

***Silencing* von Transgenen und Transposons
durch DNA-Methylierung bei *Volvox***

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN –
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
PATRICK BABINGER
aus Regensburg
April 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 28.01.2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Rüdiger Schmitt

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

Erstgutachter: Prof. Dr. Rüdiger Schmitt

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Hegemann

Dritter Prüfer: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL	9
2.1 Organismen und Plasmide	9
2.2 Verwendete Oligonukleotide	12
2.3 Herkunft von Chemikalien und Enzymen	16
2.4 Medien	18
2.5 Puffer und Lösungen	19
3. METHODEN	23
3.1 Kultivierung der Organismen	23
3.1.1 <i>Escherichia coli</i> -Kulturen	23
3.1.2 <i>V. carteri</i> -Kulturen	23
3.1.3 Kultivierung des Phagen λ	24
3.1.3.1 Anzucht der Wirtsbakterien	24
3.1.3.2 Phagenplattierung für Titerbestimmung und Genbank- <i>Screening</i>	24
3.1.3.3 Herstellung von Plattenlysaten.....	24
3.2 Isolierung, Reinigung und Auftrennung von DNA	25
3.2.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> durch Alkalische Lyse.....	25
3.2.2 Isolierung von reiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab.....	25
3.2.4 Isolierung von DNA aus <i>V. carteri</i>	26
3.2.5 Isolierung von DNA aus <i>V. carteri</i> im kleinen Maßstab.....	26
3.2.6 Isolierung von RNA aus <i>V. carteri</i>	27
3.2.7 Isolierung von DNA aus dem Phagen λ	27
3.2.8 Isolierung des Plasmids pBK-CMV aus λ ZAP Express	28
3.2.9 Trennung von Nukleinsäuren unterschiedlicher Dichte durch Dichte- gradientenzentrifugation.....	28
3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	30
3.2.11 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA	30
3.2.12 Agarose-Gelelektrophorese von RNA	30
3.2.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	31

3.3 Enzymatische und chemische Modifizierung von DNA	31
3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	31
3.3.2 PCR-Amplifizierung von DNA und RNA	31
3.3.3 Enzymatische Hydrolyse von DNA in Nukleotide und deren radioaktive Markierung für die Dünnschicht-Chromatographie: ³² P-postlabeling.....	33
3.3.4 Bisulfit-Behandlung von DNA zur Detektion von 5-Methylecytosin im Sequenzkontext	35
3.3.4.1 Reaktion von DNA mit Bisulfit	36
3.3.4.2 PCR-Amplifikation des zu untersuchenden Abschnitts.....	37
3.3.4.3 Klonierung und Sequenzierung des PCR-Produkts	38
3.3.5 Methylierung von DNA mit SssI-Methyltransferase	38
3.4 Zweidimensionale Dünnschicht-Chromatographie von DNA-Präparationen	39
3.5 Sequenzanalyse und Sequenzbearbeitung	40
3.6 Transformation von <i>E. coli</i>	40
3.7 Transformation von <i>Volvox carteri</i>	41
3.8 Hybridisierung und Detektion von Nukleinsäuren	42
3.8.1 Übertragung von DNA aus Agarosegelen auf Nylon-Filter (<i>Southern Blot</i>).....	42
3.8.2 Direktes Aufbringen von DNA auf Nylon-Filter (<i>Dot Blot</i>).....	42
3.8.3 Übertragung von RNA aus Agarosegelen auf Nylon-Filter (<i>Northern Blot</i>).....	43
3.8.4 <i>Screening</i> von λ -Genbanken	43
3.8.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	43
3.8.6 Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen der Membranen.....	44
3.8.7 Nichtradioaktive Detektion von Nukleinsäuren.....	44
3.9 Autoradiographie	44
3.9.1 Autoradiographie mittels Röntgenfilm.....	44
3.9.2 Autoradiographie mittels PhosphorImager	45
3.10 Rückgewinnung von Plasmiden aus <i>Volvox</i>-Transformanten (<i>plasmid rescue</i>) ..	45
3.11 Tests von <i>Volvox</i>-Transformanten auf Arylsulfatase-Aktivität	46
3.11.1 Qualitativer Schnelltest	46
3.11.2 Quantitativer Test.....	46

4. ERGEBNISSE	47
4.1 Analyse von DNA-Modifikationen bei <i>Volvox</i>	47
4.1.1 Quantifizierung modifizierter Basen in DNAs verschiedener <i>Volvox</i> - Stämme.....	48
4.1.2 Quantifizierung von ^{5m} C und ^{6m} A in Kern- und Chloroplasten-DNA	50
4.1.3 Analyse von ^{5m} C und ^{6m} A in Gonidien-DNA	53
4.2 Charakterisierung des Gens <i>met1</i> für DNA-Methyltransferase von <i>V. carteri</i> ..	56
4.2.1 Gewinnung einer <i>met1</i> -Sonde mittels PCR.....	56
4.2.2 <i>Screening</i> einer genomischen und cDNA-Genbibliothek, Sequenzanalyse.....	58
4.2.3 Untersuchungen zur Expression und Funktion von Met1	64
4.3 Biologische Funktion der DNA-Methylierung bei <i>V. carteri</i>	66
4.3.1 <i>Silencing</i> von Transgenen	66
4.3.1.1 Molekulare Analysen des integrierten <i>C-ars</i> -Transgens: Concatemer- Bildung und Tandem-Integration	67
4.3.1.2 Reaktivierung eines stillen Transgens durch Methyltransferase- und Histondeacetylase-Hemmer	70
4.3.1.3 Korrelation von Transgen-Inaktivierung und CpG-Methylierung.....	72
4.3.1.4 Transformation von <i>V. carteri</i> mit <i>in vitro</i> -methylierter DNA.....	76
4.3.2 <i>Silencing</i> von Transposons durch CpG-Methylierung.....	78
4.3.2.1 Test auf Methylierung von endogenen Transposons mittels <i>Southern</i> - Analysen.....	78
4.3.2.2 Quantitative Analyse der CpG-Methylierungen von <i>Jordan-2</i> und <i>Osser</i> ..	81
4.3.2.3 Sequenzvariationen bei den Transposons <i>Jordan-2</i> und <i>Osser</i>	84
5. DISKUSSION	86
5.1 ^{5m}C und ^{6m}A in Kern-, Chloroplasten- und Gonidien-DNA von <i>V. carteri</i>	86
5.2 Das <i>met1</i>-Gen codiert für eine Erhaltungs-Methyltransferase	89
5.3 Korrelation von CpG-Methylierung mit dem <i>silencing</i> eines Transgens	93
5.4 <i>Volvox</i>-Transposons und CpG-Methylierung	96
5.5 Hat CpG-Methylierung eine genregulatorische Funktion bei <i>V. carteri</i>?	99
5.6 Ausblick	100
6. ZUSAMMENFASSUNG	102
7. LITERATURVERZEICHNIS	104
8. ANHANG	112

