ca. 400 bp wurde aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und in den Vektor pGem-T Easy kloniert.

### 4.3.3 Umklonierung der partiellen cDNAs in den Expressionsvektor pETBlue-2

Zur Expression der unter 4.3.2 gewonnenen partiellen cDNAs mußten diese aus dem Vektor pGem-T Easy in einen Expressionsvektor umkloniert werden. Es wurde der Vektor pETBlue-2 gewählt, der die spätere Aufreinigung des rekombinanten Proteins über ein „HSV“- oder „His-Tag“ erlaubt. Um die partiellen cDNAs in der richtigen Orientierung in den Vektor klonieren zu können, wurden mit Hilfe von PCRs unterschiedliche Restriktionsschnittstellen vor bzw. hinter der partiellen cDNA eingefügt: Eine EcoRV-Schnittstelle am 5'- und eine NotI-Schnittstelle am 3'-Ende. Nach Verdau der PCR-Produkte mit EcoRV und NotI wurden diese in den Vektor pETBlue-2 ligiert. Im Anschluß daran erfolgte zunächst eine Transformation in den *E. coli* Stamm NovaBlue, um vor der Expression durch eine Sequenzierung sicherzustellen, dass die Umklonierung erfolgreich verlaufen war. Dabei wurde vor allem darauf geachtet, dass sich die jeweilige partielle cDNA im korrekten Leseraster befand. Die Kandidaten 27, 90 und 156 konnten problemlos in den Expressionsvektor umkloniert werden. Bei Kandidat 31 war es trotz wiederholter Versuche nicht möglich, einen Klon zu erhalten, der die vollständige partielle cDNA enthielt. Für die Expression wurde daher ein am 3'-Ende um 24 Nukleotide verkürzter Klon verwendet. Dieser Klon zeigte das richtige Leseraster, exprimierte aber aufgrund der fehlenden Nukleotide 8 Aminosäuren weniger als von der ursprünglich erhaltenen partiellen cDNA kodiert waren.

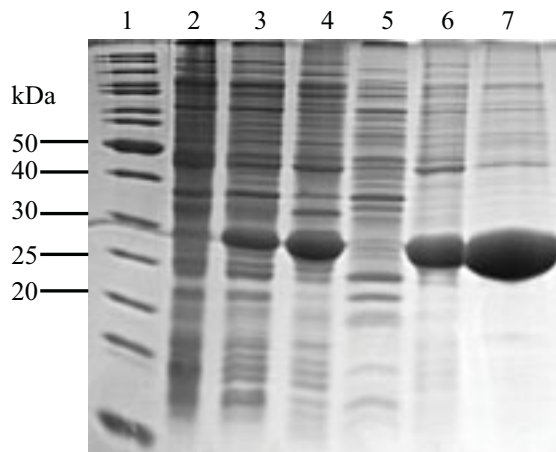
### 4.3.4 Expression der partiellen cDNAs und Reinigung der rekombinanten Proteine

Zur Expression der partiellen cDNAs wurden die aus 4.3.3 erhaltenen Plasmide in den *E. coli* Expressionsstamm Tuner™(DE3)pLacI transformiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (250 µM Enkonzentration) induziert. Nach 3-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien pelletiert. Zunächst wurde für jeden der 4 Kandidaten überprüft, ob sich das rekombinante Protein in der löslichen oder unlöslichen Phase der Bakterien befand. Dazu wurde ein Bakterienpellet von 1 ml induzierter Bakterienkultur in diese beiden Phasen getrennt und gelelektrophoretisch untersucht. Um ausreichend Antigen für die Immunisierung zur Verfügung zu haben, wurden anschließend 500 ml Bakterienkulturen verwendet. Nach der Auftrennung in lösliche und unlösliche Phase, wurde jeweils die Phase mit dem rekombinanten Protein über eine Säule weiter gereinigt. Die rekombinanten Proteine besitzen an ihrem C-terminalen Ende ein „Tag“ aus

6 aufeinanderfolgenden Histidinen. Dieser „His-Tag“ wurde für die weitere Reinigung über eine Nickel-Säule verwendet. Die Elution des rekombinanten Proteins von der Säule erfolgte durch Zugabe von Imidazol. Insgesamt wurden 10 Fraktionen von je 1,5 ml eluiert. Die Eluate mit dem rekombinanten Protein wurden noch weiteren Reinigungsschritten unterzogen und schließlich wurde das so gewonnene rekombinante Protein für die Immunisierung von jeweils 2 Kaninchen pro Kandidat verwendet.

### **Kandidat 27**

Abb. 20 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der Reinigung des rekombinanten Proteins. Die Bakterienproteine (lösliche und unlösliche Phase) vor Induktion mit IPTG sind in Spur 2 zu sehen. Nach Induktion ist das rekombinante Protein als stark ausgeprägte Bande bei ca. 30 kDa sichtbar (Spur 3). Die Auftrennung in lösliche (Spur 5) und unlösliche (Spur 4) Phase zeigt, dass sich das rekombinante Protein in der unlöslichen Phase befindet. Die unlösliche Phase wurde durch wiederholte Zugabe von BugBuster-Reagenz und anschließender Zentrifugationen weiter gereinigt. Die so gewonnenen „inclusion bodies“ (Spur 6) wurden in Bindepuffer mit 6 M Harnstoff aufgenommen und für ca. 1-1,5 h auf Eis inkubiert, um sie vollständig zu lösen. Zur weiteren Reinigung des rekombinanten Proteins wurden die gelösten „inclusion bodies“ auf die Nickel-Säule aufgetragen. Der Durchfluß der Säule, sowie die beiden Waschfraktionen mit Binde- und Waschpuffer waren frei von rekombinantem Protein (Daten nicht gezeigt). Bei der Elution des rekombinanten Proteins von der Nickel-Säule (Spur 7) sind im Bereich oberhalb von 30 kDa noch zusätzliche Banden sichtbar. Daher war eine weitere Reinigung über ein präparatives SDS-Gel nötig. Die rekombinante Bande wurde aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten, das Protein elektroeluiert, dialysiert und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete rekombinante Protein wurde schließlich als Antigen für die Immunisierung von 2 Kaninchen verwendet.



**Abb. 20: Reinigung des rekombinanten Proteins von Kandidat 27**

Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE (4 % Sammel- und 12,5 % Trenngel). Je Spur wurden ca. 10 µg Protein geladen.

Spur 1: Molekulargewicht-Standard, 6 µl

Spur 2: TCP („total cellular protein“) der Bakterien vor Induktion mit IPTG

Spur 3: TCP nach Induktion mit IPTG

Spur 4: unlösliche Phase der Bakterien

Spur 5: lösliche Phase der Bakterien

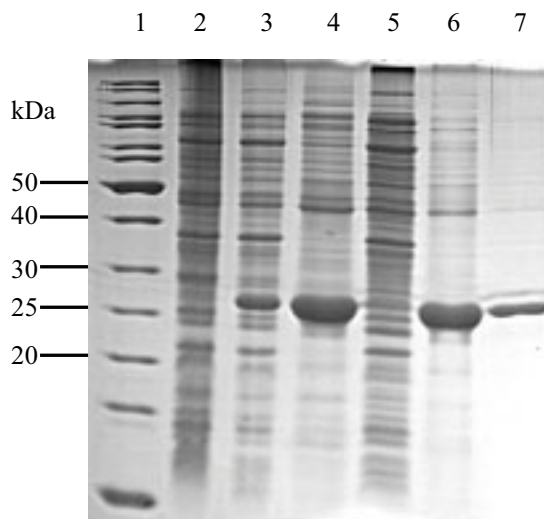
Spur 6: gereinigte „inclusion bodies“

Spur 7: Eluat der Nickel-Säule

### **Kandidat 31**

In Abb. 21 ist die Reinigung des rekombinanten Proteins dargestellt. Nach der Induktion mit IPTG produzieren die Bakterien das rekombinante Protein, das als Bande bei ca. 27 kDa sichtbar wird (Spur 3). Wie schon bei Kandidat 27 befindet sich das rekombinante Protein auch hier in der unlöslichen Phase der Bakterien (Spur 4). Durchfluß und beide Waschfraktionen der Nickel-Säule waren ebenfalls frei von rekombinantem Protein (Daten nicht gezeigt). Das Eluat wies zusätzliche Banden auf (Spur 7). Die weitere Vorgehensweise war daher identisch zu Kandidat 27.





**Abb. 21: Reinigung des rekombinanten Proteins von Kandidat 31**

Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE (4 % Sammel- und 12,5 % Trenngel). Die Spuren 2 bis 6 waren mit ca. 10 µg Protein beladen. Spur 7 enthielt ca. 5 µg Protein.

Spur 1: Molekulargewicht-Standard, 6 µl

Spur 2: TCP („total cellular protein“) der Bakterien vor Induktion mit IPTG

Spur 3: TCP nach Induktion mit IPTG

Spur 4: unlösliche Phase der Bakterien

Spur 5: lösliche Phase der Bakterien

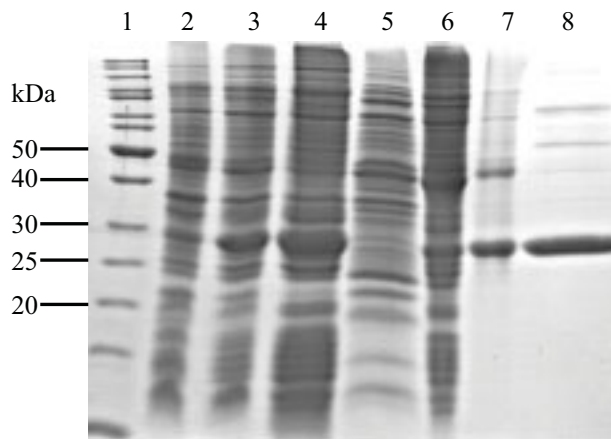
Spur 6: gereinigte „inclusion bodies“

Spur 7: Eluat der Nickel-Säule

### Kandidat 90

Nach Induktion der Bakterien mit IPTG taucht die Bande, die das rekombinante Protein enthält, bei ca. 30 kDa im TCP („total cellular protein“) der Bakterien auf (s. Abb. 22, Spur 3). Wie schon bei den beiden vorangegangenen Kandidaten befindet sich das rekombinante Protein auch hier in der unlöslichen Phase der Bakterien (Spur 4). Reinigt man die „inclusion bodies“ jedoch wie bei den anderen Kandidaten nach dem Novagen-Protokoll auf, so befindet sich der Großteil des rekombinanten Proteins nicht in den gereinigten „inclusion bodies“ (Spur 6), sondern ist stattdessen in den bei der Reinigung anfallenden Überständen zu finden (Spur 7). Daher wurden die 4 Überstände vereinigt (ca. 130 ml) und mit TCA gefällt, um das rekombinante Protein für die Reinigung über die Nickel-Säule in einem kleineren Volumen Bindepuffer aufnehmen zu können. Die anschließende Reinigung über die Säule fand unter nicht denaturierenden Bedingungen (d.h. ohne Harnstoff) statt. Weder der Durchfluß noch die beiden Waschfraktionen enthielten das rekombinante Protein (Daten nicht gezeigt). Im Eluat der Nickel-Säule befinden sich neben

dem rekombinanten Protein weitere Proteine, die aufgrund der geringeren Menge an Gesamtprotein in Spur 8 der Abb. 22 nur schwer zu sehen sind. Auch in diesem Fall wurden die Eluate daher über präparative SDS-PAGE weiter gereinigt.



**Abb. 22: Reinigung des rekombinanten Proteins von Kandidat 90**

Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE (4 % Sammel- und 12,5 % Trenngel). Die Spuren 2 bis 6 enthalten ca. 10 µg Protein. Die Spuren 7 und 8 waren mit ca. 4-5 µg Protein beladen.

Spur 1: Molekulargewicht-Standard, 6 µl

Spur 2: TCP („total cellular protein“) der Bakterien vor Induktion mit IPTG

Spur 3: TCP nach Induktion mit IPTG

Spur 4: unlösliche Phase der Bakterien

Spur 5: lösliche Phase der Bakterien

Spur 6: gereinigte „inclusion bodies“

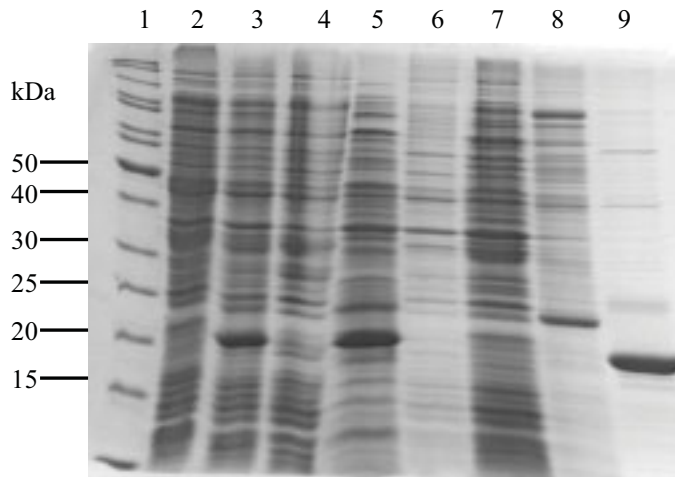
Spur 7: TCA-gefällte Überstände, die bei der Reinigung der „inclusion bodies“ anfallen

Spur 8: Eluat der Nickel-Säule

### Kandidat 156

Die nach der Induktion mit IPTG im TCP („total cellular protein“) der Bakterien auftretende Bande hat die erwartete Größe von ca. 20 kDa (s. Abb. 23, Spur 3). Im Gegensatz zu den 3 anderen Kandidaten befindet sich das rekombinante Protein von Kandidat 156 in der löslichen Phase der Bakterien (Spur 5). Das SDS-Gel in Abb. 23 zeigt den weiteren Reinigungsverlauf des rekombinanten Proteins. Der in Spur 6 aufgetragene Durchfluß der Nickel-Säule ist komplett frei von rekombinantem Protein. Durch die beiden Waschschritte mit unterschiedlichen Puffern wird ein Großteil der bakteriellen Proteine entfernt (Spuren 7 und 8). Das Eluat in Spur 9 enthält schließlich das rekombinante Protein sowie geringe Mengen an weiteren Proteinen. Da das Antigen für die Immunisierung in

möglichst reiner Form vorliegen sollte, wurden die Eluate über präparative SDS-PAGE weiter gereinigt.



**Abb. 23: Reinigung des rekombinanten Proteins von Kandidat 156**

Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE (4 % Sammel- und 12,5 % Trenngel). Je Spur wurden ca. 10 µg Protein geladen.

Spur 1: Molekulargewicht-Standard, 6 µl

Spur 2: TCP („total cellular protein“) der Bakterien vor Induktion mit IPTG

Spur 3: TCP nach Induktion mit IPTG

Spur 4: unlösliche Phase der Bakterien

Spur 5: lösliche Phase der Bakterien

Spur 6: Durchfluß der Nickel-Säule

Spur 7: Waschfraktion der Nickel-Säule mit Bindepuffer

Spur 8: Waschfraktion der Nickel-Säule mit Waschlösung

Spur 9: Eluat der Nickel-Säule

#### 4.3.5 Western-Blot-Analyse der Antiseren bzw. gereinigten Antikörper

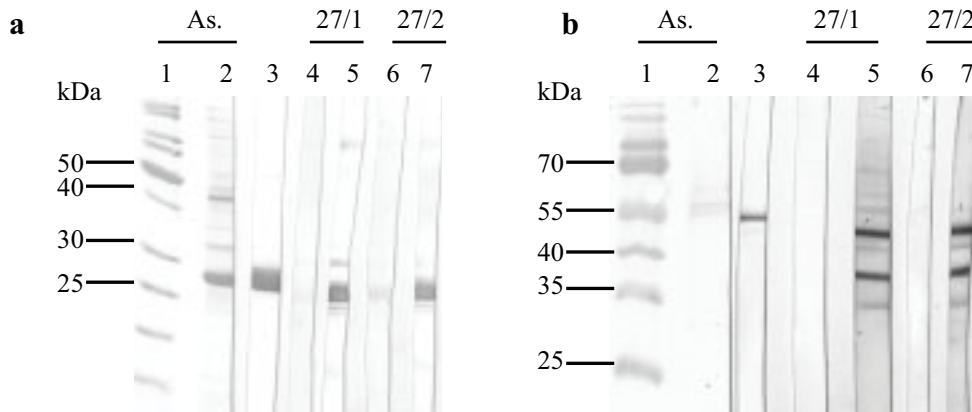
Bei den Western-Blot-Analysen wurde für Kandidat 31 mit den Präimmun- bzw. Antiseren gearbeitet. Für die anderen 3 Kandidaten wurden die IgGs aus den von den Firmen erhaltenen Seren aufgereinigt (sowohl aus den Präimmun- als auch aus den Antiseren). Dazu wurde eine Protein-A-Säule verwendet. Die Seren bzw. gereinigten Antikörper wurden zunächst auf den rekombinanten Bakterien getestet. Hierfür wurde die entsprechende Phase der Bakterien (lösliche oder unlösliche), die das rekombinante Protein enthält, auf die Membran transferiert (ca. 8-10 µg Protein je Spur). Als Positivkontrolle wurde ein anti-Histidin-Antikörper verwendet, der das „His-Tag“ der rekombinanten Proteine erkennt. Anschließend wurden die Antiseren bzw. Antikörper auf Basalapparaten von *C. reinhardtii* getestet. Die Blots mit den Basalapparaten zeigen in der

Amidoschwarzfärbung z.T. nur auf Höhe der Tubuline extrem schwache Banden. Die Basalapparatpellets enthalten in der Regel ca. 20 µg Protein. Für die Western-Blots wurden 2 bis 4 Basalapparatpellets je Gel bzw. Membran verwendet, so dass die Membranen eine Proteinmenge von ca. 4-8 µg Protein/Spur enthalten sollten. Allerdings waren die Basalapparatpellets für bis zu 15 Monate bei -20 °C gelagert worden, bevor sie in den Western-Blots verwendet wurden.

### **Kandidat 27**

Abb. 24 a zeigt die Western-Blot-Analyse der beiden gereinigten IgGs anti-27/1 und anti-27/2 mit der unlöslichen Phase der rekombinanten Bakterien. In der Amidoschwarzfärbung der Membran ist deutlich die Bande des rekombinanten Proteins bei ca. 27 kDa sichtbar (Spur 2). Der anti-„His-Tag“-Antikörper erkennt ausschließlich diese Bande (Spur 3). Auch die gereinigten IgGs der beiden Kaninchen (27/1 und 27/2) reagieren mit dem rekombinanten Protein (Spuren 5 und 7). Die IgGs, die aus den Präimmunseren gewonnen wurden, zeigen dagegen keinerlei Reaktion (Spuren 4 und 6).

In Abb. 24 b ist die Western-Blot-Analyse der gereinigten IgGs mit Basalapparaten dargestellt. Trotz der geringen Proteinmenge auf der Membran (Spur 2) zeigt der anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper eine gute Reaktion (Spur 3). Die IgGs, die aus den Seren der beiden Kaninchen erhalten wurden, verhalten sich identisch und erkennen jeweils 2 Banden (Spuren 5 und 7). Die eine Bande liegt bei ca. 40 kDa. Diese Größe entspricht sowohl der Größe des Genmodells (41,5 kDa) als auch der Größe der Banden, in denen die Peptide für diesen Kandidaten ursprünglich im 1D-Gel identifiziert wurden (39-47 kDa). Die 2. Bande befindet sich bei knapp 55 kDa und stellt vermutlich eine Kreuzreaktion der Antikörper dar. Die zusätzlichen, schwächeren Banden bei anti-27/1 und anti-27/2 auf den Basalapparaten sind auf eine etwas zu lange Entwicklung des Western-Blots zurückzuführen. Die jeweiligen Präimmun-IgGs zeigen keine Reaktion (Spuren 4 und 6).



**Abb. 24: Western-Blot-Analyse der Antikörper anti-27/1 und anti-27/2 mit rekombinanten Bakterien (Abb. a) und Basalapparaten von *C. reinhardtii* (Abb. b)**

Die unlösliche Phase der rekombinanten Bakterien (Abb. a) bzw. gereinigte Basalapparate (Abb. b) wurden gelelektrophoretisch getrennt (4 % Sammel- und 12 % Trenngel) und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Maus- (für die Positivkontrollen) bzw. anti-Kaninchen-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat verwendet (jeweils 1:2000). Für den Blot in Abb. a wurden die IgGs 1:5000 verdünnt. Für die Western-Blot-Analyse mit Basalapparaten (Abb. b) war die Verdünnung 1:1000. Die IgGs, die aus den Präimmunseren gewonnen wurden, wurden jeweils auf die gleiche IgG-Konzentration gebracht wie die zugehörigen Antikörper.

