

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 Englische Zusammenfassung/Abstract	2
2 EINLEITUNG	4
2.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als Modellorganismus	4
2.2 Centrosomen und Centriolen	5
2.3 Der Basalapparat von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8
2.4 Fragestellung der Arbeit	16
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Material	18
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
3.2 Algenstämme und Kulturbedingungen	26
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
3.3 Präparative Methoden	29
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
3.4 Proteinbiochemische Methoden	32
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
3.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE).....	37
3.5.1 Probenvorbereitung	37
3.5.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	38
3.5.3 Zweite Dimension: Vertikale SDS-PAGE	39
3.6 Elektronenmikroskopie	40
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
3.7 Antikörper	42
3.7.1 Gewinnung der Antigene.....	42
3.7.2 Immunisierungen.....	42
3.8 Immunologische Methoden	42
3.8.1 Western-Blot	42
3.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten.....	43
3.9 Massenspektrometrische Protein-Analytik.....	44
3.9.1 Elektronenspray-Ionisation mit Tandem-MS Technik (ESI-MS/MS)	44
3.9.2 MudPIT („multidimensional protein identification technology“).....	44
3.10 Molekularbiologische Methoden.....	45
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
3.11 Verwendete Datenbanken und Computerprogramme.....	54
4 ERGEBNISSE	56
4.1 Isolierung von Basalapparaten aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.....	56
4.2. Ansätze zur Identifikation der Proteine des Basalapparates.....	60
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
4.3 Nähere Charakterisierung von 5 potentiellen Basalapparat-Proteinen	77
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
5 DISKUSSION	103
5.1 Isolierung von Basalapparaten aus <i>C. reinhardtii</i>.....	103
5.2 Proteinzusammensetzung isolierter Basalapparate.....	105
5.3 Ansätze zur Identifikation der Proteine des Basalapparates.....	106
5.4 Vergleich der Genmodelle, die bei den unterschiedlichen Ansätzen gefunden wurden	108
5.5 Charakterisierung von 5 neuen, potentiellen Basalapparatproteinen	115
5.6 Ausblick	117

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