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetat
amp	Ampicillin
Ars	Arylsulfatase(gen)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>copy</i> DNA
ctDNA	Chloroplasten-DNA
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DDC	Diethyldithiocarbamylsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ETZ	Eppendorf-Tischzentrifuge
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Massenspektrometrie
ncDNA	nucleäre DNA
nt	Nukleotid(e)
OD _x	Optische Dichte bei x nm Wellenlänge
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
pfu	<i>plaque forming unit</i>
P _i	anorganisches Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
U	<i>unit(s)</i> (Aktivitätseinheit bei Enzymen)
ÜK	Übernachtkultur
ÜN	über Nacht

Upm	Umdrehungen pro min
ÜS	Überstand
NTR	Nicht-translatierte Region
UZ	Ultrazentrifuge
v/v	<i>volume per volume</i>
Vol.	Volumen
w/w	<i>weight per weight</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid
XSO ₄	5-Bromo-4-Chloro-3-indolylsulfat
^{6m} A	N6-Methyladenin
^{5m} C	5-Methylcytosin
^{5m} dC	5-Methyl-2'-desoxycytidin
^{6m} dA	N6-Methyl-2'-desoxyadenosin
^{5m} dCMP	5-Methyl-2'-desoxycytidin-5'-monophosphat
^{6m} dAMP	N6-Methyl-2'-desoxyadenosin-5'-monophosphat

1. Einleitung

Auch 50 Jahre nach der Aufklärung der Struktur der DNA durch Watson und Crick (1953) birgt die Steuerung komplexer Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse durch den „Bauplan des Lebens“ noch manches Rätsel. Die rapide Entwicklung gentechnischer Methoden seit den 80er Jahren erlaubte, wichtige Grundprinzipien der Genregulation und Zelldifferenzierung aufzuklären sowie die „zwischen den Zeilen“ der Nukleotidsequenz in Form methylierter Basen epigenetisch gespeicherte Information besser zu verstehen. Ermöglicht wurde dieser Erkenntnisgewinn nur durch die molekulargenetische Untersuchung geeigneter Modellorganismen.

Die grüne Kugelalge *Volvox carteri* mit ihren zwei Zelltypen eignet sich als transparentes und zugleich faszinierendes Modellobjekt für Studien von Differenzierungsvorgängen und epigenetischen Prozessen sowie deren Evolution. Schon August Weismann (1889) zog diese Alge als Beleg für seine Keimbahntheorie heran. Richard Starr (1969) etablierte *V. carteri* f. *nagariensis* als Modellsystem und beschrieb die Grundlagen seiner Entwicklungsbiologie. Ein *V. carteri* - Sphäroid besteht aus rund 2000 somatischen Zellen, die mit zwei Flagellen und einem Augenfleck große Ähnlichkeit zur einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* aufweisen, und 16 großen, potentiell unsterblichen reproduktiven Zellen, den Gonidien (Abb. 1). Mit einer vollständigen Arbeitsteilung zwischen diesen beiden Zelltypen steht *V. carteri* damit am Ende einer (wenn auch nicht linearen) Entwicklungsreihe in der Familie der *Volvocaceae* hin zur Vielzelligkeit, die ihren Ursprung vermutlich bei einem *Chlamydomonas*-ähnlichen Einzeller genommen hat (Schmitt et al., 1998).



Abb. 1. Adultes Sphäroid von *Volvox carteri* mit 16 großen, reproduktiven Zellen (Gonidien) im Inneren und ca. 2000 kleinen, somatischen Zellen mit Augenfleck und zwei Flagellen an der Oberfläche der Kugel (nach Stark, 1999).