Spuren 1 und 2: Amidoschwarz-Färbung (As.) von Molekulargewichtstandard (Spuren 1) und unlöslicher Phase der rekombinanten Bakterien (Spur 2 in Abb. a) bzw. gereinigter Basalapparate (Spur 2 in Abb. b)

Spuren 3: Positivkontrollen, anti-„His-Tag“-Antikörper (1:1500) in Abb. a bzw. anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (1:2000) in Abb. b

Spuren 4: prä-IgG von 27/1

Spuren 5: anti-27/1

Spuren 6: prä-IgG von 27/2

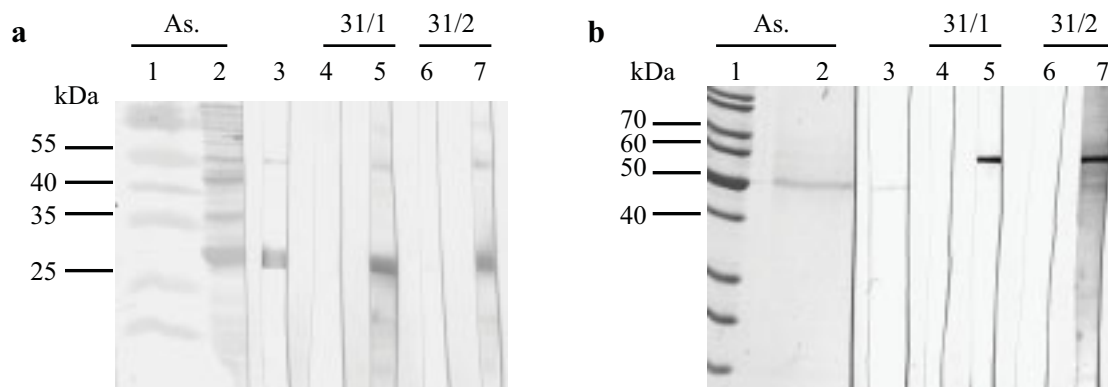
Spuren 7: anti-27/2

### Kandidat 31

Für diesen Kandidaten wurden in den Western-Blots die Präimmun- bzw. Immunseren verwendet. Abb. 25 a zeigt die Analyse der Seren der beiden Kaninchen mit der unlöslichen Phase der Bakterien. In der Amidoschwarz-Färbung der Membran stellt das rekombinante Protein bei ca. 30 kDa die prominenteste Bande dar (Spur 2). Der anti-„His-Tag“-Antikörper reagiert mit dieser Bande, zeigt aber auch noch eine schwächere Reaktion bei ca. 55 kDa (Spur 3). Die beiden Immunseren erkennen ebenfalls das rekombinante Protein (Spuren 5 und 7). Die beiden Präimmunseren zeigen keinerlei Reaktion mit der unlöslichen Phase der rekombinanten Bakterien (Spuren 4 und 6).

In Abb. 25 b sind die Reaktionen der Präimmun- und Immunseren mit gereinigten Basalapparaten dargestellt. Obwohl in der Amidoschwarz-Färbung eine Bande bei 50 kDa erkennbar ist (Spur 2), reagiert der anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper nur extrem schwach mit

dieser Bande (Spur 3). Die Immunsereen der beiden Kaninchen zeigen untereinander das gleiche Verhalten. Sie erkennen exklusiv eine Bande bei ca. 60 kDa (Spuren 5 und 7). Die Größe des Genmodells von Kandidat 31 beträgt 63,2 kDa, und die Banden aus dem 1D-Gel, in denen die Peptide ursprünglich identifiziert wurden, lagen bei 58-65 kDa. Diese Größen stimmen also gut überein. Die beiden Präimmunsereen reagieren nicht mit den gereinigten Basalapparaten (Spuren 4 und 6).



**Abb. 25: Western-Blot-Analyse der Immunsereen anti-31/1 und anti-31/2 mit rekombinanten Bakterien (Abb. a) und Basalapparaten von *C. reinhardtii* (Abb. b)**

Die unlösliche Phase der rekombinanten Bakterien (Abb. a) bzw. gereinigte Basalapparate (Abb. b) wurden gelelektrophoretisch getrennt (4 % Sammel- und 12 % Trenngel) und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Maus- (für die Positivkontrollen) bzw. anti-Kaninchen-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat verwendet (jeweils 1:2000). Für den Blot in Abb. a wurden die Immunsereen 1:5000 verdünnt. Für die Western-Blot-Analyse mit Basalapparaten (Abb. b) war die Verdünnung 1:1000. Die Präimmunsereen wurden jeweils auf die gleiche IgG-Konzentration gebracht wie die zugehörigen Immunsereen.

Spuren 1 und 2: Amidoschwarz-Färbung (As.) von Molekulargewichtstandard (Spuren 1) und unlöslicher Phase der rekombinanten Bakterien (Spur 2 in Abb. a) bzw. gereinigter Basalapparate (Spur 2 in Abb. b)

Spuren 3: Positivkontrollen, anti-„His-Tag“-Antikörper (1:1500) in Abb. a bzw. anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (1:2000) in Abb. b

Spuren 4: Präimmunserum von 31/1

Spuren 5: Immunserum von 31/1

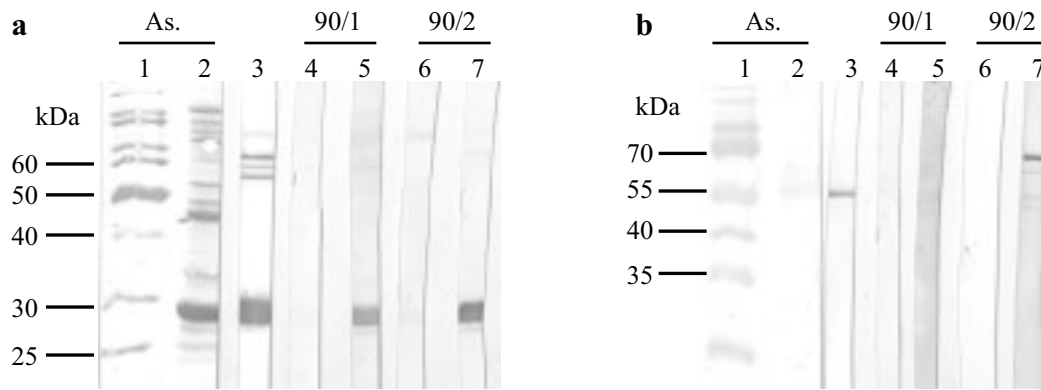
Spuren 6: Präimmunserum von 31/2

Spuren 7: Immunserum von 31/2

**Kandidat 90**

In Abb. 26 a ist die Western-Blot-Analyse der Antikörper anti-90/1 und anti-90/2 mit der unlöslichen Phase der Bakterien dargestellt. In der Amidoschwarz-Färbung ist das rekombinante Protein als Bande bei ca. 28 kDa sichtbar (Spur 2). Der anti-„His-Tag“-Antikörper reagiert stark mit dieser Bande (Spur 3). Darüber hinaus zeigt er drei Kreuzreaktionen im Bereich von 55-65 kDa. Die IgGs, die aus den beiden Immunsereen gewonnen wurden, zeigen untereinander das gleiche Verhalten: Sie erkennen das rekombinante Protein und darüber hinaus in einer viel schwächeren Reaktion noch eine weitere Bande knapp unterhalb des rekombinanten Proteins (Spuren 5 und 7). Die IgGs aus den Präimmunsereen reagieren nicht mit der unlöslichen Phase der Bakterien (Spuren 4 und 6).

Abb. 26 b zeigt die Reaktion der Antikörper anti-90/1 und anti-90/2 mit gereinigten Basalapparaten. Anti-90/2 zeigt eine starke Reaktion bei ca. 70 kDa (Spur 7 in Abb. 26 b). Diese Größe entspricht in etwa der Größe der Bande aus dem 1D-Gel (74 kDa), in der die Peptide von Kandidat 90 ursprünglich identifiziert wurden. Mit nur 44,4 kDa ist das Genmodell dieses Kandidaten wesentlich kleiner (s. Tabelle 1 und 4.3.2). Neben der Bande bei 70 kDa zeigt der Antikörper auch noch drei schwache Kreuzreaktionen im Bereich von ca. 50-60 kDa. Obwohl der Antikörper anti-90/1 eine gute Reaktion mit dem rekombinanten Protein zeigt (s. Abb. 26 a, Spur 5), zeigt sich – trotz langer Entwicklungszeit – im Western-Blot auf gereinigten Basalapparaten keine Bande (Spur 5 in Abb. 26 b). Die IgGs, die aus den Präimmunsereen der beiden Kaninchen gewonnen wurden, zeigen keinerlei Reaktionen (Spuren 4 und 6).



**Abb. 26: Western-Blot-Analyse der Antikörper anti-90/1 und anti-90/2 mit rekombinanten Bakterien (Abb. a) und Basalapparaten von *C. reinhardtii* (Abb. b)**

Die unlösliche Phase der rekombinanten Bakterien (Abb. a) bzw. gereinigte Basalapparate (Abb. b) wurden gelelektrophoretisch getrennt (4 % Sammel- und 12 % Trenngel) und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Maus- (für die Positivkontrollen) bzw. anti-Kaninchen-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat verwendet (jeweils 1:2000). Für den Blot in Abb. a wurden die IgGs 1:5000 verdünnt. Für die Western-Blot-Analyse mit Basalapparaten (Abb. b) war die Verdünnung 1:1000. Die IgGs, die aus den Präimmunseren gewonnen wurden, wurden jeweils auf die gleiche IgG-Konzentration gebracht wie die zugehörigen Antikörper.

Spuren 1 und 2: Amidoschwarz-Färbung (As.) von Molekulargewichtstandard (Spuren 1) und unlöslicher Phase der rekombinanten Bakterien (Spur 2 in Abb. a) bzw. gereinigter Basalapparate (Spur 2 in Abb. b)

Spuren 3: Positivkontrollen, anti-„His-Tag“-Antikörper (1:1500) in Abb. a bzw. anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (1:2000) in Abb. b

Spuren 4: prä-IgG von 90/1

Spuren 5: anti-90/1

Spuren 6: prä-IgG von 90/2

Spuren 7: anti-90/2

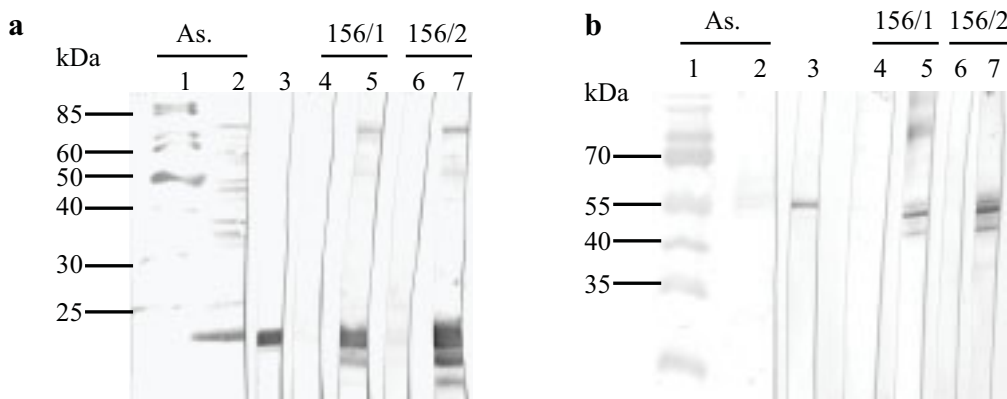
### Kandidat 156

Die Western-Blot-Analyse der Antikörper anti-156/1 und anti-156/2 mit der löslichen Phase der Bakterien ist in Abb. 27 a dargestellt. Die Größe des rekombinanten Proteins beträgt ca. 18 kDa. Diese Bande ist in der Amidoschwarz-Färbung gut zu erkennen (Spur 2). Der anti-„His-Tag“-Antikörper erkennt ausschließlich diese Bande (Spur 3). Auch die beiden Antikörper anti-156/1 und 156/2 zeigen eine sehr starke Reaktion mit dem rekombinanten Protein (Spuren 5 und 7). Außerdem werden noch 2 weitere Banden erkannt: bei ca. 80 kDa und unterhalb des rekombinanten Proteins. Anti-156/2 zeigt darüber hinaus noch eine 4. Bande im niedermolekularen Bereich (Spur 7). Die aus den Präimmunseren gewonnenen IgGs reagieren nicht mit der löslichen Phase der Bakterien (Spuren 4 und 6).

Abb. 27 b zeigt die Reaktion von anti-156/1 und anti-156/2 mit gereinigten Basalapparaten. Die Antikörper beider Kaninchen reagieren gleich (Spuren 5 und 7). Die stärkste Bande



liegt knapp unter 55 kDa. Diese Größe stimmt gut mit der Größe der Banden aus dem 1D-Gel überein, in denen die Peptide für diesen Kandidaten ursprünglich gefunden wurden (ca. 50-52 kDa). Das Genmodell hat eine Größe von 44,5 kDa. Außerdem zeigen anti-156/1 und anti-156/2 noch 3 weitere, wesentlich schwächere Reaktionen. Eine dieser Reaktionen liegt knapp oberhalb der stärksten Bande. Die beiden anderen befinden sich knapp darunter bzw. bei ca. 40 kDa. Die IgGs beider Präimmunseren reagieren nicht mit den gereinigten Basalapparaten (Spuren 4 und 6).



**Abb. 27: Western-Blot-Analyse der Antikörper anti-156/1 und anti-156/2 mit rekombinanten Bakterien (Abb. a) und Basalapparaten von *C. reinhardtii* (Abb. b)**

Die lösliche Phase der rekombinanten Bakterien (Abb. a) bzw. gereinigte Basalapparate (Abb. b) wurden gelelektrophoretisch getrennt (4 % Sammel- und 12 % Trenngel) und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Maus- (für die Positivkontrollen) bzw. anti-Kaninchen-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat verwendet (jeweils 1:2000). Für den Blot in Abb. a wurden die IgGs 1:5000 verdünnt. Für die Western-Blot-Analyse mit Basalapparaten (Abb. b) war die Verdünnung 1:1000. Die IgGs, die aus den Präimmunseren gewonnen wurden, wurden jeweils auf die gleiche IgG-Konzentration gebracht wie die zugehörigen Antikörper.

Spuren 1 und 2: Amidoschwarz-Färbung (As.) von Molekulargewichtstandard (Spuren 1) und löslicher Phase der rekombinanten Bakterien (Spur 2 in Abb. a) bzw. gereinigter Basalapparate (Spur 2 in Abb. b)

Spuren 3: Positivkontrollen, anti-„His-Tag“-Antikörper (1:1500) in Abb. a bzw. anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (1:2000) in Abb. b