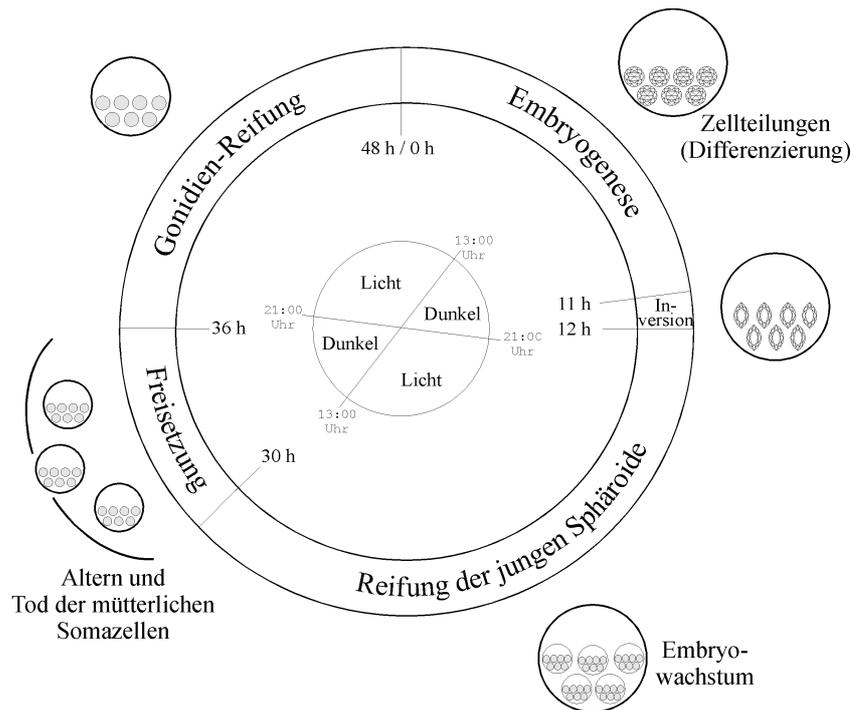


Abb. 2. Schematische Darstellung des vegetativen Lebenszyklus von *V. carteri* unter Laborbedingungen (nach Stark, 1999). Der Zyklus beginnt mit der ersten Zellteilung der Gonidien, durchläuft die Embryogenese (11-12 Teilungen/Inversion), die Reifung und Freisetzung der Tochttersphäroide und endet nach 48 h mit 16 reifen Gonidien.

Unter optimierten Laborbedingungen - einem 16:8 h Licht : Dunkel - Regime bei 29 °C - dauert der vegetative Lebenszyklus von *V. carteri* 48 Stunden (Abb. 2). Nach fünf symmetrischen Teilungen eines Gonidiums führt eine asymmetrische Teilung der anterioren Zellen zur Entstehung von 16 größeren Gonidien-Vorläufer-Zellen und 48 kleineren somatischen Vorläuferzellen. Die Gonidien teilen sich noch ein- bis zweimal asymmetrisch, während die somatischen Zellen fünf bis sechs weitere symmetrische Teilungen durchlaufen. Die zu diesem Zeitpunkt außen liegenden Gonidien gelangen durch den gastrulations-ähnlichen Vorgang der Inversion nach innen. Die jungen Sphäroide gewinnen nun durch Einlagerung extrazellulärer Matrix zwischen den Zellen an Größe. Schließlich öffnet sich die Mutterkugel durch partielle Proteolyse ihrer extrazellulären Matrix und entlässt die 16 Tochttersphäroide, die somatischen Zellen der maternalen Hülle treten schließlich unter Verlust der photosynthetischen Aktivität in eine Seneszenz- und Sterbephase ein (Kirk & Harper, 1986; Starr, 1969).

Durch die Entwicklung eines homologen Selektionssystems (Gruber et al., 1992), die Etablierung eines Transformationsverfahrens (Schiedlmeier et al., 1994) und die Einführung des *transposon tagging* (Miller et al., 1993) wurde *V. carteri* molekulargenetischen Untersuchungen zugänglich gemacht. Dies ermöglichte die Isolierung und Charakterisierung

der Differenzierungs-Schlüsselgene *glsA* (*gonidialess*) (Miller & Kirk, 1999) und *regA* (*somatic regenerator*) (Kirk et al., 1999; Stark et al., 2001; Stark & Schmitt, 2002).

Ein wiederholt bei *Volvox*-Transformanten beobachtetes Phänomen ist eine unzureichende oder völlig fehlende Expression eines eingeschleusten Transgens. Oft setzt die Abschwächung der Expression erst einige Zeit nach der Transformation ein und macht sich u.a. durch ein Absterben zuvor resistenter Transformanten im Selektionsmedium bemerkbar (Schiedlmeier et al., 1994). Dieser allgemein als *transgene silencing* bekannte Effekt, der auch bei der nah verwandten Alge *Chlamydomonas reinhardtii* auftritt, wird bei Pflanzen relativ häufig beobachtet und auf DNA-Methylierung zurückgeführt (Finnegan et al., 1998). Auch wenn beim *silencing* eines bei *C. reinhardtii* untersuchten Transgens ein RNA-Interferenz-Mechanismus hauptverantwortlich zu sein scheint (Wu-Scharf et al., 2000; Zhang et al., 2002), wurde auch in dieser Alge Cytosin-Methylierung in der Sequenz abgeschalteter Transgene gefunden (Blankenship & Kindle, 1992; Cerutti et al., 1997). Wie Vorarbeiten zeigen (Babinger, 1999), ist DNA-Methylierung auch an der Stilllegung eines Transgens in *V. carteri* beteiligt.

Die häufigsten in Pro- und Eukaryonten vorkommenden modifizierten Basen 5-Methylcytosin (^{5m}C) und N6-Methyladenin (^{6m}A) sind in Abb. 3 dargestellt (Adams, 1990). Die Modifikation von Basen ermöglicht es Organismen, über die reine Nukleotidsequenz der DNA hinausgehende Information flexibel zu speichern und auch an die Nachkommen weiterzugeben. Die biologische Funktion der DNA-Methylierung bei Prokaryonten wurde früh entdeckt (Arber & Dussoix, 1962) und ist im Detail untersucht. So können sich Bakterien Dank der auf DNA-Methylierung basierenden Restriktions-/Modifikations-Systeme effizient gegen die Etablierung fremder DNA, z.B. Phagen-DNA, schützen (Wilson & Murray, 1991). Auch bei der Reparatur von Fehlern in der DNA (*mismatch repair*) und bei der Initiation der bakteriellen Replikation spielt die Methylierung von Adenin im GATC-Sequenzmotiv bei Prokaryonten eine maßgebende Rolle als „Markierung“ (Adams, 1990).

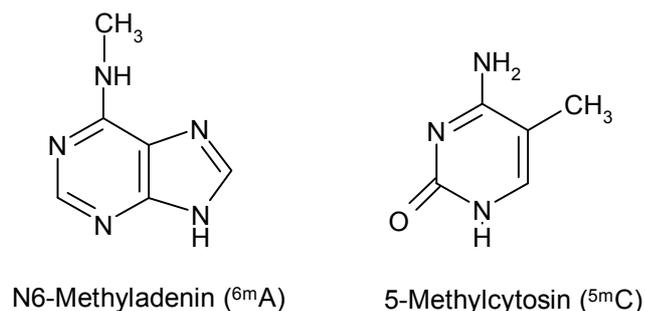


Abb. 3. Chemische Strukturen von N6-Methyladenin und 5-Methylcytosin.

Während an diesen bakteriellen Systemen ^{5m}C und ^{6m}A gleichermaßen beteiligt sind, spielt bei Eukaryonten ^{5m}C die dominierende Rolle. Abgesehen von einigen Einzellern, wie auch *C. reinhardtii* (Hattman et al., 1978), ist ^{6m}A bisher nur bei *Penicillium* (Rogers et al., 1986) und wenigen höheren Pflanzen, nämlich Mais (Pintor-Toro, 1987), *Arabidopsis thaliana* (Ashapkin et al., 2002) und Weizen (Fedoreyeva & Vanyushin, 2002) detektiert worden. Die biologische Funktion von ^{6m}A ist noch gänzlich unbekannt. Eine Beteiligung an DNA-Reparatursystemen (Rogers et al., 1986) oder auch bei der Genregulation (Ashapkin et al., 2002) wird vermutet.

Im Vertebraten-Genom tritt ^{5m}C ausschließlich in CpG-Dinukleotiden auf (Bestor, 2000), bei Pflanzen findet man C-Methylierung in CpG-, CpNpG- oder asymmetrischen Sequenzmotiven (Finnegan et al., 1998). Zumindest im Säuger-Genom sind CpG-Dinukleotide unterrepräsentiert und treten in der Regel nur in sogenannten „CpG-Inseln“, die oft in den 5' oder 3'-NTRs von Genen liegen (Gardiner-Garden & Frommer, 1987), gehäuft auf. Ursache für diese Begrenzung auf nicht-codierende Bereiche ist vermutlich das erhöhte Risiko von Punktmutationen durch die Desaminierung von ^{5m}C zu Thymin (Laird & Jaenisch, 1996). C-Methylierung innerhalb dieser CpG-Inseln (aber auch von isolierten CpG-Dinukleotiden) ist eng verknüpft mit der Regulation zahlreicher Gene. Bekannte Beispiele sind die Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms bei der Frau und das *genomic imprinting* (Ehrlich, 2003). Auch bei Pflanzen wurde eine direkte Genregulation durch C-Methylierung beobachtet, allerdings sind die Zusammenhänge weit weniger gut aufgeklärt als bei Vertebraten. So weisen z.B. *Arabidopsis*-Pflanzen, bei denen der Methylierungsgrad des Genoms durch 5-Azacytidin oder Methyltransferase-*Antisense*-Experimente reduziert wurde, eine verfrühte und verkümmerte Blütenbildung auf (Finnegan et al., 1998). Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei Weizen nach der Vernalisation (Kälteeinwirkung, die die Blütenbildung beschleunigt und im Winter verhindert) eine Demethylierung des Genoms eintritt (Sherman & Talbert, 2002). Die Zielgene dieser Regulation der Blütenbildung durch Demethylierung von C sind jedoch noch nicht bekannt.

Neben der Regulation von Genen im Zusammenhang mit Differenzierung und Entwicklung ist das *silencing* von Fremd-DNA, Transposons und Retroelementen die zweite wichtige Funktion der C-Methylierung bei Eukaryonten. Für diese unter anderem von Doerfler (1992) und Yoder et al. (1997) vorgeschlagene Hypothese wurden mittlerweile zahlreiche Beweise erbracht. Das *silencing* von Transgenen durch DNA-Methylierung wird vor allem in höheren Pflanzen häufig beobachtet (Finnegan et al., 1998). Transposons und Retroelemente machen

einen großen Teil von Eukaryonten-Genomen aus und bedürfen daher einer gezielten Ruhigstellung. So bestehen ca. 40 % des Säuger-genoms und ca. 50 % des Mais-Genoms aus Retroelementen (SanMiguel et al., 1996; Smit, 1999). Eine Reaktivierung von Transposons in Methyltransferase-defizienten Organismen wurde bei Tier (Walsh et al., 1998) und Pflanze (Miura et al., 2001) demonstriert. Die DNA-Methylierung hat bei Eukaryonten also essentiell lebensnotwendige Funktionen. Viele Methyltransferase – *knock-out* - Experimente mit Mäusen verliefen dementsprechend embryonal letal (Bestor, 2000). Defekte der *de novo*-Methyltransferase Dnmt3b (siehe unten) führen beim Menschen zum ICF-Syndrom (Immundefekt, Centromer-Instabilität, Faciale Dysmorphie). Mutationen des an CpG-methylierte DNA bindenden Proteins MeCP2 sind Ursache des Rett-Syndroms, einer Fehlentwicklung des Gehirns, die unter anderem mit Autismus und Verhaltensstörungen einhergeht (Shahbazian & Zoghbi, 2002).