Spuren 4: prä-IgG von 156/1

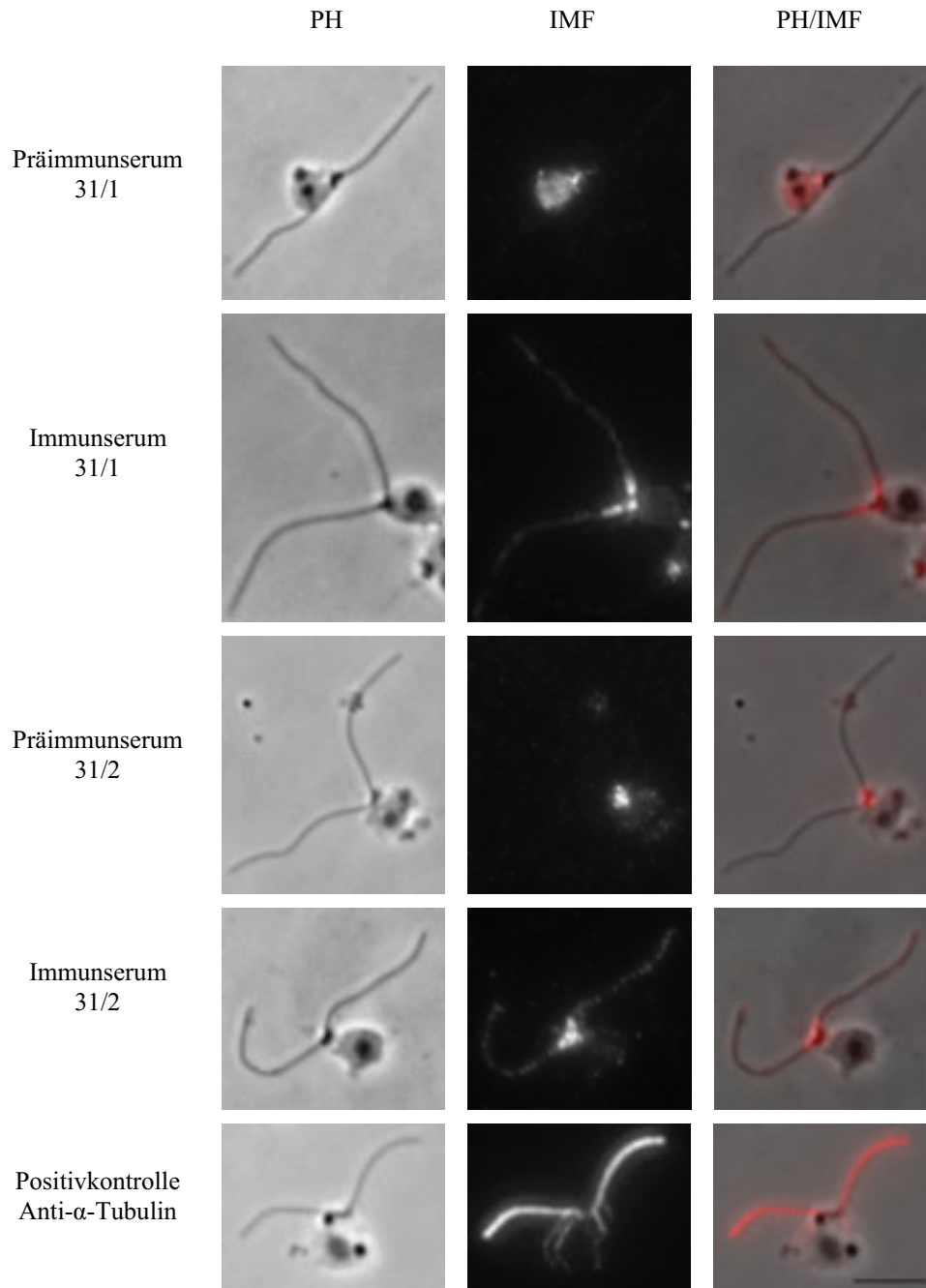
Spuren 5: anti-156/1

Spuren 6: prä-IgG von 156/2

Spuren 7: anti-156/2

#### 4.3.6 Lokalisation der 4 Kandidaten durch indirekte Immunfluoreszenz

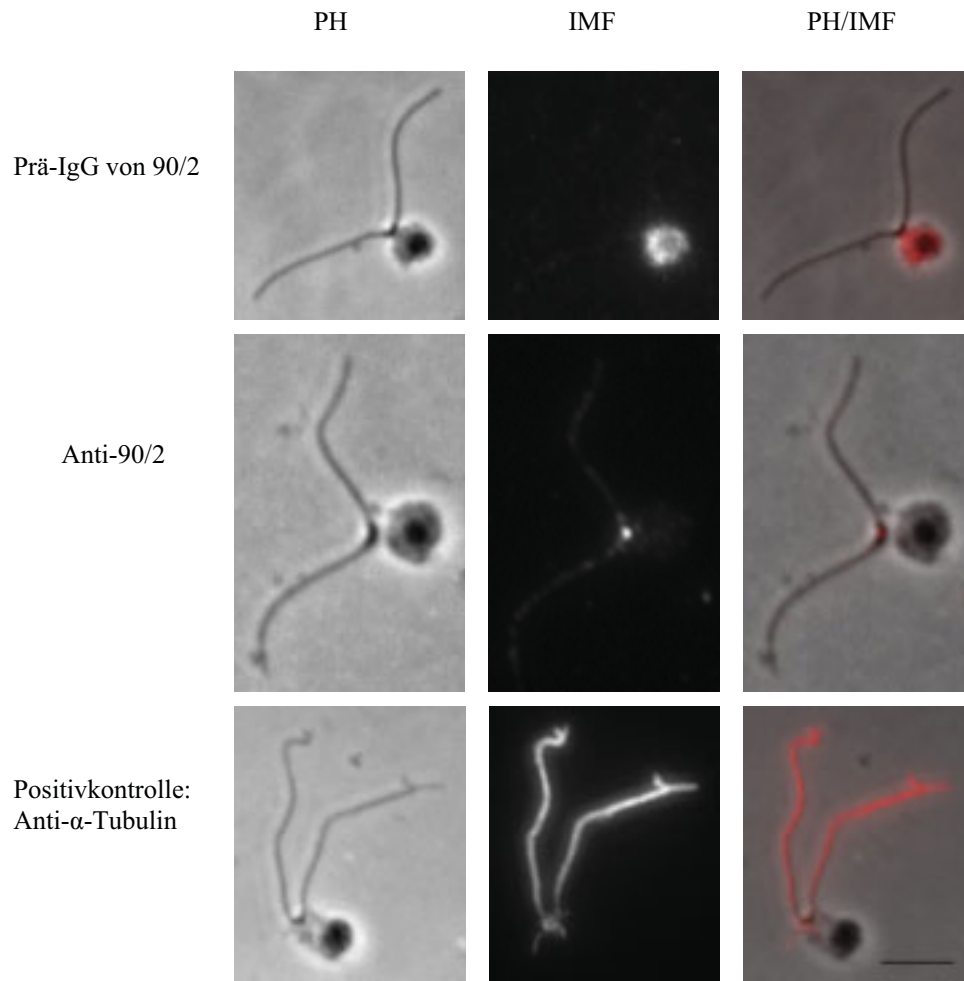
Obwohl unterschiedliche Verdünnungen der Antikörper und Präparationsmethoden ausprobiert wurden, konnte für **Kandidat 27** bisher keine gute Lokalisation durch Immunfluoreszenzmikroskopie erzielt werden. Hier war nicht nur für die beiden Antikörper (anti-27/1 und anti 27/2), sondern auch bereits für die IgGs, die aus beiden Präimmunseren gewonnen wurden, eine punktförmige Fluoreszenz sichtbar (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisation durch indirekte Immunfluoreszenz für **Kandidat 31** ist in Abbildung 28 dargestellt. Wie schon für die Western-Blot-Analysen wurde auch hier direkt mit den Präimmun- bzw. Immunseren gearbeitet, also ohne vorherige Aufreinigung der IgGs. Beide Präimmunseren zeigen bereits eine punktförmige Fluoreszenz im Bereich des Basalapparates bzw. z.T. leicht Richtung Zellkern verschoben. Bei den beiden Antikörpern kommen jeweils zwei zusätzliche Signale an den Basen der Geißeln hinzu. Auch die Geißeln zeigen ein gesprenkeltes Fluoreszenzmuster, das jedoch weitaus weniger stark ausgeprägt ist als die punktförmigen Signale. Bei der Positivkontrolle (anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper) sind im Fluoreszenzbild nicht nur die Geißeln, sondern auch die mikrotubulären Geißelwurzeln gut erkennbar. Abbildung 29 zeigt die Lokalisation von **Kandidat 90** durch indirekte Immunfluoreszenz mit dem Antikörper anti-90/2. Die IgGs, die aus dem Präimmunserum isoliert wurden, zeigen eine starke Reaktion im Bereich des Zellkerns. Mit dem Antikörper ergibt sich ein punktförmiges Signal im Bereich des Basalapparates. Hierbei wurde reproduzierbar nur ein einziger Punkt beobachtet. Wie schon bei Kandidat 31 waren auch hier die Geißeln über die gesamte Länge schwach markiert. Sämtliche Versuche, den Kandidaten mit dem Antikörper anti-90/1 in der indirekten Immunfluoreszenz zu lokalisieren, blieben erfolglos. In Abbildung 30 ist die Immunfluoreszenzlokalisierung von **Kandidat 156** mit Hilfe des Antikörpers anti-156/2 dargestellt. Die aus dem Präimmunserum gewonnenen IgGs zeigen besonders im Bereich des Zellkerns eine diffuse Fluoreszenz. Die Reaktion mit dem Antikörper ergibt ein punktförmiges Signal im Bereich des Basalapparates (ein einzelner Punkt). Im Fall des Antikörpers anti 156/1 zeigen schon die aus dem Präimmunserum isolierten IgGs eine punktförmige Fluoreszenz, die z.T. im Bereich des Basalapparates, z.T. aber auch leicht daneben lag (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 28: Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten von *C. reinhardtii* mit den Immunsereen zu Kandidat 31**

Isolierte Cytoskelette von *C. reinhardtii* wurden mit den links angegebenen Seren (1:200) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein monoklonaler anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper eingesetzt (1:200). Als sekundäre Antikörper dienten Cy3-Konjugate in der Verdünnung 1:200 (anti-Kaninchen im Fall der Seren, anti-Maus für die Positivkontrolle). In der linken Spalte sind jeweils die Phasenkontrastaufnahmen (PH) dargestellt. In der mittleren Spalte befinden sich die dazugehörigen Immunfluoreszenzen (IMF) und rechts die Überlagerungen. Bereits in den beiden Präimmunsereen ist eine punktförmige Fluoreszenz sichtbar. Die beiden Immunsereen zeigen zwei zusätzliche Signale an der Basis der Geißeln. Auch an den Geißeln ist eine leichte Fluoreszenz erkennbar.

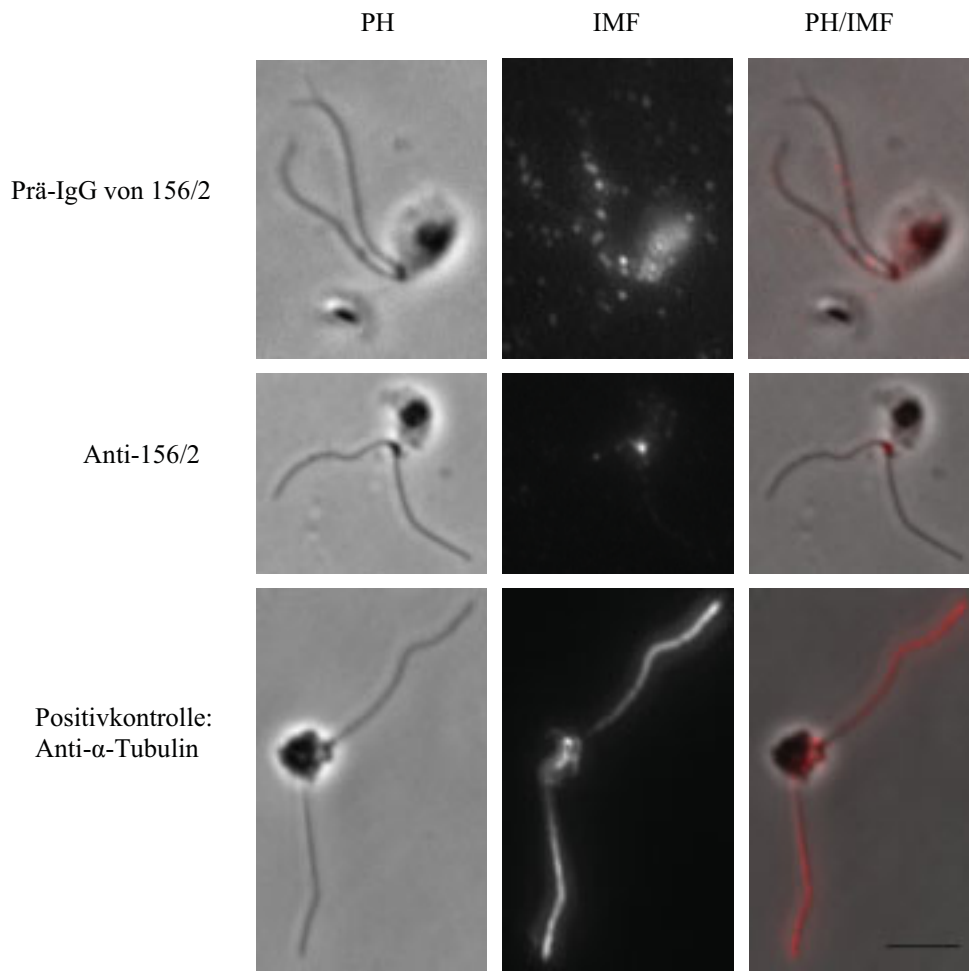
Alle Aufnahmen wurden mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv digital aufgenommen. Maßstab: 5  $\mu$ m



**Abb. 29: Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten von *C. reinhardtii* mit dem polyklonalen Antikörper 90/2**

Isolierte Cytoskelette von *C. reinhardtii* wurden mit den links angegebenen Antikörpern inkubiert. Sowohl die Präimmun-, als auch die Immun-IgGs wurden auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  gebracht. Als Positivkontrolle wurde ein monoklonaler anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper eingesetzt (1:200). Als sekundäre Antikörper dienten Cy3-Konjugate in der Verdünnung 1:200 (anti-Kaninchen im Fall der IgGs für den Kandidaten, anti-Maus für die Positivkontrolle). In der linken Spalte sind jeweils die Phasenkontrastaufnahmen (PH) dargestellt. In der mittleren Spalte befinden sich die dazugehörigen Immunfluoreszenzen (IMF) und rechts die Überlagerungen. Die aus dem Präimmunserum isolierten IgGs zeigen eine starke Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns. Für den Antikörper anti-90/2 wird eine punktförmige Fluoreszenz im Bereich des Basalapparates beobachtet.

Alle Aufnahmen wurden mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv digital aufgenommen. Maßstab: 5  $\mu\text{m}$



**Abb. 30: Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten von *C. reinhardtii* mit dem polyklonalen Antikörper 156/2**

Isolierte Cytoskelette von *C. reinhardtii* wurden mit den links angegebenen Antikörpern inkubiert. Sowohl die Präimmun-, als auch die Immun-IgGs wurden auf eine Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  gebracht. Als Positivkontrolle wurde ein monoklonaler anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper eingesetzt (1:200). Als sekundäre Antikörper dienten Cy3-Konjugate in der Verdünnung 1:200 (anti-Kaninchen im Fall der IgGs für den Kandidaten, anti-Maus für die Positivkontrolle). In der linken Spalte sind jeweils die Phasenkontrastaufnahmen (PH) dargestellt. In der mittleren Spalte befinden sich die dazugehörigen Immunfluoreszenzen (IMF) und rechts die Überlagerungen. Die aus dem Präimmenserum isolierten IgGs zeigen eine diffuse Fluoreszenz besonders im Bereich des Zellkerns. Beim Antikörper anti-156/2 ist ein punktförmiges Signal an der Basis der Geißeln sichtbar.

Alle Aufnahmen wurden mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv digital aufgenommen. Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Isolierung von Basalapparaten aus *C. reinhardtii*

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Isolationsmethode von Basalapparaten aus *C. reinhardtii* diente ein Ansatz, der für die einzellige Grünalge *S. similis* entwickelt wurde. Bei dieser Methode werden nach der Lyse der Zellen zunächst komplette Cytoskelette unter Verwendung eines ionenarmen Puffers (TE-Puffer) gewonnen. Im Anschluß daran werden die Geißeln durch mechanische Desintegration abgetrennt. Die Gewinnung reiner Basalapparate erfolgt durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Im Gegensatz zu *S. similis* besitzt *C. reinhardtii* eine Zellwand aus Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen, welche den Zellaufschluß und die nachfolgende Reinigung der Basalapparate erschwert. Snell et al. (1974) beschreiben eine Isolationsmethode von Basalkörpern aus *C. reinhardtii*, die die Paarungsreaktion zur Entfernung der Zellwände ausnutzt. Werden vegetative Zellen von *C. reinhardtii* in Stickstoff-Mangelmedium überführt, so bilden sich Gameten. Die Vermischung von Gameten unterschiedlichen Paarungstyps führt zur Freisetzung eines Enzyms. Dieses Enzym, Autolysin genannt, sorgt für die Auflösung der Zellwände, so dass die Gameten miteinander verschmelzen können. Die Methode ist jedoch sehr zeitaufwendig und deshalb nicht für Isolationen im präparativen Maßstab geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit einer Zellwandmutante gearbeitet. Im Gegensatz zum Wildtyp lassen sich diese Mutanten mit Hilfe von Detergenzien wie NP-40 oder Triton X-100 lysieren. Bei den Zellwandmutanten von *C. reinhardtii* unterscheidet man generell unterschiedliche Klassen (Harris, 1989): Zur Klasse A gehören Mutanten, bei denen mit dem Wildtyp vergleichbare Mengen an Zellwandmaterial gebildet werden. Allerdings sind die Zellwände nicht mit der Plasmamembran verbunden. In diese Klasse gehört auch der hier verwendete cw2-Stamm. Der in der Literatur häufiger verwendete cw15-Stamm fällt in Klasse C der Mutanten, bei denen weniger Zellwandmaterial gebildet wird. Klasse B umfaßt Mutanten, deren Zellwände elektronenmikroskopisch normal erscheinen. Allerdings zeigen die Zellen eine amöboide Gestalt und die Kolonien das flache Erscheinungsbild, welches für Zellwandmutanten typisch ist.

Vor der Lyse der Zellen wurden bei dem hier entwickelten Protokoll allerdings noch die folgenden zwei Schritte durchgeführt: Die Entgeißelung durch pH-Schock und das

Hindurchpipettieren der entgeißelten Zellkörper durch PEG. Bei der Übertragung des *S. similis*-Protokolls von Geimer (1998) stellte sich heraus, dass die gereinigte Basalapparatfraktion noch stark mit axonemalen Mikrotubuli verunreinigt war. Die Mikrotubuli waren dabei nicht nur an den Basalkörpern assoziiert, sondern lagen auch als freie Bruchstücke von Axonemen vor. Das für *S. similis* etablierte Protokoll (Geimer, 1998), bei dem nach der Lyse zunächst Cytoskelette isoliert werden und die Axonemen anschließend durch mechanische Desintegration von den Basalapparaten getrennt werden, konnte daher so nicht übernommen werden. Stattdessen wurden die Zellen in der vorliegenden Arbeit bereits vor der Lyse entgeißelt. Durch pH-Schock und nachfolgende zweimalige Zentrifugation konnten die Geißeln nahezu vollständig entfernt werden. Die PEG-Behandlung stammt ursprünglich aus dem Protokoll von Gould (1975). Auch dieses Protokoll zur Isolierung von Basalkörpern aus *C. reinhardtii* war in seiner Gesamtheit nicht für einen präparativen Maßstab geeignet, weil es u.a. zwei jeweils vierstündige Zentrifugationsschritte enthält. Während es bei Gould zu einer Vermischung der Zellen mit dem PEG kommt, wurden die entgeißelten Zellkörper in der vorliegenden Arbeit nur langsam durch das PEG hindurchpipettiert und als Phase oberhalb des PEGs wieder entnommen. Dieser Schritt bewirkt eine partielle Entfernung der Zellwände, erleichtert die nachfolgende Lyse und sorgt generell für weniger Zellwandverunreinigungen der Basalapparatfraktion.

Nach der Lyse der Zellen folgte eine Zentrifugation auf ein 50 %iges Saccharosekissen, um kompaktes Material wie Stärkekörner oder vereinzelte nicht lysierte Zellkörper zu pelletieren. Die Phasengrenze, welche die Basalapparate enthält, wurde weiter über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten gereinigt. Die Ausbeute von ca. 40 l Algenkultur beträgt etwa 20 µg Protein.

Gereinigte Basalapparate wurden an Dünnschnitten in Bezug auf ihre Ultrastruktur untersucht. Es zeigte sich, dass die meisten Strukturen intakt waren. Die „transitional fibers“ waren größtenteils erhalten; auch die H-förmige Übergangsregion war in Längsschnitten erkennbar. Die Geißelwurzeln waren allerdings nicht erhalten. Von der distalen Verbindungsfibrille war nur noch die Ansatzstelle an den Basalkörpern sichtbar. Am auffälligsten war allerdings das Fehlen des „cartwheels“, das sich normalerweise am proximalen Ende der Basalkörper befindet. Vermutlich wurde diese Struktur aufgrund der Wahl des ionenarmen Puffers und der Lysebedingungen mit Triton X-100 extrahiert. Ein

weiterer Effekt, der beobachtet wurde, war das Fehlen von Mikrotubuli. So sind bei der Sternstruktur in Abb. 4 c statt der erwarteten Mikrotubulidupletts nur einzelne Mikrotubuli zu sehen, wobei der A-Mikrotubulus erhalten wurde und der B-Mikrotubulus fehlt. Auch Gould (1975) beschreibt das Fehlen von Mikrotubuli in den Basalkörpern. Er beobachtete z.T. Basalkörper mit Mikrotubulidupletts statt -tripletts. In diesem Fall fehlten die C-Mikrotubuli. Möglicherweise weisen die einzelnen Mikrotubuli eine unterschiedliche Stabilität auf, so dass der eine Typ eher bei der Isolation erhalten wird als der andere.

## 5.2 Proteinzusammensetzung isolierter Basalapparate

Basalapparate, die mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode isoliert wurden, zeigen sowohl im 1D- als auch im 2D-Gel eine charakteristische und reproduzierbare Proteinzusammensetzung. Durch zweidimensionale Gelelektrophorese konnten 60-75 Proteine nachgewiesen werden, was unterhalb der in der Literatur beschriebenen Anzahl an Proteinen isolierter Basalapparate im 2D-Gel liegt. So wurden für die Grünalge *S. similis* 100-150 Proteine gezählt (Herkner, 2005), und auch für *C. reinhardtii* wurde bisher in etwa von der gleichen Anzahl ausgegangen (Dutcher, 1986; Keller et al., 2005). Für die hier beobachtete geringere Anzahl könnte es mehrere Gründe geben. Möglicherweise wurde weniger Gesamtprotein aufgetragen. Andererseits könnte es bei der in dieser Arbeit beschriebenen Isolierung auch zu einer stärkeren Extraktion der Strukturen und somit zum Verlust bestimmter Proteine gekommen sein. Eine weitere Möglichkeit wäre eine größere Reinheit der Präparation und dadurch bedingte kleinere Menge an kontaminierenden Proteinen.

Im 1D-Gel sind mehr als 35 Banden sichtbar. Wie auch schon beim 2D-Gel befinden sich viele Proteine im höhermolekularen Bereich. In Präparationen isolierter Säugercytoplasten werden ebenfalls vorwiegend Proteine in diesem Bereich angereichert (Bornens et al., 1987; Komesli et al., 1989). Ein Beispiel für ein bereits gut charakterisiertes centrosomales Protein mit hohem Molekulargewicht (220 kDa) ist Pericentrin (Doxsey et al., 1994). Im niedermolekularen Bereich des 1D-Gels fallen zwei prominente Banden ins Auge, die durch die massenspektrometrische Analyse als RBCS2 und Centrin identifiziert wurden. Im Basalapparat von *C. reinhardtii* ist Centrin vor allem in den folgenden Strukturen lokalisiert: in der distalen Verbindungsfibrille, dem „nucleus basal body connector“ (NBBC) und in den beiden Sternstrukturen der Übergangsregion (Wright et al., 1985; Schulze et al., 1987; Salisbury et al., 1988; Sanders und Salisbury,



1989). Erst vor kurzem wurde Centrin darüber hinaus auch in den „transitional fibers“ und im Lumen der Basalkörper nachgewiesen (Geimer und Melkonian, 2005). Sämtliche Centrin-haltige Strukturen bilden somit ein Gerüst, welches sich vom Zellkern bis zur Basis der Geißeln erstreckt. Des Weiteren wurde Centrin im kürzlich entdeckten V-förmigen Filamentsystem lokalisiert (Geimer und Melkonian, 2004 und 2005). Dieses Filamentsystem ist mit ganz bestimmten Mikrotubuli assoziiert und bereits in den Probasalkörpern angelegt. Diese frühe asymmetrische Verteilung von Centrin könnte als „Keim“ für die Addition von weiteren Centrinmonomeren dienen und somit am Aufbau des Centringerüsts beteiligt sein (Geimer und Melkonian, 2005).

### **5.3 Ansätze zur Identifikation der Proteine des Basalapparates**

Um die Proteine des Basalapparates zu identifizieren, wurde zunächst ein gelbasiertes Massenspektrometrierfahren gewählt. Ca. 40 µg Protein wurden in einem 1D-SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und sämtliche Banden massenspektrometrisch untersucht (durchgeführt von Frau Hawat an der Universität Jena). Im Vergleich zum ebenfalls durchgeführten MudPIT-Verfahren (s.u.) bietet es den Vorteil, dass die Molekulargewichte der ausgeschnittenen Banden bekannt sind. In der Massenspektrometrie ermittelte Peptide lassen sich somit nicht nur den Genmodellen der Datenbank zuordnen, sondern auch der Größe der jeweiligen Gelbande. Dadurch ist es möglich, das theoretische Molekulargewicht des Proteins aus der Datenbank mit der tatsächlichen Größe der Gelbande, in der die Peptide gefunden wurden, zu vergleichen. Stimmen die Größen überein, gibt dies einen ersten Hinweis auf die Richtigkeit der Modelle und somit auch zusätzliche Sicherheit für das gefundene Protein.

Als zweiter Ansatz wurde ein MudPIT-Verfahren angewendet (durchgeführt von Herrn Dr. Wolters am Proteincenter der Ruhr-Universität Bochum). Diese Analyse erlaubt die Untersuchung komplexer Proteinmischungen ohne vorherige Auftrennung über ein Gel. Für das Hefeproteom konnten mit dieser Methode z.B. nahezu 1500 Proteine identifiziert werden, worunter sich auch Proteine befanden, die bei gelbasierten Ansätzen nur selten entdeckt werden (Washburn et al., 2001).

Schließlich wurden die Basalapparate in 2D-Gelen elektrophoretisch getrennt, wobei die massenspektrometrische Untersuchung der einzelnen Spots noch aussteht. Die Trennung der Proteine erfolgt hierbei nicht nur aufgrund ihres Molekulargewichts, sondern auch

gemäß ihrer Ladung. Dies erlaubt einerseits eine Abschätzung der Gesamtzahl an Proteinen, aber auch die Identifikation von posttranslationalen Modifikationen. Allerdings sind die pH-Gradienten, die für die erste Dimension verwendet werden, so beschaffen, dass extrem saure bzw. extrem basische Proteine nicht enthalten sind.

Betrachtet man die Genmodelle, die mit den beiden massenspektrometrischen Verfahren identifiziert wurden, so fällt auf, dass einige bereits bekannte Basalapparatproteine nicht gefunden wurden. Was die Tubuline betrifft, so finden sich bei unseren Analysen nur  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, die als Heterodimere die Mikrotubuli aufbauen. Die drei anderen Tubuline ( $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Tubulin), die bei *C. reinhardtii* ebenfalls in den Basalkörpern lokalisiert sind, konnten nicht identifiziert werden. Auf elektronenmikroskopischer Ebene wurde  $\gamma$ -Tubulin an und in den Basalkörpern nachgewiesen (Silflow et al., 1999). In einigen Dünnschnitten fand sich dabei ein besonders deutliches Signal an der Übergangsregion. Dass  $\gamma$ -Tubulin trotz dieser Lokalisation nicht in unseren Ansätzen identifiziert wurde, könnte möglicherweise an einer zu geringen Menge dieses Proteins liegen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass  $\gamma$ -Tubulin nur locker gebunden ist und daher bei der Isolierung extrahiert wurde.  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Tubulin wurden bisher nur über Immunfluoreszenzmikroskopie an den Basalkörpern nachgewiesen. Die genauere Lokalisation über Immunogoldelektronenmikroskopie steht noch aus. Die Analyse von Mutanten (*uni3* im Fall von  $\delta$ - und *bld2* im Fall von  $\epsilon$ -Tubulin) legt allerdings nahe, dass diese beiden Tubuline eher eine Rolle beim Aufbau bzw. der Stabilität der Mikrotubulidupletts bzw. -tripletts spielen (Dutcher und Trabuco, 1998; Dutcher et al., 2002). Es ist daher vorstellbar, dass sie weniger stark mit den Basalkörpern assoziiert sind und dadurch bei der Isolationsmethode nicht erhalten wurden.

Ein weiteres Basalapparatprotein von *C. reinhardtii*, das in unserer Analyse fehlt, ist DIP13. Hierbei handelt es sich um ein knapp 13 kDa großes Protein, welches in den Geißeln, den mikrotubulären Geißelwurzeln und Basalkörpern lokalisiert ist (Pfannenschmid et al., 2003). Die Immunogoldelektronenmikroskopie zeigt, dass es an den Basalkörpern sowohl im Lumen als auch außerhalb vorkommt. Die Lokalisation außerhalb der Basalkörper befindet sich dabei am proximalen Ende und auf der dem jeweils anderen Basalkörper abgewandten Seite. DIP13 könnte somit eine Rolle bei der Verankerung der mikrotubulären Geißelwurzeln an den Basalkörpern spielen. Da die mikrotubulären Geißelwurzeln – und vermutlich auch ihre Ansatzstellen – in unserer Präparation nicht

erhalten sind, war vermutlich auch bei diesem Protein die Menge zu gering (oder gar nicht mehr vorhanden), um es mit den massenspektrometrischen Verfahren zu identifizieren.

Überraschenderweise wurden beim MudPIT-Ansatz drei Peptide für das „cartwheel“-Protein BLD10 gefunden, obwohl diese Struktur bei der elektronenmikroskopischen Auswertung von Dünnschnitten isolierter Basalapparate nicht beobachtet wurde. Matsuura et al. (2004) vermuten, dass BLD10 die Hauptstrukturkomponente des „cartwheels“ sein könnte. Möglicherweise ist dieses Protein aber nur locker mit dieser Struktur assoziiert, so dass eine Identifikation bei uns dennoch möglich war – trotz nicht beobachtetem „cartwheel“ in der Präparation. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass BLD10 fest mit den Mikrotubulitriplets verbunden ist. Reste der Triplets könnten in der Präparation noch enthalten, aber nur schwer im Elektronenmikroskop sichtbar sein. Da keine statistische Auswertung der Dünnschnitte in Bezug auf das Fehlen des „cartwheels“ vorgenommen wurde, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass das „cartwheel“ in einigen Basalkörpern noch vorhanden war.

Bei Analyse der bisher nicht annotierten Genmodelle, die sowohl mit dem 1D- als auch mit dem MudPIT-Verfahren identifiziert wurden, fällt der hohe Anteil an „coiled coil“-Proteinen ins Auge (Tabellen 1 und 2). Bei diesen Proteinen tauchen Motive aus 7 Aminosäuren (oder Vielfachen davon: „Heptad-Repeats“) auf, welche in der Lage sind,  $\alpha$ -Helices auszubilden. Die Aminosäureseitenketten dieser Helices können durch hydrophobe Wechselwirkungen interagieren und dadurch die „coiled coils“ ausbilden, die eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielen. Auch viele centrosomale Proteine besitzen ausgedehnte „coiled coil“-Bereiche (Salisbury, 2003). Dazu gehören z.B. auch die Tektine (Steffen und Linck, 1988) und SF-Assemblin (Weber et al., 1993). Für OFD1 sind diese Bereiche für die centrosomale Lokalisation sogar entscheidend (Romio et al., 2004).

#### **5.4 Vergleich der Genmodelle, die bei den unterschiedlichen Ansätzen gefunden wurden**

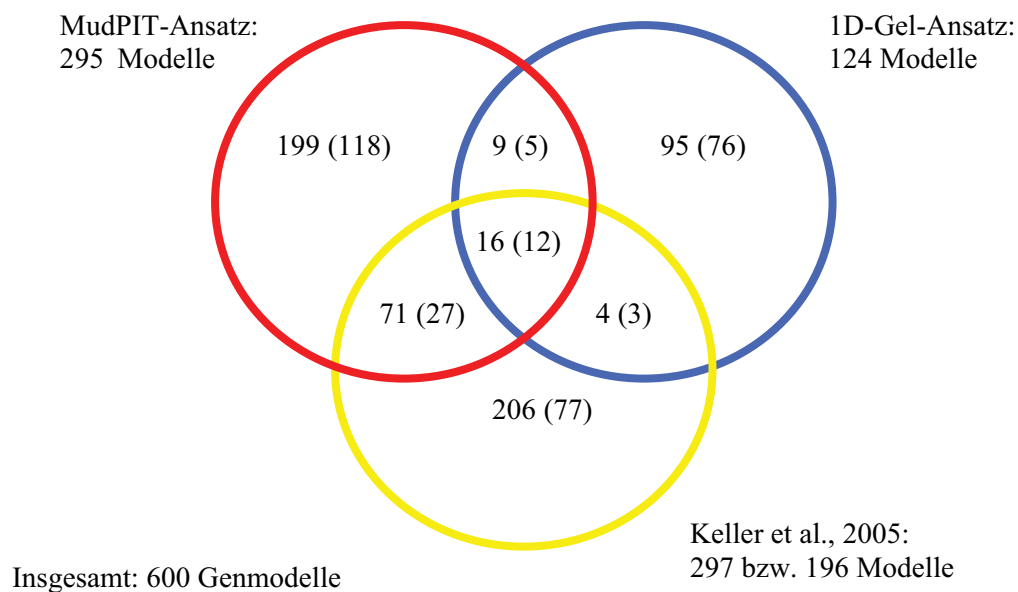
Abbildung 31 zeigt eine vergleichende Übersicht über die Genmodelle, die mit den beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ansätzen (1D-Gel- und MudPIT-Ansatz) identifiziert wurden. Die MudPIT-Analyse von Keller et al. (2005) wurde ebenfalls in das Venn-Diagramm integriert. Bei Keller et al. (2005) wurde nicht nur die Fraktion analysiert,

welche die Basalapparate enthielt, sondern auch zwei flankierende Kontrollfraktionen. Die aus diesen Messungen ermittelte Gesamtzahl an Proteinen beträgt 297. Im Anschluß wurden die Proteine aus den beiden Kontrollfraktionen von den Proteinen der Basalapparaturfraktion subtrahiert, was zum Wegfall von 101 Proteinen führte. Neben der jeweiligen Gesamtzahl an Proteinen ist für alle in Abbildung 31 dargestellten Ansätze auch der Anteil an bereits bekannten sowie neuen, potentiellen (d.h. bisher nicht annotierten) Basalkörperproteinen dargestellt (Zahlen in Klammern).

16 Proteine, von denen 12 in die Gruppe der Basalapparatproteine eingeordnet werden können, wurden in allen drei Ansätzen identifiziert. Diese 12 Proteine sind:  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, Centrin, SF-Assemblin, RIB72, zwei „coiled coil“-Proteine (Genmodelle 159932 und 170900), sowie die fünf in der vorliegenden Arbeit näher untersuchten Kandidaten. Als Kontaminationen wurden gefunden: Malatsynthase, RBCS2, mitochondriale ATP-Synthase und Fructose-1,6-Bisphosphatase.

Insgesamt fallen die geringen Überschneidungen zwischen den einzelnen Ansätzen ins Auge. Die Gemeinsamkeiten des 1D-Ansatzes zu den beiden MudPIT-Analysen sind dabei besonders niedrig: nur 9 (zwischen MudPIT- und 1D-Ansatz) bzw. 4 (zwischen 1D-Ansatz und Keller et al., 2005) Genmodelle tauchen als Überlappung auf. Da sich jedoch die Vorgehensweise beim 1D-Ansatz von dem einer MudPIT-Analyse grundsätzlich unterscheidet, ist diese geringe Gemeinsamkeit nicht allzu überraschend. Bei einem gelbasierten Verfahren kann es vorkommen, dass nicht alle Proteine gleich gut gelöst werden und daher evtl. nur schlecht in das Gel hineinwandern. Außerdem ist es möglich, dass sich nicht alle Peptide nach dem tryptischen Verdau wieder aus dem Gel eluieren lassen. Somit könnte es beim 1D-Ansatz zum Verlust von Proteinen gekommen sein. Auch die Färbung des 1D-Gels mit Silber, die aufgrund der limitierten Proteinmenge nötig war, ist für eine massenspektrometrische Analyse nicht ideal. Obwohl ein Protokoll verwendet wurde, das mit einer nachfolgenden Massenspektrometrie kompatibel ist, könnte auch dieser Schritt das Ergebnis der Messung beeinflusst haben. Darüber hinaus ist anzumerken, dass die  $X_{\text{Corr}}$ -Werte, die beim 1D-Ansatz verwendet wurden ( $\geq 1,5$  für einwertige,  $\geq 2,0$  für zwei- und  $\geq 2,5$  für dreiwertige Ionen), unter den üblicherweise benutzten Parametern ( $\geq 1,8$  für einwertige,  $\geq 2,5$  für zwei- und  $\geq 3,5$  für dreiwertige Ionen) lagen, die bei den beiden MudPIT-Analysen zum Einsatz kamen. Je höher die  $X_{\text{Corr}}$ -Werte liegen, desto besser ist das jeweilige Peptid unterstützt. Da bei der 1D-Analyse weniger stringente Kriterien angelegt wurden, ist davon auszugehen, dass dort eine ganze Reihe von falsch-

positiven Proteinen ermittelt wurde. Ein weiterer Punkt, der zu den geringen Überschneidungen beigetragen haben könnte, ist die Verwendung von unterschiedlichen Massenspektrometern. Während für die Messung des 1D-Ansatzes in Jena ein LCQ-Massenspektrometer verwendet wurde, kam für die MudPIT-Analyse in Bochum ein LTQ-Gerät zum Einsatz. Das LTQ-Massenspektrometer besitzt eine bessere Ionenfalle, was zu einer höheren und besseren Proteinidentifikation beiträgt – besonders auch im Hinblick auf weniger häufige Proteine (Blackler et al., 2006). Ähnlich gute Resultate können auf einem LCQ-Massenspektrometer nur durch unterschiedliche Vorfraktionierungen erreicht werden (Nunn et al., 2006).



**Abb. 31: Vergleich der identifizierten Genmodelle**

Die Zahlen bei jedem der drei Ansätze entsprechen der Gesamtzahl der gefundenen Genmodelle. Für Keller et al. (2005) sind zwei Zahlen angegeben: die erste Zahl entspricht den insgesamt gefundenen Genmodellen („supplemental tables“ 2 und 3 aus Keller et al., 2005). Die zweite Zahl gibt die Genmodelle wieder, die nach Subtraktion der beiden Kontrollfraktionen noch in der Basalapparatfraktion enthalten sind („supplemental table“ 2). Die Zahlen in Klammern stellen jeweils den Anteil an bekannten und neuen, potentiellen Basalapparatproteinen dar.

Obwohl in den beiden MudPIT-Verfahren mit 295 bzw. 297 Genmodellen eine vergleichbare Anzahl an Gesamtproteinen (einschließlich Kontaminationen) ermittelt wurde, umfaßt die Überschneidung zwischen den beiden Analysen erstaunlicherweise nur 71 Proteine, von denen 27 als Basalapparatproteine gewertet werden können (s. Abb. 31). Ein Grund hierfür könnte in den leicht unterschiedlichen Isolationsmethoden liegen. Bei Keller et al. (2005) wurden die Zellen in 10 mM HEPES mit 5 %iger Saccharose entgeißelt. In der vorliegenden Arbeit lagen die Algen bei der Entgeißelung im ionenarmen TE-Puffer vor. Auch die Lyse erfolgte unterschiedlich. Während Keller et al. (2005) 1 % NP-40 verwendeten, kam in dieser Arbeit 1,5 %iges Triton X-100 zum Einsatz. Durch die Wahl des ionenarmen Puffers und die drastischeren Lysebedingungen ist es denkbar, dass Proteine, die weniger fest an die Basalkörper assoziiert sind, evtl. nicht erhalten wurden. Eine Ultrastrukturanalyse isolierter Basalapparate durch Dünnschnitte wurde bei Keller et al. (2005) nicht vorgenommen. Dort wird lediglich ein Basalkörperpaar im „whole mount“ gezeigt. Daher sind genauere Aussagen, welche Strukturen bei der dort vorgestellten Isolationsmethode erhalten wurden und ein Vergleich mit der hier vorgestellten Arbeit nicht möglich. Die Fraktion, welche die gereinigten Basalapparate enthielt, wird bei Keller et al. (2005) als leicht grün beschrieben, wohingegen die in dieser Arbeit aus dem Saccharosegradienten entnommene Fraktion farblos war. Dies deutet auf einen erhöhten Anteil an kontaminierenden Chloroplastenproteinen bei Keller et al. (2005) hin, der durch die Subtraktion der beiden Kontrollfraktionen ausgeglichen werden sollte. Auch Verunreinigungen mit mitochondrialen und Zellwandproteinen sollten durch diese Subtraktion aus der Basalapparatfraktion entfernt werden. Von den 167 Genmodellen, die bei Keller et al. (2005) als Chloroplasten-, Mitochondrien- und Zellwandkontaminationen eingeordnet sind, wurden in der vorliegenden Arbeit nur 46 Modelle identifiziert. In unserer MudPIT-Analyse traten 20 Proteine mitochondrialen bzw. plastidären Ursprungs auf, die nicht bei Keller et al. (2005) gefunden wurden. Insgesamt läßt sich also feststellen, dass bei dem hier vorgestellten MudPIT-Ansatz im Vergleich zu Keller et al. (2005) weniger dieser Kontaminationen vorlagen. Allerdings wurden in unserer MudPIT-Analyse einige Histone identifiziert, die bei Keller et al. (2005) fehlen.

Einen weiteren wichtigen Punkt im Hinblick auf die Reinheit der Präparation stellen mögliche Verunreinigungen durch Geißelproteine dar. Da das Geißelproteom von *C. reinhardtii* bereits veröffentlicht ist (Pazour et al., 2005), können auch hier Vergleiche mit den unterschiedlichen Ansätzen gezogen werden. Analysiert man die Liste der **BUG-Proteine** von Keller et al. (2005), die Proteine enthält, deren Gene bei der Geißelregeneration hochreguliert sind, so fällt auf, dass von den 35 dort enthaltenen Proteinen 24 auch im Geißelproteom vertreten sind. Für den Großteil diese Proteine steht der Nachweis noch aus, ob sie evtl. sowohl in Geißeln als auch Basalkörpern lokalisiert sind, oder ob sie im Proteom von Keller et al. (2005) axonemale Verunreinigungen darstellen. In unserer MudPIT-Analyse wurden nur 10 der BUGs identifiziert, von denen sieben im Geißelproteom vorkommen. Hierzu gehören  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, Tektin und HSP90A, deren Lokalisation in Basalkörpern bzw. Centrosomen bereits nachgewiesen ist (Tektin: Steffen und Link, 1988; Stephens und Lemieux, 1998; HSP90A: Lange et al., 2000). RIB72 ist mit den A-Mikrotubuli der Geißeln assoziiert. Da sich die A-Mikrotubuli in den Basalkörpern fortsetzen, ist dieses Protein vermutlich ebenfalls in Basalkörpern lokalisiert. Immunfluoreszenzexperimente an isolierten Geißelapparaten (Ikeda et al., 2003) zeigten jedoch kein Signal an den Basalkörpern. Die beiden anderen auch bei Pazour et al. (2005) gefundenen Genmodelle sind 169308 (entspricht dem „flagellar associated protein“ FAP21) und 168906 (FAP63). Wie bereits erwähnt sind drei Proteine unseres MudPIT-Ansatzes zwar Bestandteil der BUG-Tabelle, wurden aber nicht im Geißelproteom identifiziert. Diese drei Proteine sind OFD1, sowie die beiden Kandidaten 27 und 156. Die Tatsache, dass die Kandidaten in mehreren unterschiedlichen Ansätzen identifiziert wurden, aber nicht im Geißelproteom enthalten sind, legt nahe, dass es sich hierbei um „echte“ Basalkörperproteine handelt.

Vergleicht man die beiden in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Ansätze mit dem Geißelproteom (Pazour et al., 2005), so finden sich einige Proteine, die nicht bei Keller et al. (2005) auftauchen. Sowohl der 1D- (ein gemessenes Peptid) also auch der MudPIT-Ansatz (drei Peptide) enthalten das „coiled coil“-Protein 157979, welches bei Pazour et al. (2005) mit drei Peptiden identifiziert wurde. Beim 1D-Ansatz finden sich darüber hinaus die Geißelproteine FAP33, FAP125, FAP220 und FAP243. Die Überschneidung zwischen MudPIT-Ansatz und Geißelproteom umfaßt 12 Proteine, die mit zwei oder mehr Peptiden bei Pazour et al. (2005) gefunden wurden. Dazu gehören die FAPs 78, 138 und 176,

HSP70 $\alpha$  (Genmodell 155023), ein hypothetisches Protein (Genmodell 165284) und ein „coiled coil“-Protein (160435). Des Weiteren fallen einige Proteine darunter, die als Kontaminationen gewertet werden können: Fructose-Bisphosphat-Aldolase, Malatdehydrogenase, plastidäre Phosphoglyceratkinase und S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase. Die letzten beiden der 12 Proteine sind weniger gut charakterisiert. Bei dem einen handelt es sich vermutlich um eine GTPase und das andere besitzt Ähnlichkeit zu Polyubiquitin. Insgesamt finden sich also nur wenige Überschneidungen zwischen dem Geißelproteom und den in dieser Arbeit ermittelten Proteinen des Basalapparates, was die Reinheit der Präparation in Bezug auf axonemale Kontaminationen unterstreicht.