Wie kann DNA-Methylierung zur Stilllegung von Genen und Transposons führen? Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre ließen eine enge Vernetzung von DNA-Methylierung und Chromatin-Kondensation erkennen. Schon seit längerem ist bekannt, dass Gene in dicht gepacktem Heterochromatin inaktiv sind. Ein erster Schritt zur dichteren Packung des Chromatins ist die Deacetylierung und Methylierung der Histone H3 und H4, was in einer festeren Bindung der Nukleosomen an die DNA und somit in einer schlechteren Zugänglichkeit der DNA für die Transkriptionsmaschinerie resultiert (Jenuwein, 2001). Das an CpG-methylierte DNA bindende Protein MeCP2 kann Histon-Deacetylasen rekrutieren und somit die Kondensierung des Chromatins einleiten (Razin, 1998). Umgekehrt können aber auch Histon-Methylasen DNA-Methyltransferasen in heterochromatische Regionen leiten und somit dort die DNA-Methylierung auslösen (Tamaru & Selker, 2001). Weitere Daten belegen, dass Histon-Acetylierung zur aktiven Demethylierung des betroffenen Genabschnitts führt (Cervoni & Szyf, 2001). Vermutlich sind auf diese Weise nahezu alle epigenetischen Modifikationen des Genoms miteinander verbunden (Robertson, 2002). Um eine „Ruhigstellung“ eines Genombereichs zu bewirken, reicht wahrscheinlich ein „Anstoß“ des *silencing*-Prozesses an einer beliebigen Stelle dieses Netzwerkes.

Die Erhaltung und Neueinführung der DNA-Methylierung erfordert verschiedene Methyltransferase-Klassen, deren Aufgabenteilung aber nicht absolut strikt ist (Bestor, 2000). Die eukaryontischen Methyltransferasen können in zumindest vier verschiedene Klassen eingeteilt werden, die Dnmt1/Met1-Klasse, die Dnmt2-Klasse, die CMT-Klasse und die Dnmt3/DRM-Klasse (Übersichten in Cao et al., 2000; Finnegan et al., 2000). Die Funktion

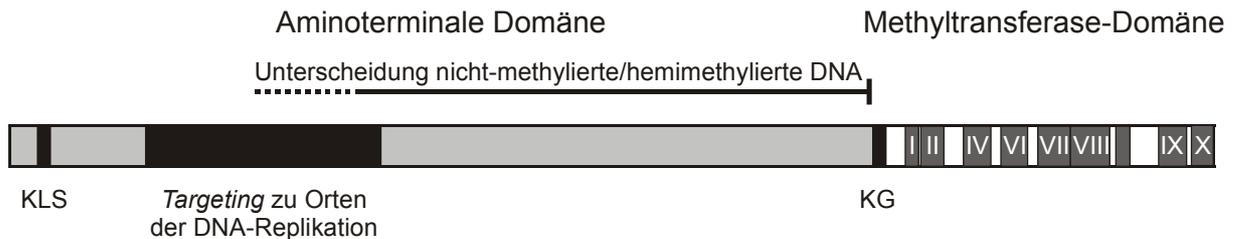


Abb. 4. Schematische Darstellung der funktionellen Domänen einer DNA-Methyltransferase der Dnmt1/Met1-Klasse. KLS, Kernlokalisationssequenz; KG, Lysin-Glycin-Wiederholung; I-X, hochkonservierte Motive (modifiziert nach Leonhardt et al., 1992)

der Enzyme der Dnmt1 (Säuger) / METI (*Arabidopsis*) - Klasse ist vor allem die Erhaltungs-Methylierung von CpG-Dinukleotiden. Ihr bevorzugtes Substrat ist hemimethylierte DNA, wie sie nach der DNA-Replikation in den Tochtersträngen vorliegt. Die Methyltransferase-Domäne, die bei allen Methyltransferase-Klassen ähnlich aufgebaut ist, ist in acht Motiven hochkonserviert zu bakteriellen Methyltransferasen, bei denen man zehn derartige Motive kennt (Abb. 4). Die Motive tragen wichtige Funktionen, wie die Bindung des Methyl-Donors SAM (Motive I, X), das aktive Zentrum (Motiv VI) und die Erkennung des zu methylierenden C in der Zielsequenz (Bereich zwischen den Motiven VIII und IX). Die bei Prokaryonten auftretenden Motive III und V fehlen bei Eukaryonten. Eine Lysin-Glycin-Wiederholungssequenz trennt die Methyltransferase-Domäne von der variablen N-terminalen Domäne. Diese trägt ein Kernlokalisationsignal, leitet das Enzym an die Orte der DNA-Replikation und unterscheidet zwischen hemi- und nicht-methylierter DNA (Leonhardt et al., 1992). In vielen Pflanzen gibt es mehrere, eng verwandte Vertreter der METI-Klasse.

Mitglieder der Dnmt2-Klasse, die man bisher vor allem bei Tieren gefunden hat, zeigen nur sehr schwache Methyltransferase-Aktivität. Ihre Funktion ist bisher unklar. Die Chromomethylasen (CMTs) repräsentieren eine Klasse, die bisher nur bei Pflanzen gefunden wurde. Sie weisen eine Chromodomäne zwischen den Motiven I und IV auf und sind hauptsächlich verantwortlich für die nur bei Pflanzen beobachtete CpNpG-Methylierung. Die Methyltransferasen Dnmt3 (Säuger) und DRM (*Arabidopsis*) wurden als *de novo* - Methyltransferasen charakterisiert. Bei Säugern gibt es zwei Varianten, Dnmt3a und Dnmt3b. Die DRM-Methyltransferasen weisen Homologie zu den Dnmt3-Enzymen auf, jedoch sind die hochkonservierten Motive in anderer Reihenfolge angeordnet (*domains rearranged methyltransferase*). Ihnen wird die Methylierung in CpNpG- und asymmetrischen Sequenzmotiven zugeordnet (Cao & Jacobsen, 2002a). Für die „asymmetrische“ DNA-Methylierung war immer eine *de novo* Methyltransferase propagiert worden, denn eine

Erhaltungsmethylierung von hemimethylierter DNA ist bei nicht-palindromischen Erkennungssequenz nicht möglich.