Bei Keller et al. (2005) werden 18 Proteine als **POC-Proteine** bezeichnet. Hierbei handelt es sich um Proteine, deren Assoziation mit Centriolen durch Datenbankvergleiche unterstützt wird. Zehn dieser Proteine wurden auch bei den beiden in der vorliegenden Arbeit angewendeten massenspektrometrischen Verfahren identifiziert: POC4 (Genmodell 163629) wurde dabei nur beim 1D-Ansatz, die anderen neun POCs (POC1-3, POC6, POC9-11, POC15, POC18) nur bei der MudPIT-Analyse gefunden. Bei POC4 handelt es sich um ein Protein, das Ähnlichkeit mit dem Centrin-bindenden Protein SF11 besitzt. SF11 ist im Spindelpolkörper der Hefe lokalisiert, und das menschliche Homolog wurde an Centrosomen in der Nähe der Centriolen nachgewiesen (Kilmartin, 2003). Die Centrinbindung wird über sogenannte „Sfi-Repeats“ vermittelt: Motiven aus 23 Aminosäuren, die Centrin im Verhältnis 1:1 binden. POC4 verfügt über fünf dieser „Repeats“ und ist damit potentiell in der Lage, fünf Moleküle Centrin zu binden.

Das Protein NPHP-4 (POC10, Genmodell 164333) ist mit  $\alpha$ -Tubulin assoziiert und wurde in Centrosomen bzw. Basalkörpern lokalisiert (Mollet et al., 2005). Außer einer Prolinreichen Region besitzt dieses 137 kDa große Protein keine bisher bekannten Motive oder funktionellen Domänen. Mutationen im *NPHP-4*-Gen sind für eine bestimmte Art von Nierenkrankheiten verantwortlich (Mollet et al., 2002).

Die übrigen 8 in unserer MudPIT-Analyse identifizierten POCs sind bisher weniger gut charakterisiert. Zwei dieser Proteine besitzen  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domänen, sogenannte EF-Hände, wie sie auch bei dem centrosomalen Protein Centrin und bei RIB72 vorkommen. Bei der EF-Hand handelt es sich um ein „Helix-Loop-Helix“-Motiv, welches ursprünglich bei der Röntgenstrukturanalyse von Parvalbumin entdeckt wurde (Kretsinger und Kockolds, 1973). Bei den meisten Proteinen taucht dieses Motiv paarweise auf (ein oder



mehrere Paare), wobei jede EF-Hand ein Molekül  $\text{Ca}^{2+}$  binden kann. Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  führt zu einer Konformationsänderung des Proteins (Ikura, 1996).

Ein weiteres Protein (POC9, Genmodell 166376) weist Ähnlichkeiten zu dem bereits vorgestellten RIB72 auf. Wie RIB72 besitzt auch dieses Protein DM10-Domänen, die aus ca. 105 Aminosäuren bestehen. Die genaue Funktion dieser Domäne ist noch nicht bekannt (King, 2006). Allerdings wurde sie bisher nur bei 2 Typen von Proteinen gefunden: bei RIB72 (und seinen Homologen), sowie bei einer bestimmten Klasse von Nukleosiddiphosphatkinasen, die ebenfalls mit Axonemen assoziiert sind (Patel-King et al., 2004). Die restlichen 5 POCs sind entweder Bestandteil des menschlichen Centrosoms (wie z.B. CEP290) oder wurden in dem vergleichenden Bioinformatik-Ansatz identifiziert (Li et al., 2004). Bei diesem Bioinformatik-Ansatz wurde das *Arabidopsis*-Proteom von dem gemeinsamen Proteom von *C. reinhardtii* und *H. sapiens* subtrahiert und dadurch ca. 700 Proteine identifiziert, die ausschließlich in Organismen mit Geißeln und Basalkörpern vorkommen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass die Überschneidungen zwischen den einzelnen Ansätzen (1D- und MudPIT-Ansatz sowie die Analyse von Keller et al., 2005) relativ gering sind. Insgesamt wurden bei unseren beiden Ansätzen weniger Kontaminationen mit Chloroplasten-, Zellwand- und mitochondrialen Proteinen beobachtet als bei Keller et al. (2005). Ein Vergleich mit dem Geißelproteom zeigt darüber hinaus, dass sich unter den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteinen nur wenige Geißelproteine befinden. Dies unterstreicht die schon bei der elektronenmikroskopischen Analyse beobachtete Reinheit der Präparation in Bezug auf Verunreinigungen mit axonemalen Mikrotubuli. Die fünf in dieser Arbeit näher untersuchten Kandidaten wurden in allen drei Ansätzen (1D- und MudPIT-Ansatz der vorliegenden Arbeit, sowie Keller et al., 2005) identifiziert. Keiner dieser Kandidaten ist jedoch Bestandteil des Geißelproteoms, obwohl laut Keller et al. (2005) die Kandidaten 27 und 156 (BUG27 und BUG23) bei der Geißelregeneration hochreguliert sind. Von den 18 POC-Proteinen (Keller et al., 2005), deren Assoziation mit Basalkörpern/Centriolen durch den vergleichenden Bioinformatik-Ansatz (Li et al., 2004) bzw. Proteomanalyse des menschlichen Centrosoms (Andersen et al., 2003) unterstützt werden, wurden zehn in der vorliegenden Arbeit identifiziert. Die drei POCs, die auch Bestandteil des Geißelproteoms sind, waren nicht dabei.

## 5.5 Charakterisierung von 5 neuen, potentiellen Basalapparatproteinen

### Fehlerhafte Genmodelle

Für in der Massenspektrometrie identifizierte Proteine wurden die Genmodelle der JGI-Datenbank näher analysiert. Version 2.0 der Datenbank umfaßt insgesamt 125 Mbp, die sich auf 3211 „Scaffolds“ verteilen. Rund die Hälfte des Genoms befindet sich dabei auf 72 der „Scaffolds“, die alle mindestens 504 kb lang sind. Bei der Analyse der Genmodelle stellte sich heraus, dass viele von ihnen nicht korrekt aufgestellt wurden. Dies trifft selbst auf bereits bekannte und gut charakterisierte Proteine wie Centrin oder  $\beta$ -Tubulin zu, für die GenBank-Einträge existieren. Im Fall von Centrin (Genmodell 156177) wurden die ersten fünf Exons richtig erfaßt. Bei den letzten beiden Exons wurde jedoch das falsche Leseraster gewählt. Für  $\beta$ -Tubulin befinden sich zwei Genmodelle in der Datenbank: 158210 und 169905. Tatsächlich besitzt *C. reinhardtii* auch zwei Gene für dieses Protein. Bei einem der Modelle (158210) fehlen allerdings die ersten 73 Aminosäuren aufgrund einer genomischen Sequenzlücke. Unvollständige genomische Sequenzen sind auch bei den Modellen der Kandidaten ein Problem. In den Lücken könnten sich weitere, bisher nicht entdeckte Exons verbergen. Bei Kandidat 20 befinden sich zwei Sequenzlücken von 1241 und 2085 bp mitten im Modell. Eine dieser Lücken konnte in der vorliegenden Arbeit geschlossen werden. Das Genmodell von Kandidat 90 weist eine Lücke von ca. 90 Nukleotiden direkt hinter dem postulierten Stop-Codon auf. Die Sequenzierung der partiellen cDNA, die durch reverse Transkription und anschließende PCR für diesen Kandidaten gewonnen wurde, führte zur Entdeckung von zwei neuen Exons in einem von der Datenbank postulierten Intron.

Ein weiterer Fehler, der bei den aufgestellten Genmodellen beobachtet wurde, ist die Zusammenlegung von zwei unterschiedlichen Genen zu einem Modell. Kandidat 20 ist als mitochondrialer Translationsfaktor annotiert. Die genaue Analyse des Modells zeigt allerdings, dass nur der vordere Teil Ähnlichkeit zu anderen Translationsfaktoren aufweist. Die Peptide, welche in der vorliegenden Arbeit für den Kandidaten ermittelt wurden, liegen jedoch alle im hinteren Teil. Daher kann davon ausgegangen werden, dass in diesem Modell tatsächlich zwei Gene zusammengelegt wurden. Auch bei Genmodell 164747, das mit zwei Peptiden bei der MudPIT-Analyse identifiziert wurde, ist als Benutzerkommentar in der Datenbank vermerkt, dass das Modell vermutlich zwei Gene verbindet.

Des Weiteren treten fehlerhafte Genmodelle auf, bei denen offenbar bereits existierende EST-Daten bei der Aufstellung der Modelle nicht berücksichtigt wurden. So wurde z.B. bei der Sequenzierung der partiellen cDNA von Kandidat 27 festgestellt, dass Exon 6 um 42 bp länger ist als im Genmodell der Datenbank angegeben. Obwohl diese 42 bp durch EST-Daten unterstützt werden, sind sie nicht Bestandteil des Modells. Die Veröffentlichung der neuen Version 3.0 der Datenbank Anfang 2006 brachte keine Verbesserung im Hinblick auf die Genmodelle. Die oben beschriebenen Probleme treffen weiterhin zu. Eine Verbesserung ist lediglich in Bezug auf die genomischen Sequenzen festzustellen. Viele der noch in Version 2.0 enthaltenen Sequenzlücken wurden geschlossen, so dass die Anzahl der „Scaffolds“ mehr als halbiert werden konnte (auf 1557 gegenüber 3211 in Version 2.0). Rund die Hälfte des Genoms ist nun auf 24 „Scaffolds“ verteilt, die alle mindestens 1,6 Mbp groß sind.

### **Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenzen**

Sämtliche Antikörper (bzw. Immunseren im Fall von Kandidat 31) zeigen bei den Western-Blot-Analysen eine gute Reaktion gegen das rekombinante Protein der Bakterien. Die Kaninchen wurden also erfolgreich mit dem Antigen immunisiert. Auch die Reaktion mit den isolierten Basalapparaten ist in den meisten Fällen gut. Hier ergeben die beiden Antikörper gegen Kandidat 27 (anti-27/1 und anti-27/2) jeweils zwei Signale: Die Bande bei ca. 40 kDa entspricht sowohl der Größe des Genmodells als auch der Größe der Banden aus dem 1D-Gel, in denen die Peptide ursprünglich identifiziert wurden. Die zweite Bande im Western-Blot bei knapp 55 kDa stellt vermutlich eine Kreuzreaktion der Antikörper dar. Hier könnte eine Affinitätsreinigung der IgGs aus den Immunseren evtl. Abhilfe schaffen. Beide Immunseren zu Kandidat 31 zeigen eine sehr starke Reaktion bei ca. 60 kDa. Auch diese Größe stimmt nicht nur mit dem Genmodell (63,2 kDa) sondern auch mit den ursprünglichen Banden aus dem 1D-Gel (58-65 kDa) gut überein. Im Fall von Kandidat 90 reagiert nur der Antikörper anti-90/2 mit den Basalapparaten. Er erkennt eine Bande bei ca. 70 kDa. Diese Größe passt gut zu der Größe der Bande aus dem 1D-Gel, bei der die Peptide gemessen wurden (ca. 74 kDa). Das Genmodell für diesen Kandidaten ist mit nur 44,4 kDa wesentlich kleiner. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit durch das Auffinden von zwei neuen Exons bereits gezeigt werden, dass das Modell nicht korrekt aufgestellt wurde. Obwohl anti-90/1 eine gute Reaktion gegen das rekombinante Protein zeigt, wurde keine Bande bei den isolierten Basalapparaten beobachtet. Eine mögliche,

wenn auch sehr unwahrscheinliche Erklärung hierfür wäre, dass bei der Immunisierung dieses Kaninchens nur Antikörper gegen die beiden exprimierten „Tags“ („His-“ und „HSV-Tag“) gebildet wurden. Somit würde die im Western-Blot mit dem rekombinanten Protein beobachtete Reaktion auf einer Bindung der Antikörper an das (oder die beiden) „Tag(s)“ beruhen, die bei den isolierten Basalapparaten nicht möglich ist. Auch in der Immunfluoreszenz zeigt dieser Antikörper kein Signal. Bei Kandidat 156 zeigen beide Antikörper das gleiche Verhalten. Die Bande bei ca. 55 kDa bestätigt die Größe der Banden aus dem 1D-Gel, in denen die Peptide gemessen wurden (50-52 kDa).

Bei den indirekten Immunfluoreszenzen können zwei unterschiedliche Muster beobachtet werden. Beide Immunseren von Kandidat 31 zeigen drei punktförmige Signale im Bereich des Basalapparates, von denen das mittlere Signal allerdings bereits in den Präimmunseren vorhanden ist. Die beiden spezifischen Signale in den Immunseren befinden sich an der Basis der Geißeln. Die Antikörper gegen die Kandidaten 90 und 156 zeigen nur ein punktförmiges Signal im Bereich des Basalapparates.

## 5.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei Ansätze zur Identifikation der Proteine des Basalapparates von *C. reinhardtii* präsentiert: ein 1D-Gel- und ein MudPIT-Ansatz. Des Weiteren wurden die gereinigten Basalapparate auch elektrophoretisch in 2D-Gelen getrennt, wobei die Proteinauftrennung reproduzierbar war. Die massenspektrometrische Analyse der 60-75 Spots steht allerdings noch aus. Dieser weitere Ansatz könnte einerseits bereits identifizierte Proteine weiter absichern, aber auch zur Identifikation von neuen Proteinen führen. Da bei einem 2D-Ansatz die in der Massenspektrometrie identifizierten Peptide von nur einem Protein stammen – im Gegensatz zum 1D-Gel-Ansatz, wo eine Bande mehrere Proteine enthalten kann – sollte die Identifikation der Proteine erleichtert werden. Außerdem liefern 2D-Gele nicht nur Informationen über das Molekulargewicht der Proteine, sondern auch über den isoelektrischen Punkt. Daher lassen sich die von der Datenbank aufgestellten Genmodelle auch daraufhin überprüfen.

Die nähere Charakterisierung von fünf neuen, potentiellen Basalkörperproteinen wurde in dieser Arbeit begonnen. Die Klonierung und Sequenzierung von partiellen cDNAs für vier der Kandidaten deckte bereits einige Unterschiede zu den Genmodellen der Datenbank auf. Um die Genmodelle auf ihre Richtigkeit zu überprüfen, ist es daher nötig, die kompletten

cDNAs zu erhalten. Erste Versuche, dies durch RACE zu erreichen, waren allerdings nicht erfolgreich. Möglicherweise kann dieses Problem über einen „nested PCR“-Ansatz gelöst werden. Eine andere Strategie wäre die Konstruktion von Sonden, mit deren Hilfe man eine cDNA-Bank nach dem vollständigen Klon durchsuchen könnte.

Drei der neuen potentiellen Basalkörperproteine wurden in der vorliegenden Arbeit durch Immunfluoreszenzmikroskopie an isolierten Cytoskeletten im Bereich des Basalapparates lokalisiert. Eine Wiederholung dieser Experimente an ganzen Zellen wäre sinnvoll. Für genauere Lokalisationsstudien können die produzierten Antikörper darüber hinaus in der Immunogoldelektronenmikroskopie eingesetzt werden.

Zur funktionellen Analyse der hier vorgestellten Proteine bieten sich „knock-out“-Studien durch eine RNAi-Ansatz an. Durch verringerte Expression bzw. Ausschalten des jeweiligen Proteins könnten bestimmte Phänotypen entstehen, die sich sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch untersuchen lassen. Da die Basalapparate ultrastrukturell sehr gut untersucht sind, sollte es möglich sein, selbst kleine Unterschiede gegenüber dem Wildtyp zu erkennen. Auch in-vivo Lokalisationen der Proteine mit Hilfe von GFP-Konstrukten sind vorstellbar.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams G.M.W., Wright R.L. und Jarvik J.W. (1985) Defective temporal and spatial control in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* with variable flagellar number. *J. Cell Biol.* 100, 955-964.
- Andersen J.S., Wilkinson C.J., Mayor T., Mortensen P., Nigg E. und Mann M. (2003) Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426, 570-574.
- Batteiger B., Newhall W.J. und Jones R.B. (1982) The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J. Immunol. Meth.* 55, 297-307.
- Becker D. (1987) Isolierung und Charakterisierung der Geißelschuppen der Grünalge *Tetraselmis striata* (Prasinophyceae). Diplomarbeit, Botanisches Institut, Westfälische Wilhelms-Universität zu Münster.
- Beisson J. und Wright M. (2003) Basal body/centriole assembly and continuity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 96-104.
- Bhattacharya D., Steinkötter J. und Melkonian M. (1993) Molecular cloning and evolutionary analysis of the calcium-modulated contractile protein, centrin, in green algae and land plants. *Plant Mol. Biol.* 23, 1243-1254.
- Blackler A.R., Klammer A.A., MacCoss M.J. und Wu C.C. (2006) Quantitative comparison of proteomic data quality between a 2D and 3D quadrupole ion trap. *Anal. Chem.* 78, 1337-1344.
- Bobinnec Y., Khodjakov A., Mir L.M., Rieder C.L., Eddé B. und Bornens M. (1998) Centriole disassembly *in vivo* and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 143, 1575-1589.
- Bornens M., Paintrand M., Berges J., Marty M.-C. und Karsenti E. (1987) Structural and chemical characterization of isolated centrosomes. *Cell Motil. Cytoskel.* 8, 238-249.
- Boveri T. (1901) Zellenstudien IV. Über die Natur der Centrosomen. *Jena Z. Med. Naturwiss.* 28, 1-220.
- Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Hosler J.P. und Johnson A.M. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 24, 1534-1538.

- Burgos M.H. und Fawcett D.W. (1956) Studies on the fine structure of mammalian testis. I. Differentiation of the spermatids in the cat (*Felis domestica*). J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 287-300.
- Byers B., Shriver K. und Goetsch L. (1978) The role of spindle pole bodies and modified microtubule ends in the initiation of microtubule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Sci. 30, 331-352.
- Cahoon A.B. und Timko M.P. (2000) *Yellow-in-the-dark* mutants of *Chlamydomonas* lack the CHLL subunit of light-independent protochlorophyllide reductase. Plant Cell 12, 559-568.
- Cavalier-Smith T. (1974) Basal body and flagellar development during the vegetative cell cycle and the sexual cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Cell Sci. 16, 529-556.
- Chae T.H., Kim S., Marz K.E., Hanson P.I. und Walsh C.A. (2004) The *hyh* mutation uncovers roles for alpha Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. Nat. Genet. 36, 264-270.
- Cole D.G., Diener D.R., Himelblau A.L., Beech P.L., Fuster J.C. und Rosenbaum J.L. (1998) *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. J. Cell Biol. 141, 993-1008.
- Cordeiro M.C.R., Piqueras R., de Oliveira D.E. und Castresana C. (1998) Characterization of early induced genes in *Arabidopsis thaliana* responding to bacterial inoculation: identification of centrin and of a novel protein with two regions related to kinase domains. FEBS Lett. 434, 387-393.
- Davy B.E. und Robinson M.L. (2003) Congenital hydrocephalus in *hy3* mice is caused by a frameshift mutation in *Hydin*, a large novel gene. Hum. Mol. Genet. 12, 1163-1170.
- De Vitry C. und Vallon O. (1999) Mutants of *Chlamydomonas*: Tools to study thylakoid membrane structure, function and biogenesis. Biochimie 81, 631-643.
- Dibbayawan T.P., Harper J.D.I., Elliot J.E., Gunning B.E.S. und Marc J. (1995) A  $\gamma$ -tubulin that associates specifically with centrioles in Hela cells and the basal body complex in *Chlamydomonas*. Cell Biol. Int. 19, 559-567.
- Dicthenberg J.B., Zimmerman W., Sparks C.A., Young A., Vidair C., Zheng Y., Carrington W., Fay F.S. und Doxsey S.J. (1998) Pericentrin and  $\gamma$ -Tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. J. Cell Biol. 141, 163-174.

- Dippell R.V. (1968) The development of basal bodies in *Paramecium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 461-468.
- Doxsey S. (1998) The centrosome – a tiny organelle with big potential. Nat. Genet. 20, 104-106.
- Doxsey S. (2001) Re-evaluating centrosome function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2, 688-698.
- Doxsey S.J., Stein P., Evans L., Calarco P.D. und Kirschner M. (1994) Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. Cell 76, 639-650.
- Durso N.A. und Cyr R.J. (1994) A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 $\alpha$ . Plant Cell 6, 893-905.
- Dutcher S.K. (1986) Genetic properties of linkage group XIX in *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Wickner R.B., Hinnebusch A., Lambowitz A.M., Gunsalus I.C. und Hollaender A. (Hrsg.) Extrachromosomal elements in lower eukaryotes. Plenum Press, New York, S. 303-325.
- Dutcher S.K. (2003) Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. Curr. Opin. Microbiol. 6, 634-640.
- Dutcher S.K. und Trabuco E.C. (1998) The *UNI3* gene is required for assembly of basal bodies of *Chlamydomonas* and encodes  $\delta$ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily. Mol. Biol. Cell 9, 1293-1308.
- Dutcher S.K., Morrisette N.S., Preble A.M., Rackley C. und Stanga J. (2002)  $\epsilon$ -tubulin is an essential component of the centriole. Mol. Biol. Cell 13, 3859-3869.
- Ehler L.L., Holmes J.A. und Dutcher S.K. (1995) Loss of spatial control of the mitotic spindle apparatus in a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strain lacking basal bodies. Genetics 141, 945-960.
- Errabolu R., Sanders M.A. und Salisbury J.L. (1994) Cloning of a cDNA encoding human centrin, an EF-hand protein of centrosomes and mitotic spindle poles. J. Cell Sci. 107, 9-16.
- Freed E., Lacey K.R., Huie P., Lyapina S.A., Deshaies R.J., Stearns T. und Jackson P.K. (1999) Components of an SCF ubiquitin ligase localize to the centrosome and regulate the centrosome duplication cycle. Gen. Dev. 13, 2242-2257.



- Fuhrmann M., Oertel W. und Hegemann P. (1999) A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 19, 353-361.
- Fulton C. und Dingle A.D. (1971) Basal bodies, but not centrioles, in *Naegleria*. *J. Cell Biol.* 51, 826-836.
- Gaffal K.P. (1988) The basal body-root complex of *Chlamydomonas reinhardtii* during mitosis. *Protoplasma* 143, 118-129.
- Geimer S. (1998) Der Basalapparat von *Spermatozopsis similis* (Chlorophyceae). Dissertation, Botanisches Institut, Universität zu Köln.
- Geimer S. und Melkonian M. (2004) The ultrastructure of the *Chlamydomonas reinhardtii* basal apparatus: identification of an early marker of radial asymmetry inherent in the basal body. *J. Cell Sci.* 117, 2663-2674.
- Geimer S. und Melkonian M. (2005) Centrin scaffold in *Chlamydomonas reinhardtii* revealed by immunoelectron microscopy. *Eukaryotic Cell* 4, 1253-1263.
- Geimer S., Lechtreck K.-F. und Melkonian M. (1998 a) A novel basal apparatus protein of 90 kD (Bap90) from the flagellate green alga *Spermatozopsis similis* is a component of the proximal plates and identifies the d-(dexter) surface of the basal body. *Protist* 149, 173-184.
- Geimer S., Clees J., Melkonian M. und Lechtreck K.-F. (1998 b) A novel 95-kD protein is located in a linker between cytoplasmic microtubules and basal bodies in a green flagellate and forms striated filaments in vitro. *J. Cell Biol.* 140, 1149-1158.
- Goodenough U.W. und St. Clair H.S. (1975) Bald-2: a mutation affecting the formation of doublet and triplet sets of microtubules in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 66, 480-491.
- Goodenough U.W. und Weiss R.L. (1978) Interrelationships between microtubules, a striated fiber and the gametic mating structure of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 76, 430-438.
- Görg A., Postel W. und Günther S. (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.
- Gorman D.S. und Levine R.P. (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1665-1669.

- Gould R.R. (1975) The basal bodies of *Chlamydomonas reinhardtii*. Formation from probasal bodies, isolation and partial characterization. *J. Cell Biol.* 65, 65-74.
- Gould R.R. und Borisy G.G. (1977) The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J. Cell Biol.* 73, 601-615.
- Grimes G.W. (1973) Morphological discontinuity of kinetosomes during the life cycle of *Oxytricha fallax*. *J. Cell Biol.* 57, 229-232.
- Harris E.H. (1989) The *Chlamydomonas* Sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Harris E.H. (2001) *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 52, 363-406.
- Herkner K. (2005) Posttranslationale Modifikationen der Tubuline im Basalapparat von *Spermatozopsis similis*. Dissertation, Botanisches Institut, Universität zu Köln.
- Hong H.K., Chakravarti A. und Takahashi J.S. (2004) The gene for soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein alpha is mutated in hydrocephaly with hop gait (*hyh*) mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1748-1753.
- Huang B., Watterson D.M., Lee V.D. und Schibler M.J. (1988) Purification and characterization of a basal body-associated Ca<sup>2+</sup>-binding protein. *J. Cell Biol.* 107, 121-131.
- Ikeda K., Brown J.A., Yagi T., Norrander J.M., Hirono M., Eccleston E., Kamiya R. und Linck R.W. (2003) Rib72, a conserved protein associated with the ribbon compartment of flagellar A-microtubules and potentially involved in the linkage between outer doublet microtubules. *J. Biol. Chem.* 278, 7725-7734.
- Ikura M. (1996) Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem. Sci.* 21, 14-17.
- Jarvik J.W. und Suhan J.P. (1991) The role of the flagellar transition region: inferences from the analysis of a *Chlamydomonas* mutant with defective transition region structures. *J. Cell Sci.* 99, 731-740.
- Johnson U.G. und Porter K.R. (1968) Fine structure of cell division in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 38, 403-425.
- Kallenbach R.J. (1985) Ultrastructural analysis of the initiation and development of cytasters in sea-urchin eggs. *J. Cell Sci.* 73, 261-278.

- Kalt A. und Schliwa M. (1993) Molecular components of the centrosome. *Trends Cell Biol.* 3, 118-127.
- Keller L.C., Romijn E.P., Zamora I., Yates III J.R. und Marshall W.F. (2005) Proteomic analysis of isolated *Chlamydomonas* centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes. *Curr. Biol.* 15, 1090-1098.
- Kellog D.R., Moritz M. und Alberts B.M. (1994) The centrosome and cellular organization. *Ann. Rev. Biochem.* 63, 639-674.
- Kilmartin J.V. (2003) Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* 162, 1211-1221.
- Kindle K.L. (1990) High frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1228-1232.
- Kindle K.L., Schnell R.A., Fernandez E. und Lefebvre P.A. (1989) Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J. Cell Biol.* 109, 2589-2601.
- King S.M. (2006) Axonemal protofilament ribbons, DM10 domains, and the link to juvenile myoclonic epilepsy. *Cell Motil. Cytoskel.* 63, 245-253.
- Koblenz B., Schoppmeier J., Grunow A. und Lehtreck K.-F. (2003) Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J. Cell Sci.* 116, 2635-2646.
- Kochanski R.S. und Borisy G.G. (1990) Mode of centriole duplication and distribution. *J. Cell Biol.* 110, 1599-1605.
- Komesli S., Tournier F., Paintrand M., Margolis R.L., Job D. und Bornens M. (1989) Mass isolation of calf thymus centrosomes: identification of a specific configuration. *J. Cell Biol.* 109, 2869-2878.
- Kozminski K.G., Johnson K.A., Forscher P. und Rosenbaum J.L. (1993) A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5519-5523.
- Kretsinger R.H. und Kockolds C.E. (1973) Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.* 248, 3313-3326.
- Kuchka M.R. und Jarvik J.W. (1982) Analysis of flagellar size control using a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* with a variable number of flagella. *J. Cell Biol.* 92, 170-175.

- Kuriyama R., Savereide P., Lefebvre P. und Dagupta D. (1990) The predicted amino acid sequence of a centrosphere protein in dividing sea urchin eggs is similar to elongation factor (EF-1 $\alpha$ ). *J. Cell Sci.* 95, 231-236.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambert A.-M. (1993) Microtubule-organizing centers in higher plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 116-122.
- Lang, N.J. (1963) An additional ultrastructural component of flagella. *J. Cell Biol.* 19, 631-634.
- Lange B.M.H. und Gull K. (1995) A molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle. *J. Cell Biol.* 130, 919-927.
- Lange B.M.H., Bachi A., Wilm M. und González C. (2000) Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates. *EMBO J.* 19, 1252-1262.
- Lechtreck K.-F. und Melkonian M. (1991) Striated microtubule-associated fibers: identification of assemblin, a novel 34-kD protein that forms paracrystals of 2-nm filaments in vitro. *J. Cell Biol.* 115, 705-716.
- Lechtreck K.-F., Frins S., Bilski J., Teltenkötter A., Weber K. und Melkonian M. (1996) The cruciated microtubule-associated fibers of the green alga *Dunaliella bioculata* consist of a 31 kDa SF-assemblin. *J. Cell Sci.* 109, 827-835.
- Lechtreck K.-F. und Silflow C.D. (1997) SF-assemblin in *Chlamydomonas*: sequence conservation and localization during the cell cycle. *Cell Motil. Cytoskel.* 36, 190-201.
- Lechtreck K.-F., Rostmann J. und Grunow A. (2002) Analysis of *Chlamydomonas* SF-assemblin by GFP-tagging and expression of antisense constructs. *J. Cell Sci.* 115, 1511-1522.
- Lee V.D. und Huang B. (1993) Molecular cloning and centrosomal localization of human caltractin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11039-11043.
- Levine R.P. (1960) Genetic control of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46, 972-977.
- Levy Y.Y., Lai E.Y., Remillard S.P., Heintzelmann M.B. und Fulton C. (1996) Centrin is a conserved protein that forms diverse associations with centrioles and MTOCs in *Naegleria* and other organisms. *Cell Motil. Cytoskel.* 33, 298-323.

- Li J.B., Gerdes J.M., Haycraft C.J., Fan Y., Teslovich T.M., May-Simera H., Li H., Blacque O.E., Li L., Leitch C.C., Lewis R.A., Green J.S., Parfrey P.S., Leroux M.R., Davidson W.S., Beales P.L., Guay-Woodford L.M., Yoder B.K., Stormo G.D., Katsanis N. und Dutcher S.K. (2004) Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the *BBS5* human disease gene. *Cell* 117, 541-552.
- Luck D.J.L. (1984) Genetic and biochemical dissection of the eukaryotic flagellum. *J. Cell Biol.* 98, 789-794.
- Lutz W., Lingle W.L., McCormick D., Greenwood T.M. und Salisbury J.L. (2001) Phosphorylation of centrin during the cell cycle and its role in centriole separation preceding centrosome duplication. *J. Biol. Chem.* 276, 20774-20780.
- Marshall W.F. (2001) Centrioles take center stage. *Curr. Biol.* 11, R487-R496.
- Marshall W.F. und Rosenbaum J.L. (2000) How centrioles work: lessons from green yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 119-125.
- Marshall W.F., Vucica Y. und Rosenbaum J.L. (2001) Kinetics and regulation of *de novo* centriole assembly: implications for the mechanism of centriole duplication. *Curr. Biol.* 11, 308-317.
- Matsuura K., Lefebvre P.A., Kamiya R. und Hirono M. (2004) Bld10p, a novel protein essential for basal body assembly in *Chlamydomonas*: localization to the cartwheel, the first ninefold symmetrical structure appearing during assembly. *J. Cell Biol.* 165, 663-671.
- Mazia D. (1987) The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. *Int. Rev. Cytol.* 100, 49-92.
- Meng T.C., Aley S.B., Svard G.S., Smith M.W., Huang B., Kim J. und Gillin F.D. (1996) Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79, 103-108.
- Melkonian M. (1978) Structure and significance of cruciate flagellar root systems in green algae: comparative investigations in species of *Chlorosarcinopsis* (Chlorosarcinales). *Pl. Syst. Evol.* 130, 265-292.
- Melkonian M. (1980) Ultrastructural aspects of basal body associated fibrous structures in green algae: a critical review. *BioSystems* 12, 85-104.

- Melkonian M., Beech P.L., Katsaros C. und Schulze D. (1992) Centrin-mediated cell motility in algae. In: Melkonian M. (Hrsg.) Algal Cell Motility. Chapman and Hall, New York, S. 179-221.
- Miki-Noumura T. (1977) Studies on the de novo formation of centrioles: aster formation in the activated eggs of sea urchin. *J. Cell Sci.* 24, 203-216.
- Mizukami I. und Gall J. (1966) Centriole replication II. Sperm formation in the fern, *Marsilea*, and the cycad, *Zamia*. *J. Cell Biol.* 29, 97-111.
- Mollet G., Salomon R., Gribouval O., Silbermann F., Bacq D., Landthaler G., Milford D., Nayir A., Rizzoni G., Antignac C. und Saunier S. (2002) The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin. *Nat. Genet.* 32, 300-305.
- Mollet G., Silbermann F., Delous M., Salomon R., Antignac C. und Saunier S. (2005) Characterization of the nephrocystin/nephrocystin-4 complex and subcellular localization of nephrocystin-4 to primary cilia and centrosomes. *Hum. Mol. Genet.* 14, 645-656.
- Moritz M., Braunfeld M.B., Fung J.C., Sedat J.W., Alberts B.M. und Agard D.A. (1995 a) Three-dimensional structural characterization of centrosomes from early *Drosophila* embryos. *J. Cell Biol.* 130, 1149-1159.
- Moritz M., Braunfeld J.W., Sedat B., Alberts B. und Agard D.A. (1995 b) Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378, 638-640.
- Neuhoff V., Philipp K., Zimmer H.-G. und Mesecke S. (1979) A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1657-1670.
- Nunn B.L., Shaffer S.A., Scherl A., Gallis B., Wu M., Miller S.I. und Goodlett D.R. (2006) Comparison of a *Salmonella typhimurium* proteome defined by shotgun proteomics directly on an LTQ-FT and by pre-fractionation on an LCQ-DUO. *Brief Funct. Genomic Proteomic* 5, 154-168.
- Oakley C.E. und 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.

- O'Connell K.F., Caron C., Kopish K.R., Hurd D.D., Kempfues K.J., Li Y. und White J.G. (2001) The *C. elegans* zyg-1 gene encodes a novel regulator of centrosome duplication with distinct maternal and paternal roles in the embryo. *Cell* 105, 547-558.
- Ogawa K. und Shimizu T. (1993) cDNA sequence for mouse caltractin. *Biochem. Biophys. Acta* 1216, 126-128.
- Ohta K., Toriyama M., Miyazaki M., Murofushi H., Hosoda S., Endo S. und Sakai H. (1990) The mitotic apparatus-associated 51-kDa protein from sea urchin eggs is a GTP-binding protein and is immunologically related to yeast polypeptide elongation factor 1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 265, 3240-3247.
- O'Toole E.T., Giddings T.H., McIntosh J.R. und Dutcher S.K. (2003) Three-dimensional organization of basal bodies from wild-type and  $\delta$ -tubulin deletion strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Biol. Cell* 14, 2999-3012.
- Ou Y., Zhang M. und Rattner J.B. (2004) The centrosome: The centriole-PCM coalition. *Cell Motil. Cytoskel.* 57, 1-7.
- Paintrand M., Moudjou M., Delacroix H. und Bornens M. (1992) Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J. Struc. Biol.* 108, 107-128.
- Patel-King R., Gorbatyuk O., Takebe S. und King S. (2004) Flagellar radial spokes contain a Ca<sup>2+</sup>-sensitive nucleoside diphosphate kinase. *Mol. Biol. Cell* 15, 3891-3902.
- Pazour G.J. (2004) Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: the ciliary hypothesis of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2528-2536.
- Pazour G.J., Agrin N., Leszyk J. und Witman G.B. (2005) Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J. Cell Biol.* 170, 103-113.
- Perdew G.H., Schaup H.W. und Selivonchick D.P. (1983) The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes. *Anal. Biochem.* 135, 453-455.
- Pfannenschmid F., Wimmer V.C., Rios R.-M., Geimer S., Kröckel U., Leiberer A., Haller K., Nemcová Y. und Mages W. (2003) *Chlamydomonas* DIP13 and human NA14: a new class of proteins associated with microtubule structures is involved in cell division. *J. Cell Sci.* 116, 1449-1462.

- Piperno G., Huang B. und Luck D.J. (1977) Two-dimensional analysis of flagellar proteins from wild-type and paralyzed mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1600-1604.
- Randolph-Anderson B.L., Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Johnson A.M., Dorthu M.-P. und Matagne R.F. (1993) Further characterization of the respiratory deficient *dum-1* mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. Mol. Gen. Genet. 236, 235-244.
- Rieder C.L. und Borisy G.G. (1982) The centrosome cycle in PtK2 cells: asymmetric distribution and structural changes in the pericentriolar material. Biol. Cell 44, 117-132.
- Riggleman B., Wieschaus E. und Schedl P. (1989) Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. Genes Dev. 3, 96-113.
- Righetti P.G., Tudor G. und Gianazza E. (1982) Effect of 2-mercaptoethanol on pH gradients in isoelectric focusing. J. Biochem. Biophys. Methods 6, 219-227.
- Ringo D.L. (1967) Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in *Chlamydomonas*. J. Cell Biol. 33, 543-571.
- Romio L., Fry A.M., Winyard P.J.D., Malcolm S., Woolf A.S. und Feather S.A. (2004) OFD1 is a centrosomal/basal body protein expressed during mesenchymal-epithelial transition in human nephrogenesis. J. Am. Soc. Nephrol. 15, 2556-2568.
- Rosenbaum J.L., Cole D.G. und Diener D.R. (1999) Intraflagellar transport: the eyes have it. J. Cell Biol. 144, 385-388.
- Ruiz-Binder N.E., Geimer S. und Melkonian M. (2002) In vivo localization of centrin in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Cell Motil. Cytoskel. 52, 43-55.
- Salisbury J.L. (2003) Centrosomes: Coiled-coils organize the cell center. Curr. Biol. 13, R88-R90.
- Salisbury J.L., Baron A., Surek B. und Melkonian M. (1984) Striated flagellar roots: isolation and partial characterization of a Calcium-modulated contractile organelle. J. Cell Biol. 99, 962-970.
- Salisbury J.L., Baron A.T. und Sanders M.A. (1988) The centrin-based cytoskeleton of *Chlamydomonas reinhardtii*: distribution in interphase and mitotic cells. J. Cell Biol. 107, 635-641.



- Salisbury J.L., Whitehead C.M., Lingle W.L. und Barrett S.L. (1999) Centrosomes and cancer. *Biol. Cell* 91, 451-560.
- Sanders M.A. und Salisbury J.L. (1989) Centrin-mediated microtubule severing during flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 108, 1751-1760.
- Schroda M. (2006) RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. *Curr. Genet.* 49, 69-84.
- Schulze D., Robenek H., McFadden G.I. und Melkonian M. (1987) Immunolocalization of a  $Ca^{2+}$ -modulated contractile protein in the flagellar apparatus of green algae: the nucleus-basal body connector. *Eur. J. Cell Biol.* 45, 51-61.
- Silflow C.D., Liu B., LaVoie M., Richardson E.A. und Palevitz B.A. (1999)  $\gamma$ -tubulin in *Chlamydomonas*: characterization of the gene and localization of the gene product in cells. *Cell Motil. Cytoskel.* 42, 285-297.
- Silflow C.D., LaVoie M., Tam L.-W., Tousey S., Sanders M., Wu W.-C., Borodovsky M. und Lefebvre P.A. (2001) The vfl1 protein in *Chlamydomonas* localizes in a rotationally asymmetric pattern at the distal ends of the basal bodies. *J. Cell Biol.* 153, 63-74.
- Snell W.J., Dentler W.L., Haimo L.T., Binder L.I. und Rosenbaum J.L. (1974) Assembly of chick brain tubulin onto isolated basal bodies of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science* 185, 357-359.
- Steffen W. und Linck R.W. (1988) Evidence for tektins in centrioles and axonemal microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2643-2647.
- Steinkötter J. (1997) Centrin und centrinbindende Proteine in Grünalgen. Inaugural-Dissertation, Botanisches Institut, Universität zu Köln.
- Stephens R.E. und Lemieux N.A. (1998) Tektins as structural determinants in basal bodies. *Cell Motil. Cytoskel.* 40, 379-392.
- Sueoka N. (1960) Mitotic replication of desoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46, 83-91.
- Szollosi D., Calarco P. und Donahue R.P. (1972) Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 11, 521-541.
- Taillon B.E., Adler S.A., Suhan J.P. und Jarvik J.W. (1992) Mutational Analysis of centrin: an EF-hand protein associated with three distinct contractile fibers in the basal body apparatus of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 119, 1613-1624.