Zur gezielten Beeinflussung von Genaktivität mittels DNA-Methylierung ist auch eine gezielte Demethylierung zur Reaktivierung von Genen vonnöten. Zwei verschiedene Strategien bieten sich dafür an. DNA kann passiv demethyliert werden, indem die Erhaltungsmethylierung nach der DNA-Replikation blockiert wird (Finnegan et al., 1998). Oder es sorgen, wie bei Säugern bekannt, Demethylasen dafür, dass methylierte CpG-Motive aktiv demethyliert werden (Bhattacharya et al., 1999).

Unsere Vorarbeiten gaben deutliche Hinweise darauf, dass DNA-Methylierung bei *V. carteri* vor allem beim *silencing* von Transgenen eine zentrale Rolle spielt (Babinger, 1999). Diese Funktion sollte im Rahmen dieser Arbeit fundiert belegt werden. Daneben war aber auch von Interesse, ob Transposons und Retroelemente das natürliche Ziel von CpG-methylierungsbasiertem *silencing* sein könnten. Mehr als zehn verschiedene Vertreter „springender Gene“ sind bei *V. carteri* bekannt. Die *Jordan*-Familie (Miller et al., 1993) besteht aus mindestens fünf in wesentlichen Sequenzbereichen überlappenden Vertretern und zeigt die größte Ähnlichkeit zur *En/Spm*-Familie (Gierl, 1996). Keines dieser mobilen „klassischen“ Transposons enthält jedoch einen erkennbaren offenen Leserahmen für ein Transposase-Gen. Ein vermutetes „mobilisierendes Masterelement“, das die bekannten Vertreter in *trans* aktiviert, wurde bisher noch nicht gefunden. Die verschiedenen *Jordan*-Varianten liegen in 5-40 Kopien im Genom vor. *Jordan* ist das einzige Transposon, das bisher bei *Volvox* erfolgreich zum *transposon tagging* eingesetzt wurde.

Die Retrotransposons *Osser* (Lindauer et al., 1993), *Lusen* (Lindauer, 1993), *Rachel* (Lindauer, 1993) und *Lückenbüßer* (Köhl, 1997) gehören zur *Copia/Ty1*-Familie (Flavell et al., 1997). Von mehreren weiteren Elementen dieser Familie sind Teilsequenzen der Reversen Transkriptase bekannt (Lindauer et al., 1993). Abgesehen von einem Transpositionsereignis von *Lückenbüßer* sind all diese Retrotransposons im Labor offenbar inaktiv und nicht mobil. Ihre Kopienzahlen belaufen sich – soweit untersucht – auf 5-25. Erst vor kurzem wurde mit *kangaroo* ein hochmobiles Retrotransposon bei *V. carteri* beschrieben (Duncan et al., 2002). Es gehört zu einer erst neu erkannten Klasse von Retrotransposons, der DIRS1-Gruppe. Transkripte dieses Elements lassen sich nur im Zeitraum zwischen den Zellteilungen bis kurz nach der Inversion nachweisen, die restliche Zeit des vegetativen Lebenszyklus ist *kangaroo* stillgelegt. Es wird sich zeigen, ob *Kangaroo* das erst bekannte Retrotransposon ohne CpG-Methylierung ist.

Die Untersuchung einer Auswahl dieser Transposons von *Volvox* auf DNA-Methylierung, eine fundierter Nachweis des Zusammenhangs zwischen CpG-Methylierung und *transgene silencing*, sowie eine Aufklärung der enzymatischen Grundlagen der DNA-Methylierung standen im Vordergrund dieser Arbeit. Im einzelnen wurden folgende Arbeitsziele formuliert:

1. Aufbauend auf Vorarbeiten (Babinger, 1999) sollten Auftreten und Verbreitung modifizierter Basen in DNAs verschiedener *V. carteri*-Stämme und -Zelltypen sowie in Chloroplasten untersucht werden.
2. Die Verbindung zwischen CpG-Methylierung und dem *silencing* des *C-ars*-Transgens in der Transformante Hill 183 war quantitativ zu manifestieren.
3. Eine Auswahl von DNA- und Retro-Transposons von *V. carteri* sollte auf DNA-Methylierung und den Zusammenhang mit mobiler (In)Aktivität untersucht werden.
4. Das Gen der Erhaltungs-Methyltransferase von *V. carteri* sollte kloniert, sequenziert und charakterisiert werden.

2. Material

2.1 Organismen und Plasmide

In Tab. 1 sind die verwendeten Organismen, die Tab. 2 die eingesetzten Plasmide mit Markern und Referenzen zusammengefasst.

Tab. 1. Verwendete Organismen

Stamm	Marker ¹	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>		
DH10B	F ⁻ <i>araD139 Δ(ara, leu)7697 ΔlacX74 galU galK mcrA Δ(mrr⁻ hsdMRS⁻ mcrBC) mcrA rpsL decR 380ΔlacZ ΔM15 endA1 nupG recA1</i>	Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc.
JM110	<i>rpsL (Str^r) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F['] traD36 proAB lacI^qZΔM15]</i>	Yanisch-Perron et al. (1985)
NM538	F ⁻ <i>gal⁻ lacY metB hsdR supF</i>	Frischauf et al. (1983)
XL1-Blue MRF [']	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F['] proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]^c</i>	Stratagene
XL0LR	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 lac[F[']proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]Su⁻λ^r</i>	Stratagene
<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>		
HK10	weiblicher J-Stamm	Starr (1969)
Poona	weiblicher I-Stamm	Adams et al. (1990)
153-48	HK10-Derivat, <i>nitA, chl^R</i>	Kirk (1990)
153-68	HK10-Derivat, <i>regA, glsA, nitA, chl^R</i>	Kirk (1990)
153-81	HK10-Derivat, <i>regA, nitA, chl^R</i>	Kirk (1990)
Hill 181 Hill 183	153-81 – Transformanten mit pVcNR1, plK2	Kobl (1993) Kobl (1998)
PB_M I1 bis PB_M I40	153-68 – Transformanten mit pVcNR15, plK2 (nicht methyliert)	diese Arbeit
PB_M II1 bis PB_M II30	153-68 – Transformanten mit pVcNR15, plK2 (methyliert)	diese Arbeit

¹ Genetische Nomenklatur nach Bachmann (1990)

Tab. 2. Verwendete Plasmide, Phagen und Genbanken

Name	Marker ²	Herkunft/Referenz
Plasmide		
pSK ⁻	<i>bla</i> , <i>lacZ'</i>	Stratagene
pGEM TM -T	<i>bla</i> , <i>lacZ'</i>	Promega
pBK-CMV	Neo ^r /Kan ^r , <i>lacZ</i>	Stratagene
pIK2	<i>bla</i> , <i>Volvox</i> - β 2 Tubulinpromotor, <i>C. reinhardtii</i> Arylsulfatase-Gen	Kobl (1993)
pVcNR1	<i>bla</i> , <i>Volvox nitA</i> (genomisch)	Gruber et al. (1992)
pVcNR15	<i>bla</i> , <i>Volvox nitA</i> (cDNA + Promotor + Intron 1)	Gruber et al. (1996)
pHSR250aphVIII	<i>bla</i> , <i>Volvox hsp70/rbcS3</i> -Fusions-Promotor (HSR), <i>aphVIII</i> (<i>Streptomyces rimosus</i>)	T. Jakobiak (pers. Mitteilung)
pVMTas	<i>bla</i> , <i>antisense-met1</i> , <i>Volvox</i> - β 2-Tubulin-Promotor in pSK ⁻	Cakstina (2001)
pVMTas-nc	<i>bla</i> , <i>Volvox</i> - β 2-Tubulin-Promotor in pSK ⁻	Cakstina (2001)
pDnmt_oex_HSR	<i>bla</i> , <i>hsp70/rbcS3</i> -Fusions-Promotor (HSR), Methyltransferase-Domäne von <i>met1</i> in pSK ⁻	diese Arbeit
pDnmt_oex_Tub	<i>bla</i> , <i>Volvox</i> - β 2-Tubulin-Promotor, Methyltransferase-Domäne von <i>met1</i> in pSK ⁻	diese Arbeit
pmet5/8	<i>bla</i> , 530 bp-PCR-Fragment von <i>Volvox met1</i> in pGEM TM -T	diese Arbeit
pmet_c2-4	Neo ^r /Kan ^r , 3' Bereich der <i>met1</i> -cDNA aus λ cmt2 in pBK-CMV	Cakstina (2001)
pmet_c4-5	Neo ^r /Kan ^r , 3' Bereich der <i>met1</i> -cDNA aus λ cmt4 in pBK-CMV	Cakstina (2001)
pmet_empt1/2	<i>bla</i> , <i>met1</i> -cDNA-Fragment empt1/2 in pGEM TM -T	Cakstina (2001)
pmet_empt5/10	<i>bla</i> , <i>met1</i> -cDNA-Fragment empt5/10 in pGEM TM -T	diese Arbeit
pmet_empt9/6	<i>bla</i> , <i>met1</i> -cDNA-Fragment empt9/6 in pGEM TM -T	diese Arbeit
pmet_empt7/8	<i>bla</i> , <i>met1</i> -cDNA-Fragment empt7/8 in pGEM TM -T	diese Arbeit
pmet_g1-2	<i>bla</i> , <i>NotI</i> -Subklon aus λ gmt7 in pSK ⁻	Cakstina (2001), vgl. Abb. 14

pmet_g2-4	<i>bla</i> , <i>NotI</i> -Subklon aus λ gmt7 in pSK ⁻	Cakstina (2001), vgl. Abb. 14
pmet_g4-5	<i>bla</i> , <i>NotI</i> -Subklon aus λ gmt11 in pSK ⁻	Cakstina (2001), vgl. Abb. 14
pmet_g6-4	<i>bla</i> , <i>NotI</i> -Subklon aus λ gmt11 in pSK ⁻	Cakstina (2001), vgl. Abb. 14
pmet_g7-1	<i>bla</i> , <i>NotI</i> -Subklon aus λ gmt11 in pSK ⁻	Cakstina (2001), vgl. Abb. 14
pmet_g7-15	<i>bla</i> , <i>NotI</i> -Subklon aus λ gmt4 in pSK ⁻	diese Arbeit, vgl. Abb. 14
pmet_g24-1	<i>bla</i> , <i>NotI/SalI</i> -Subklon aus λ gmt24 in pSK ⁻	diese Arbeit, vgl. Abb. 14
pmet_g24-3	<i>bla</i> , <i>NotI</i> -Subklon aus λ gmt24 in pSK ⁻	diese Arbeit, vgl. Abb. 14
pmet_g27-5	<i>bla</i> , <i>NotI</i> -Subklon aus λ gmt27 in pSK ⁻	diese Arbeit, vgl. Abb. 14
pmet_g29-8	<i>bla</i> , <i>NotI</i> -Subklon aus λ gmt29 in pSK ⁻	diese Arbeit, vgl. Abb. 14
pmet_g29-9	<i>bla</i> , <i>NotI</i> -Subklon aus λ gmt29 in pSK ⁻	diese Arbeit, vgl. Abb. 14
pmet_g29-10	<i>bla</i> , <i>NotI/SalI</i> -Subklon aus λ gmt29 in pSK ⁻	diese Arbeit, vgl. Abb. 14
RG3	<i>bla</i> , cDNA-Fragment eines <i>Lusen</i> -ähnlichen Retrotransposons in pGEM TM -T	Amann (2002)
RG8	<i>bla</i> , cDNA-Fragment eines <i>Osser</i> -ähnlichen Retrotransposons in pGEM TM -T	Amann (2002)
pJD27	<i>bla</i> , <i>C. reinhardtii ars1</i> – Gen (cDNA)	J. Davies, pers. Mitteilung
pJD54	<i>bla</i> , <i>C. reinhardtii ars2</i> – Gen (genomisch)	Ohresser et al. (1997)
Phagen und Genbanken		
λ DashII	λ Vektor für genom. Genbibliotheken	Stratagene
λ ZAP Express	λ Vektor für cDNA-Bibliotheken	Stratagene
<i>ExAssistTM Interference Resistant Helper Phage</i>	Helfer-Phage zur <i>in vivo</i> Exzision von pBK-CMV aus λ ZAP Express	Stratagene
Genomische <i>V. carteri</i> -Genbank	genomische Genbank von <i>V. carteri</i> in λ DashII	Kirk et al. (1999)
<i>V. carteri</i> cDNA-Genbank	cDNA-Genbank von <i>V. carteri</i> in λ ZAP Express	B. Cresnar, pers. Mitteilung
λ gmt4, λ gmt7, λ gmt11, λ gmt24, λ gmt27, λ gmt29	λ - DASH II-Klone mit Teilstücken des <i>met1</i> -Gens	diese Arbeit
λ cmt2, λ cmt4	λ - ZAP Express - Klone mit 3' Bereich der <i>met1</i> -cDNA	diese Arbeit