- Ueno H., Gonda K., Takeda T. und Numata O. (2003) Identification of elongation factor-1 $\alpha$  as a Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-binding protein in *Tetrahymena* cilia. *Cell Motil. Cytoskel.* 55, 51-60.
- Vorobjev I.A. und Chentsov Y.S. (1982) Centrioles in the cell cycle. I. Epithelial cells. *J. Cell Biol.* 98, 938-949.
- Washburn M.P., Wolters D. und Yates III J.R. (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnol.* 19, 242-247.
- Weber K., Geisler N., Plessmann U., Bremerich A., Lehtreck K.-F. und Melkonian M. (1993) SF-assemblin, the structural protein of the 2-nm filaments from striated microtubule associated fibers of algal flagellar roots, forms a segmented coiled coil. *J. Cell Biol.* 121, 837-845.
- Winey M. und Byers B. (1992) Spindle pole body of *Saccharomyces cerevisiae*: a model for genetic analysis of the centrosome cycle. In: Kalnins (Hrsg.) *The centrosome*. Academic Press, San Diego, S. 197-218.
- Witman G.B., Carlson K., Berliner J. und Rosenbaum J.L. (1972) *Chlamydomonas* flagella. I. Isolation and electrophoretic analysis of microtubules, matrix, membranes and mastigonemes. *J. Cell Biol.* 54, 507-539.
- Wright R.L., Chojnacki B. und Jarvik J.W. (1983) Abnormal basal-body number, location and orientation in a striated fiber-defective mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 96, 1697-1707.
- Wright R.L., Salisbury J. und Jarvik J.W. (1985) A nucleus-basal body connector in *Chlamydomonas reinhardtii* that may function in basal body localization or segregation. *J. Cell Biol.* 101, 1903-1912.

## 7 ANHANG

### 7.1 Sequenzen der verwendeten Primer

Die Sequenzen der Primer sind jeweils in 5' → 3'-Richtung dargestellt. Generell steht „for“ für einen „forward“ und „rev“ für einen „reverse“ Primer.

#### Sequenzierprimer

T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Sp6	CATTTAGGTGACACTATAG
petBlue up	TCATAACGTCCCGCGAAA
petBlue down	GTAAATTGCTAACGCAGTCA

#### Primer, die zum Schließen der genomischen Sequenzlücke verwendet wurden

Gap1_for	GCAGATCTCAATCGGCAAGGAC
Gap1_rev	CCCTCATTCCAATCCACCGTG
G1_innen_for	GGAGGTCATGCTGCGGGAG
G1_innen_rev	GCTTCACCTGCGTCAGCTCC

#### Primer, die bei der sequenzspezifischen Erststrangsynthese der cDNA verwendet wurden

C_270036_rev	GGCAGCGTGCATTCATCAGG
C_1560001_rev	CCTGTA CT TCTGCCTGACTGCT

#### Primer, die zur Gewinnung der partiellen cDNAs verwendet wurden

27_E4_for	TCGTAGCGTAGACCACATGC
27_E7_rev	TCTCCAGAAGCTTGGACTGC
31_E1_for	ACTACCTCACCCGCCTGAC
31_E6_rev	CTGTCCTGCACCACGATGTC
90_E3/4_for	AGTGCTCAAAAAGGCTCTGG
90_E9_rev	TCGAAGCAAGTCAACCTCGT
156_E1_for	GGACACTCTTGCAACCACAA
156_E5_rev	AGCAGCTCAGCCTCATAGC

### Primer, mit denen Restriktionsschnittstellen eingefügt wurden

Die Schnittstellen für die jeweiligen Enzyme (NotI bzw. EcoRV) sind unterstrichen. Die beiden Nukleotide (T und A) vor den Schnittstellen wurden eingefügt, um den Restriktionsverdau zu erleichtern.

27_EcoRV_for	TAG <u>ATATCT</u> CGTAGCGTAGACCACATGC
27_NotI_rev	TAGCGGCCG <u>CCTCC</u> AGAAGCTTGGACTGC
31_EcoRV_for	TAGATATC <u>CTACCTC</u> ACCCGCCTGAC
31_NotI_rev	TAGCGGCCG <u>CGTCCTG</u> CACCACGATGTC
90_EcoRV_for	TAGATATCAGTGCTCAAAAAGGCTCTGG
90_NotI_rev	TAGCGGCCG <u>GCTCGA</u> AAGCAAGTCAACCTCGT
156_EcoRV_for	TAGATATC <u>GGACACT</u> CTTGCAACCACAA
156_NotI_rev	TAGCGGCCG <u>CCAGCTC</u> AGCCTCATAGCGG

## 7.2 Liste der identifizierten Genmodelle

Die nachfolgende Tabelle enthält sämtliche in den beiden massenspektrometrischen Verfahren identifizierten Genmodelle. Die Nummern der Genmodelle wurden der Version 2.0 der JGI-Datenbank entnommen. Die Zahlen in Klammern entsprechen der Anzahl der gefundenen Peptide. In der letzten Spalte ist vermerkt, ob das jeweilige Genmodell auch von Keller et al. (2005) identifiziert wurde. Hierbei ist in Klammern vermerkt, in welche Liste die Modelle bei Keller et al. (2005) eingeordnet wurden. Ein einfaches „+“ steht für Proteine aus dem „Supplemental Table 2“, d.h. für Basalkörperproteine, die nach Subtraktion der beiden Kontrollfraktionen in der „peak basal body fraction“ gefunden wurden. Ein „co“ hinter dem „+“ bezieht sich ebenfalls auf Modelle aus dieser Liste. Allerdings wurden sie unter Kontaminationen eingeordnet. Hierzu zählt z.B. auch Kandidat 20 (EEF1). Ein „S3“ in Klammern bedeutet, dass diese Proteine bei Keller et al. (2005) im „Supplemental Table 3“ enthalten sind. Hier finden sich die Proteine, die in den Kontrollfraktionen gemessen wurden.

**Tabelle 3: Übersicht über sämtliche in den beiden massenspektrometrischen Verfahren identifizierten Genmodelle**

Genmodell	Annotation	1D-Gel-Ansatz	MudPIT-Ansatz	Keller et al. (2005)
152425	Keine Annotation	—	+ (1)	—
152443	Keine Annotation	—	+ (2)	—
152444	40s ribosomales Protein S7	—	+ (1)	—
152450	EF1A2	—	+ (7)	+
152495	Keine Annotation	+ (1)	—	—
152527	Keine Annotation	—	+ (1)	+
152576	Keine Annotation	—	+ (1)	—
152719	SF-Assemblin	+ (4)	+ (1)	+
152727	Hypothetisches 60 kDa-Protein	+ (1)	—	—
152730	$\alpha$ -Glucan-Dikinase R1	—	+ (1)	—
152773	Histon H4	+ (1)	+ (2)	—
152775	Histon H3	+ (1)	+ (1)	—
152804	Histon H2A	—	+ (1)	—
152833	RNA-binde Region RNP-1?	—	+ (3)	—
152834	Keine Annotation	—	+ (2)	—
152995	Cytochrome b6-F-Komplex Untereinheit pet0	—	+ (2)	—
153074	Mitochondriale Oxoglutarate-Dehydrogenase (E2 Untereinheit)	—	+ (1)	+ (S3)
153097	Valyl-tRNA-Synthetase	—	+ (1)	—
153173	D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	—	+ (2)	+ (co)
153214	Hypothetisches Protein	—	+ (1)	+ (S3)
153343	Pyruvate-Phosphat-Dikinase PPK2	+ (1)	—	—
153344	ABC-Transporter (MRP-Familie)	—	+ (1)	—
153416	Keine Annotation	—	+ (1)	—
153605	Acetyl-CoA-Carboxylase	—	+ (1)	+ (co)
153659	EF-Hand-Protein, POC15	—	+ (5)	+
153672	Keine Annotation	—	+ (1)	—
153689	Keine Annotation	+ (1)	—	—
153712	Keine Annotation	—	+ (1)	—
153746	Keine Annotation	+ (1)	—	—
153794	LhcbM1	—	+ (1)	+ (S3)
153819	Acetolactat-Synthase	—	+ (1)	+ (co)
153836	Keine Annotation	+ (1)	—	—
153956	ABC-Transporter, Lipid-Exporter	+ (1)	—	—
153977	Dihydroliipoamid-Acetyltransferase DLAT2	—	+ (1)	+ (co)
154002	LhcbM5	—	+ (1)	+ (S3)
154028	Keine Annotation	—	+ (1)	—
154121	Keine Annotation	—	+ (1)	—
154182	Keine Annotation	—	+ (1)	—
154251	Mastigonemen-Protein MST1	—	+ (3)	—
154263	RNA-binde Protein?	—	+ (1)	—
154344	Keine Annotation	+ (1)	—	—
154346	Keine Annotation	+ (1)	—	—
154347	Transaldolase	—	+ (1)	—
154440	Putativer pre-mRNA Splicing Faktor	+ (1)	—	—
154441	Histon 2A	—	+ (1)	—
154445	FAP220	+ (1)	—	—
154447	Keine Annotation	+ (1)	—	—
154545	Mitochondriales QCR1	—	+ (2)	—
154594	Putatives MinE homolog	—	+ (1)	—
154633	Blaulichtrezeptor, Phototropin PHOT	+ (1)	+ (1)	—

Genmodell	Annotation	1D-Gel-Ansatz	MudPIT-Ansatz	Keller et al. (2005)
154654	S-Adenosyl-L-Homocystin-Hydrolase SAH1	—	+ (1)	—
154863	IDA5, Actin	+ (2)	+ (1)	—
154877	3'5'-zyklische-Nukleotid-Phosphodiesterase PDE4 $\alpha$	—	+ (1)	—
154911	TUA1, TUA2, $\alpha$ -Tubulin	+ (5)	+ (8)	+
154957	Keine Annotation	+ (1)	—	—
154962	Pyruvat-Format-Lyase	—	+ (3)	+ (co)
155017	Chloroplast „oxygen-evolving enhancer“ Protein PSBQ	—	+ (1)	+ (co)
155023	HSP70 $\alpha$ , in Geißelproteom	—	+ (1)	—
155096	Keine Annotation	—	+ (2)	—
155111	Keine Annotation	+ (1)	—	—
155392	Keine Annotation	—	+ (1)	—
155433	Lhca5	—	+ (1)	+ (S3)
155447	Vorderer Teil des Modells: Aldo/Keto-Reduktase?	—	+ (1)	—
155499	Putatives pre-rRNA Processing-Protein	—	+ (1)	—
155535	Keine Annotation	—	+ (1)	—
155578	Keine Annotation, Domäne: Proteinkinase	+ (1)	—	—
155767	Keine Annotation	—	+ (1)	—
155784	Keine Annotation	+ (1)	—	—
155786	LHC-Protein	—	+ (2)	+ (S3)
155808	Centrin3-Homolog, POC6	—	+ (1)	+
155828	Keine Annotation	—	+ (1)	—
155831	Keine Annotation	—	+ (1)	—
155881	Keine Annotation	—	+ (1)	—
156049	Putative Histon-Deacetylase	—	+ (1)	—
156157	Plastidäre Phosphoglycerat-Kinase PGK	—	+ (2)	—
156177	VFL2 (Centrin)	+ (5)	+ (2)	+
156231	Chaperon, Hsp100 Familie, ClpB1	—	+ (1)	—
156349	Glutamyl-tRNA-Synthetase	—	+ (1)	—
156421	<b>Kandidat 156</b> , BUG23	+ (7)	+ (2)	+
156487	Keine Annotation	+ (1)	—	—
156499	Keine Annotation	+ (1)	—	—
156517	Keine Annotation	—	+ (1)	—
156524	Keine Annotation	+ (1)	—	—
156527	Keine Annotation, Domäne: Tetrahydrofolat-Dehydrogenase	+ (1)	—	—
156543	Acyl-CoA-Synthetase	—	+ (1)	—
156598	„P-Loop“-Protein, in FABB, POC2	—	+ (2)	+
156602	Keine Annotation	—	+ (1)	—
156619	Keine Annotation	—	+ (1)	—
156639	Hinterer Teil des Modells: DNA-binde Protein	—	+ (2)	—
156678	Keine Annotation	+ (1)	—	—
156685	Keine Annotation	—	+ (1)	—
156687	„low CO2 inducible“-Protein (Lci 5)	—	+ (4)	—
156702	Keine Annotation	—	+ (1)	—
156716	Keine Annotation	+ (1)	—	—
156763	Keine Annotation	—	+ (1)	—
156772	Keine Annotation	+ (1)	—	—
156802	DEAD/DEAH Box Helikase?	—	+ (1)	—
156816	Keine Annotation	+ (1)	—	—

Genmodell	Annotation	1D-Gel-Ansatz	MudPIT-Ansatz	Keller et al. (2005)
156860	Ähnlichkeit mit Polyubiquitin	—	+ (1)	—
156901	Chloroplast Teilungsprotein FTSH	—	+ (2)	+ (S3)
156907	„coiled coil“-Protein	—	+ (1)	+
156971	RNA-binde Protein?	—	+ (1)	—
157019	Keine Annotation	+ (1)	—	—
157067	Keine Annotation	—	+ (1)	—
157079	Keine Annotation	—	+ (1)	—
157125	„coiled coil“-Protein	—	+ (2)	+
157179	„reversibly glycosylated polypeptide“	—	+ (1)	—
157184	Glucose-Methanol-Choline-Oxidoreduktase	—	+ (1)	—
157188	Ferredoxin-abhängige Glutamat- Synthase CRFG3	—	+ (1)	—
157237	Putativer mitochondrialer Elongationsfaktor Ts	—	+ (1)	—
157239	Acetyl-CoA-Carboxylase	—	+ (1)	+ (co)
157306	Ähnlichkeit mit SufD („FeS assembly protein“)	—	+ (1)	—
157318	Enolase ENO	—	+ (1)	—
157357	Keine Annotation, Domäne: Aldo/Keto-Reduktase	—	+ (1)	—
157396	Elongationsfaktor EFG2	—	+ (2)	+
157410	Keine Annotation	—	+ (1)	—
157551	Keine Annotation, bei blastp: Nephrocystin mit dabei	—	+ (1)	—
157568	FAP33	+ (1)	—	—
157613	„hypothetical prot splicing factor-like“?	—	+ (1)	—
157697	ARLC2 „similar to ADP-ribosylation factor like protein“	—	+ (3)	—
157754	Keine Annotation	—	+ (1)	+
157786	FAP223, Ca-abhängige Proteinkinase	+ (1)	—	+
157801	OFD1, BUG11	—	+ (3)	+
157931	Keine Annotation	—	+ (1)	—
157979	„coiled coil“-Protein	+ (1)	+ (3)	—
158089	Keine Annotation	—	+ (1)	—
158139	Putative L-Ascorbate-Peroxidase	—	+ (1)	—
158210	TUB1, TUB2 $\beta$ -Tubulin (das „fehlerhafte Modell“)	+ (8)	+ (4)	+
158275	Geranylgeranyl-Reduktase	—	+ (2)	—
158429	Keine Annotation	+ (1)	—	—
158548	PSAF	—	+ (1)	+ (S3)
158876	Chloroplast-Protein cp29	—	+ (1)	+ (S3)
158951	Keine Annotation	+ (1)	—	—
158996	Keine Annotation	+ (1)	—	—
159050	Stärkesynthase	—	+ (3)	+ (S3)
159055	Keine Annotation	v (1)	—	—
159070	Zellteilungsprotein FtsH Protease	—	+ (1)	—
159072	Keine Annotation	—	+ (1)	—
159084	Keine Annotation	+ (1)	—	—
159128	Keine Annotation	—	+ (1)	—
159137	Keine Annotation	—	+ (1)	—
159177	Keine Annotation	+ (1)	—	—
159232	Keine Annotation	+ (1)	—	—
159234	Keine Annotation	—	+ (1)	+
159247	Keine Annotation	—	+ (1)	—

Genmodell	Annotation	1D-Gel-Ansatz	MudPIT-Ansatz	Keller et al. (2005)
159281	FLA14, ODA-LC8 „outer dynein arm light chain 8”	+ (1)	—	—
159289	METE, Met-Synthase („upregulated during gametic activation”)	—	+ (1)	+ (co)
159298	3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase	—	+ (1)	—
159318	Carbonische Anhydrase ( $\beta$ -Typ)	—	+ (2)	+ (co)
159358	LhcbM3	—	+ (1)	+ (S3)
159414	Keine Annotation	+ (1)	—	—
159428	Keine Annotation	+ (1)	—	—
159467	Histon-Acetyltransferase	+ (1)	—	—
159541	Vps53 (Golgi-Sorting-Komplex)	+ (1)	—	—
159547	EEF1, <b>Kandidat 20</b>	+ (9)	+ (3)	+ (co)
159550	Keine Annotation	—	+ (1)	—
159654	Keine Annotation	—	+ (1)	—
159774	Keine Annotation	—	+ (1)	—
159910	Keine Annotation	+ (1)	—	—
159932	„coiled coil”-Protein	+ (2)	+ (3)	+
160016	Keine Annotation	—	+ (1)	—
160046	Mitochondriales Porin	—	+ (5)	+ (S3)
160047	Chloroplast Mg-Chelatase	—	+ (1)	—
160108	Kinase?	—	+ (1)	—
160199	Keine Annotation	—	+ (1)	—
160204	Keine Annotation	+ (1)	—	—
160207	keine Annotation, keine ESTs, Luecken	+ (1)	—	—
160423	Keine Annotation	—	+ (1)	—
160435	„coiled coil”-Protein	—	+ (1)	—
160457	„guanine nucleotide exchange factor”	+ (1)	—	—
160472	Putative DNA-Methyltransferase	+ (1)	—	—
160684	Putatives ATP-Synthase assoziiertes Protein	—	+ (1)	—
161192	Keine Annotation, Domäne: Proteinkinase	+ (1)	—	—
161447	Keine Annotation	—	+ (1)	—
161462	Keine Annotation	+ (1)	—	—
161521	Keine Annotation	—	+ (1)	—
161539	NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase NUO6	—	+ (1)	—
161552	„IAR1 InvA related kinesin”	+ (1)	—	—
161560	„L-rich repeat”, Ribonukleaseinhibitor?	—	+ (1)	—
161565	Pyruvat-Phosphat-Dikinase PPK1	—	+ (1)	—
161615	Keine Annotation	—	+ (1)	—
161667	Keine Annotation	—	+ (1)	—
161702	Photosystem-II Stabilitätsfaktor HCF136	—	+ (1)	+ (co)
161716	„coiled coil”-Protein, <b>Kandidat 27</b> , BUG27	+ (5)	+ (3)	+
161727	Keine Annotation	—	+ (5)	—
161741	Putative Map-Kinase-Phosphatase MKP2	+ (1)	—	—
161941	Keine Annotation	+ (1)	—	—
161978	Keine Annotation	+ (1)	—	—
161994	Mitochondriales Porin	—	+ (3)	+ (S3)
162024	EF-Hand-Protein	+ (1)	—	—
162069	GAP3-Enzym	—	+ (2)	+ (co)
162152	Keine Annotation	+ (1)	—	—
162219	Putativer mitochondrialer Substrat-Carrier MSCP1	—	+ (1)	—
162238	Keine Annotation	+ (1)	—	—
162245	Putative Glycolat-Dehydrogenase GDH	—	+ (1)	—
162325	Keine Annotation	—	+ (1)	—



Genmodell	Annotation	1D-Gel-Ansatz	MudPIT-Ansatz	Keller et al. (2005)
162352	Ähnlichkeit zu <i>S. similis</i> BAp95	—	+ (2)	+
162355	Keine Annotation	+ (1)	—	—
162433	$\alpha$ -Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase	+ (1)	+ (1)	+ (co)
162471	40S ribosomales Protein S3	—	+ (1)	+
162499	POC1, im menschlichen Centrosom	—	+ (3)	+
162522	keine Annotation	+ (1)	—	—
162836	Ribosomales Protein PSRP-1	—	+ (2)	—
162861	Keine Annotation	—	+ (5)	—
162993	Keine Annotation	+ (2)	+ (4)	—
162995	Hypothetisches <i>Arabidopsis</i> -Protein, <b>Kandidat 31</b>	+ (7)	+ (13)	+
163156	30s ribosomales Protein S2	—	+ (3)	+ (co)
163162	Peptidylprolyl-Isomerase (Cyclophilin)	—	+ (2)	+
163166	COP1, Opsin	—	+ (1)	+ (S3)
163172	Plastidärer Elongationsfaktor EF-Tu	—	+ (6)	—
163208	Putative Superoxid-Dismutase	—	+ (1)	—
163219	Keine Annotation	+ (1)	—	—
163302	Keine Annotation	+ (1)	—	—
163303	Keine Annotation	—	+ (1)	—
163304	Keine Annotation	—	+ (1)	—
163380	Keine Annotation	+ (1)	+ (1)	—
163399	Keine Annotation	—	+ (1)	—
163494	30s ribosomales Protein	—	+ (1)	+ (co)
163535	„protein containing YDG/SRA domain (SETi?)“	+ (1)	—	—
163597	Ähnlichkeit zu menschlichem centrosomalem Protein CEP290, POC3	—	+ (1)	+
163629	Ähnlichkeit zu SFI1 (5 „Sfi-repeats“), POC4	+ (2)	—	+
163650	Plastidäre Phosphoglycolate- Phosphatase PGP1	+ (1)	—	—
163675	Keine Annotation	—	+ (1)	—
163830	Keine Annotation	+ (1)	—	—
163855	Untereinheit 6 der mitochondrialen F0F1-ATP-Synthase	—	+ (1)	—
163903	Keine Annotation	—	+ (1)	—
163905	Keine Annotation	—	+ (1)	—
163979	Keine Annotation	—	+ (1)	—
163996	Keine Annotation	—	+ (1)	—
164057	Keine Annotation	+ (1)	—	—
164060	Keine Annotation	+ (1)	—	—
164131	Keine Annotation	+ (1)	—	—
164144	Keine Annotation	—	+ (1)	—
164150	Phosphatase?	—	+ (1)	—
164164	Ähnlichkeit mit Sterol-C24-Methyltransferase SMT1	—	+ (1)	—
164207	ATP-Synthase ( $\beta$ -Kette)	—	+ (2)	—
164225	40s ribosomales Protein S2	+ (1)	—	—
164298	SKS-C Proteinkinase	—	+ (1)	—
164314	40s ribosomales Protein S27	—	+ (1)	—
164333	NPHP4, Nephrocystin, POC10	—	+ (2)	+
164500	RNA-binde Region RNP-1	—	+ (1)	—
164517	POC11, im menschlichen Centrosom	—	+ (1)	+

Genmodell	Annotation	1D-Gel-Ansatz	MudPIT-Ansatz	Keller et al. (2005)
164538	VAMP-assoziiertes Protein (Inositol-Metabolismus)	—	+ (1)	—
164593	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase	—	+ (1)	+ (co)
164632	Keine Annotation	+ (1)	—	—
164685	Keine Annotation	+ (1)	—	—
164747	Genmodell verbindet 2 Gene	—	+ (2)	—
164828	FAP176	—	+ (1)	—
164935	Putativer Transporter für kleine Moleküle	+ (1)	—	—
164980	Keine Annotation	+ (1)	—	+
165045	Helikase	—	+ (1)	—
165072	Fructose-Bisphosphat-Aldolase 1, ALD1	—	+ (1)	—
165098	Keine Annotation	+ (1)	—	—
165284	Keine Annotation	—	+ (1)	—
165323	Keine Annotation	—	+ (1)	—
165365	MAP-Kinase-Phosphatase MKP5	+ (1)	—	—
165429	Hypothetisches Protein	—	+ (1)	+ (S3)
165453	Keine Annotation	—	+ (1)	—
165610	vorne: Kinesin-Motor-Region	—	+ (1)	—
165670	Keine Annotation	—	+ (1)	—
165672	$\alpha\beta$ -Hydrolase?	+ (1)	—	—
165696	Mitochondriales Protein?	—	+ (1)	+ (co)
165733	Phosphoglucose-Isomerase PGI	—	+ (1)	—
165783	Keine Annotation	—	+ (1)	—
165784	Keine Annotation	—	+ (1)	—
165813	Keine Annotation	+ (1)	—	—
165897	Keine Annotation	—	+ (1)	—
165904	40s ribosomales Protein S14	—	+ (1)	—
165942	Keine Annotation	+ (1)	—	—
165953	Keine Annotation	—	+ (2)	—
166035	Fructose-1,6-Bisphosphatase FBP	+ (1)	+ (1)	+ (co)
166038	Keine Annotation	—	+ (1)	—
166112	Keine Annotation	+ (1)	—	—
166116	Keine Annotation	+ (1)	—	—
166149	Rubisco-Aktivase	—	+ (8)	+ (co)
166162	Keine Annotation	+ (1)	—	—
166173	„low CO <sub>2</sub> inducible protein“	—	+ (1)	—
166259	Keine Annotation	—	+ (1)	—
166267	Elongationsfaktor EF3	—	+ (6)	+
166376	Ähnlichkeit mit RIB72, POC9	—	+ (1)	+
166391	50s ribosomales Protein L15	—	+ (3)	—
166471	Translationsinitiationsfaktor 3	—	+ (2)	—
166523	Keine Annotation	—	+ (1)	—
166572	NADP-Malat-Dehydrogenase	—	+ (2)	—
166596	Keine Annotation	—	+ (1)	—
166671	Keine Annotation	—	+ (2)	—
166710	Mitochondriales Carrier-Protein	+ (1)	—	—
166746	Keine Annotation	—	+ (1)	—
166787	Keine Annotation, entfernte Ähnlichkeit mit p210 ( <i>S. similis</i> )	—	+ (1)	—
166825	Keine Annotation	—	+ (1)	—
166828	Keine Annotation	—	+ (1)	—
166949	Cytosolische Malatdehydrogenase MDH1	—	+ (1)	+ (S3)
166952	Keine Annotation	+ (1)	—	—
167161	FAP113	—	+ (2)	+ (S3)

Genmodell	Annotation	1D-Gel-Ansatz	MudPIT-Ansatz	Keller et al. (2005)
167421	Keine Annotation	—	+ (1)	—
167486	BIP1 ER-Chaperone, HSP 70	—	+ (1)	+
167490	FAP24	—	+ (1)	+ (S3)
167527	Keine Annotation	—	+ (1)	—
167609	Keine Annotation	—	+ (3)	—
167647	Keine Annotation	—	+ (1)	—
167662	Plastidärer Elongationsfaktor G, EF-G	—	+ (1)	+ (co)
167674	Keine Annotation	—	+ (2)	+
167708	Aspartat/Ornithin Carbamoyltransferase	—	+ (1)	—
167712	FABB-Protein, im menschlichen Centrosom, POC18	—	+ (1)	+
167714	Putative Transketolase	—	+ (2)	—
167752	Putative Pyruvat-Kinase PYK2	—	+ (2)	—
167878	Keine Annotation	+ (1)	—	—
168094	Keine Annotation	+ (1)	—	—
168188	Keine Annotation	—	+ (1)	—
168249	Ribosomales Protein L31	—	+ (2)	—
168252	Keine Annotation	+ (1)	—	—
168291	Keine Annotation	—	+ (1)	—
168375	Putativer Elongationsfaktor	—	+ (1)	—
168391	RBCS2	+ (3)	+ (1)	+ (co)
168407	Keine Annotation	+ (3)	+ (1)	—
168412	„vesicle coat complex“ COPI, $\beta$ -subunit	+ (1)	—	—
168432	BLD10	—	+ (3)	+
168520	„flagellar outer dynein arm heavy chain $\alpha$ “, ODA11	—	+ (1)	—
168551	Malatsynthase	+ (5)	+ (5)	+
168557	Keine Annotation	—	+ (1)	—
168596	Domäne: Cytochrome P450	—	+ (1)	—
168621	Ähnlichkeit mit Thioredoxin	+ (1)	—	—
168649	Domäne: TPR Repeat	—	+ (1)	—
168675	RIB72	+ (1)	+ (1)	+
168773	Keine Annotation	—	+ (1)	—
168781	Keine Annotation	—	+ (1)	—
168825	Keine Annotation	+ (1)	—	—
168848	Ketolsäure-Reductoisomerase	—	+ (1)	+ (co)
168850	Mitochondrialer Substrat-Carrier?	—	+ (1)	—
168881	Tektin	—	+ (4)	+
168906	FAP63, BUG20	—	+ (1)	+
168946	30s ribosomales Protein S5	—	+ (1)	—
168999	Keine Annotation	—	+ (2)	+
169099	FAP243, „coiled coil“-Protein	+ (1)	—	—
169132	Putatives ATP-Synthase assoziiertes Protein	—	+ (1)	+ (co)
169174	Ribosomales Protein L6	—	+ (2)	—
169222	Keine Annotation	+ (1)	—	—
169285	Keine Annotation	+ (1)	—	—
169301	HSP90A, Centrosomen-assoziiert	—	+ (1)	+
169308	FAP21, BUG15	—	+ (1)	+
169434	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase?	—	+ (1)	—
169497	Keine Annotation	—	+ (1)	—
169511	Plastidäres HSP70b, lichtinduzierbar	—	+ (1)	—
169537	Keine Annotation	—	+ (1)	—
169545	Glykosidhydrolase?	—	+ (1)	—
169604	„coiled coil“-Protein	+ (1)	—	—

Genmodell	Annotation	1D-Gel-Ansatz	MudPIT-Ansatz	Keller et al. (2005)
169817	Acyl-CoA-Synthetase	—	+ (1)	—
169891	Plastidäre omega-6-FAD-Fettsäure-Desaturase DES6	—	+ (1)	—
169905	TUB, $\beta$ -Tubulin: das „richtige“ Modell	+ (6)	+ (7)	—
169922	Keine Annotation	+ (1)	—	—
169959	Keine Annotation	—	+ (1)	—
170071	Ca-abhängige Proteinkinase	—	+ (1)	—
170075	„coiled coil“-Protein	—	+ (4)	+
170079	ABC-Transporter, ATPase	—	+ (1)	—
170090	Domäne: ATP/GTP bindender P-loop	—	+ (1)	—
170095	FAP125	+ (1)	—	—
170135	DNA-gerichtete RNA-Polymerase III, RPOIII2	—	+ (1)	—
170161	Putative Plasmamembra Proton-ATPase, PMA2	—	+ (1)	+ (S3)
170169	Keine Annotation	+ (1)	—	—
170284	Glutaminamidotransferase?	—	+ (1)	—
170384	Keine Annotation	+ (1)	—	—
170524	Alkohol-Dehydrogenase/Acetaldehyd-Dehydrogenase ADH1	—	+ (1)	—
170615	FAP138	—	+ (1)	—
170639	Keine Annotation	—	+ (5)	—
170726	„low CO <sub>2</sub> inducible protein“, LCIB	—	+ (2)	—
170820	PSPB	—	+ (2)	+ (S3)
170832	Keine Annotation	—	+ (1)	—
170883	Plastidäres ribosomales Protein L3, PRPL3	—	+ (1)	—
170891	Keine Annotation	+ (1)	—	—
170900	„coiled coil“-Protein	+ (1)	+ (5)	+
170940	Keine Annotation	—	+ (1)	—
170957	Aspartat-Aminotransferase, AAT1	—	+ (1)	+ (co)
171028	Keine Annotation	—	+ (1)	—
171094	Anorganische H <sup>+</sup> -Pyrophosphatase	—	+ (2)	+ (S3)
171096	PF16	—	+ (1)	—
171207	„coiled coil“-Protein, <b>Kandidat 90</b>	+ (7)	+ (3)	+
171299	Glycinderhydrogenase	—	+ (1)	—
171316	Cytosolische Pyruvatkinase, PYK1	—	+ (1)	—
171342	Putative Cystathion- $\beta$ -Lyase	—	+ (1)	—
171634	Zellteilungsprotein? Septin-Familie	—	+ (1)	—
171679	FAP78	—	+ (1)	—
171717	Glykosidhydrolase?	—	+ (1)	—
171744	Ser-Hydroxymethyltransferase SHMT1, „high light inducible“	—	+ (1)	—
171790	Keine Annotation	+ (1)	—	—
171862	Mitochondriale Acetyl-CoA-Synthetase	—	+ (1)	+ (co)
171923	Keine Annotation	+ (1)	—	—
171993	Putative Phosphatidylinositol-4-Kinase	+ (1)	—	+ (S3)
172086	Keine Annotation	—	+ (1)	—
172090	PAF1, 20s Proteasome- $\beta$ Untereinheit F	—	+ (1)	—
172100	Keine Annotation	—	+ (1)	—
172122	Keine Annotation	—	+ (1)	—
172124	Keine Annotation	+ (2)	—	—
172127	„low CO <sub>2</sub> inducible protein“, LCIC	—	+ (1)	—
172130	Keine Annotation	+ (1)	—	—

## 8 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

### Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Schematische Darstellung des Basalapparates von <i>C. reinhardtii</i> .....	9
Abb. 2: Längs- und Querschnitte durch einen Basalkörper von <i>C. reinhardtii</i> .....	11
Abb. 3: „Whole mount“-Aufnahmen von gereinigten Basalapparaten .....	58
Abb. 4: Ultradünnschnitte von gereinigten Basalapparaten .....	59
Abb. 5: SDS-PAGE von gereinigten Basalapparaten .....	61
Abb. 6: Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) isolierter Basalapparate .....	71
Abb. 7: Genmodell von Kandidat 20 .....	73
Abb. 8: Genmodell von Kandidat 27 .....	74
Abb. 9: Genmodell von Kandidat 31 .....	75
Abb. 10: Genmodell von Kandidat 90 .....	76
Abb. 11: Genmodell von Kandidat 156 .....	76
Abb. 12: PCR zum Schließen der 1. genomischen Sequenzlücke von Kandidat 20.....	77
Abb. 13: Vergleich der Sequenz der ersten genomischen Lücke von Kandidat 20 mit den Datenbank-Einträgen aus Versionen 2.0 und 3.0 .....	79
Abb. 14: PCR zur Gewinnung einer partiellen cDNA für Kandidat 27.....	81
Abb. 15: Exon-Intron-Struktur von Kandidat 27 .....	82
Abb. 16: PCR zur Gewinnung einer partiellen cDNA für Kandidat 31.....	83
Abb. 17: PCR zur Gewinnung einer partiellen cDNA für Kandidat 90.....	84
Abb. 18: Exon-Intron-Struktur von Kandidat 90 .....	85
Abb. 19: PCR zur Gewinnung einer partiellen cDNA für Kandidat 156.....	86
Abb. 20: Reinigung des rekombinanten Proteins von Kandidat 27 .....	89
Abb. 21: Reinigung des rekombinanten Proteins von Kandidat 31 .....	90
Abb. 22: Reinigung des rekombinanten Proteins von Kandidat 90 .....	91
Abb. 23: Reinigung des rekombinanten Proteins von Kandidat 156 .....	92
Abb. 24: Western-Blot-Analyse der Antikörper anti-27/1 und anti-27/2 mit rekombinanten Bakterien (Abb. a) und Basalapparaten von <i>C. reinhardtii</i> (Abb. b) .....	94
Abb. 25: Western-Blot-Analyse der Immunsereen anti-31/1 und anti-31/2 mit rekombinanten Bakterien (Abb. a) und Basalapparaten von <i>C. reinhardtii</i> (Abb. b) ..	95

Abb. 26: Western-Blot-Analyse der Antikörper anti-90/1 und anti-90/2 mit rekombinanten Bakterien (Abb. a) und Basalapparaten von <i>C. reinhardtii</i> (Abb. b).....	97
Abb. 27: Western-Blot-Analyse der Antikörper anti-156/1 und anti-156/2 mit rekombinanten Bakterien (Abb. a) und Basalapparaten von <i>C. reinhardtii</i> (Abb. b)..	98
Abb. 28: Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten von <i>C. reinhardtii</i> mit den Immunsereen zu Kandidat 31 .....	100
Abb. 29: Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten von <i>C. reinhardtii</i> mit dem polyklonalen Antikörper anti-90/2.....	101
Abb. 30: Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten von <i>C. reinhardtii</i> mit dem polyklonalen Antikörper anti-156/2.....	102
Abb. 31: Vergleich der identifizierten Genmodelle.....	110

## Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über die Genmodelle, die mit 2 oder mehr Peptiden im 1D-Gel-Ansatz gefunden wurden.....	63
Tabelle 2: Übersicht über bereits bekannte und neue, potentielle Basalkörperproteine, die mit dem MudPIT-Verfahren identifiziert wurden.....	68
Tabelle 3: Übersicht über sämtliche in den beiden massenspektrometrischen Verfahren identifizierten Genmodelle.....	134

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

∅	Durchmesser
Å	Angström
A	Ampere
A. dest.	Millipore Super-Q Wasser, zweimal destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
BSA	„bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin
BUG	„basal-body proteins with upregulated genes“ (s. Keller et al., 2005)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
cDNA	von mRNA kopierte DNA
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
C-Terminus/C-terminal	Carboxyterminus
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Einstein
EDTA (Titriplex III)	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop

ESI	„Electrospray ionization“
EST	„expressed sequence tag“
et al.	<i>et alii</i> (und weitere)
FAP	„flagellar associated protein“; Proteine des Geißelproteoms von <i>C. reinhardtii</i> (Pazour et al., 2005)
g	Gramm
(x) g	bei Zentrifugationen: Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m x s}^{-2}$ )
GFP	„green fluorescent protein“
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“
Hrsg.	Herausgeber
HSM	„high salt concentration medium“
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFT	„intraflagellar transport“
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktosid
JGI	„Joint Genome Institute“
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	bei Chemikalien: Mol, molar (nach Zusammenhang)
MALDI	„Matrix assisted laser desorption ionization“
max	maximal
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mind.	mindestens
mRNA	„messenger“ RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mt	„mating type“
MT	Mikrotubulus bzw. Mikrotubuli
MT-Puffer	Mikrotubulistabilisierender Puffer



MTOC	„microtubule organizing center“, mikrotubuliorganisierendes Zentrum
MudPIT	„multidimensional protein identification technology“
MWCO	„molecular weight cut-off“
N	bei Chemikalien: Normalität, Normal
NBBC	„nucleus-basal body connector“, verbindendes Element zwischen Zellkern und Basalkörper(n), syn. System-II-Fibrille
NBT	4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCM	Pericentrioläres Material
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
pH	potential hydrogenii
pI	Isoelektrischer Punkt; pH-Wert eines Proteins, bei dem seine Nettoladung Null beträgt
PKD	„polycystic kidney disease“
POC	„proteome of centriole“ (s. Keller et al., 2005)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACE	„Rapid amplification of cDNA ends“
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAF	„striated microtubule associated fiber“
SPB	„spindle pole body“, Spindelpolkörper
syn.	synonym
TAP	Tris-Acetat-Phosphat(-Medium)
TCA	Trichloressigsäure
TCP	„total cellular protein“

TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T <sub>m</sub>	„melting temperature“
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	„unit“, Einheit der Enzymaktivität in $\mu\text{mol}/\text{min}$
u.a.	unter anderem
upm	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
UTR	„untranslated region“
V	Volt
vfl	„variable flagella number“, Mutanten, die eine variable Anzahl von Geißeln haben
% (v/v)	% („volume/volume“), Volumenprozent
% (w/v)	% („weight/volume“), volumenbezogenes Gewichtsprozent
W	Watt
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-Indolphosphat-Toluidinsalz
z.B.	zum Beispiel

**vor Maßeinheiten:**

m	milli ( $\times 10^{-3}$ )
$\mu$	mikro ( $\times 10^{-6}$ )
n	nano ( $\times 10^{-9}$ )
p	pico ( $\times 10^{-12}$ )

Die DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit den standardisierten Abkürzungen des genetischen Codes bzw. den Abkürzungen der Aminosäuren mit einem Buchstaben dargestellt.



## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. M. Melkonian für die Stellung des methodisch vielseitigen Themas, für seine Betreuung und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau S. Hawat (Universität Jena) und Herrn Dr. D. Wolters (Ruhr-Universität Bochum) danke ich für die massenspektrometrischen Analysen.

Herrn Dr. S. Geimer danke ich für die Einführung in die Elektronenmikroskopie und für hilfreiche Ratschläge.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und das nette Miteinander. Herr Dr. B. Becker gab zahlreiche Tipps für den Laboralltag. Dr. K. Herkner machte mich mit der Technik der 2D-Gele vertraut. Nicole Feja und Eva Schnell waren immer zur Stelle, wenn im Labor mal etwas fehlte. Petra Dehring unterstützte mich bei den Ernten und der Reinigung der IgGs. Siegfried Werth half bei der Zusammenstellung der EM-Phototafeln. Die Werkstatt war stets hilfsbereit, wenn es etwas zu bauen oder reparieren galt. Sabina Wodniok danke ich für gemütliche Abende und ihre Freundschaft.

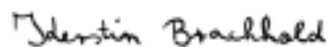
Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für stundenlange Telefonate, für Aufmunterungspost, für gute „Schreibtage“ in Stuttgart und dafür, dass sie immer für mich da sind.



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. M. Melkonian betreut worden.

Köln, den 13.12.2006



(Kerstin Brachhold)