² Genetische Nomenklatur nach Novick et al. (1976)

2.2 Verwendete Oligonukleotide

Tab. 3. Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pIK2-A SE 5'L	TAGGTAAATAGAAATAGTAATAGTTGTTGAGAG	Bisulfit-Analyse Region I
pIK2-A SE 5'K	GYGAGGTTTGAGTAAGTTATATTTAGGTGGTG	Hill 181 / Hill 181
pIK2-A SE 3'L	ACCTCAATCTAACAACATAAAACCCRTCCCCRTC	"
pIK2-A SE 3'K	ATCTACTCRACATACTTACRATAAAAAATCACC	"
pIK2-A AS 5'L	AATAAACAAAATAACAACAACACTACTAAAAACC	"
pIK2-A AS 5'K	CCAAACTAAAAATCCTCAAAAAATTACRTAACCC	"
pIK2-A AS 3'L	GGGTTTTTTAGTTTATTYGGTATATTTAYGGTG	"
pIK2-A AS 3'K	GGTGAAGATTATTATAAAGTTGGGTTTTTTGG	"
pIK2-B SE 5'L	TTAAGAATTTTATTTAGGTATTTAATTTTAAAG	Bisulfit-Analyse Region II
pIK2-B SE 5'K	TGTAGTATTTGGTGYGTTGYGYGGGGTTTTG	Hill 181 / Hill 181
pIK2-B SE 3'L	ACTCRACATTATTA AAAACRAACCACTTCTC	"
pIK2-B SE 3'K	AAATATCCTAAAACACCRACACCRACCTTCTCC	"
pIK2-B AS 5'L	TTCACCCAAACACTCAACTCCAAATACRACC	"
pIK2-B AS 5'K	CAATACCTAATAACRTTACRCCRAAAACTTACC	"
pIK2-B AS 3'L	ATTGTTGAAGGYGAATTATTTTTTTAYGTYGG	"
pIK2-B AS 3'K	TYGGTATYGATTTTTTTTTGTGGGGGTGGATTG	"
OsserA SE 5'L	AGAAGTTATGAATTTTATTGTGTTTTAAGTTG	Bisulfit-Analyse <i>Osser</i>
OsserA SE 5'K	GTTGGTTTATGTGGATGATTTTTTAATTGTTG	"
OsserA SE 3'K	AAACRACTTAACCAACTAATAACTCCACCAAC	"
OsserA SE 3'L	AAATAACRATACCACAAAACCTCCTTAATTAC	"
JordanA SE 5'L	TGGTTTTTTTTTAGAGTATTTATTATTGTTTTGG	Bisulfit-Analyse <i>Jordan-2</i>
JordanA SE 5'K	AGTTGTATAGTTGATTAAGTTAATTTTTTAGG	"
JordanA SE 3'K	AAACAATTACTTAAAAACATTAACCTAACACC	"
JordanA SE 3'L	ATTAAAAAATACCTTATCCAAAAAAAATACC	"
OSSERSE1	AACGCGTTCAAAATGCAGCC	Sondengewinnung <i>Osser</i>
OSSERSE2	GGATGAAGATGAAGAGTCTG	"
OSSERAS2	CCTAACTTTCTCCATCAGCG	"
OSSERAS1	GTTGAACGACGCGTATCTAC	"
ONTubVß2	CGCCTCTGCTAAGCTA	PCR-Analyse pIK2-Transf.
ONARS1	GAAGTTGGGCTTTTTGGTGTC	"
ONARS1N	AAAGTTGGGCTTTTTGGTGTC	"
ONARS3	GTGTCGTGCCCTCGCGG	"
Prom1IntegVkon	GGGAACGCTCTCTAGAGTTT	"
rbcL5'	TATTCGAAGAAGGTTTCAGTAAC	PCR-Analyse ctDNA
rbcL3'	TTCGTGCATGATAATTGGTACAC	PCR-Analyse ctDNA
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG	Sequenzierung
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
PBRES1	CTCAGCGGGTTAGACACGG	Sequenzierung <i>plasmid rescue</i>
PBRES2	TTTCTCGCCACGTTCCGCC	"
PBRES3	ATCGGGGAAATGGAGTCTGG	"

PBmet1	TGYCARGGNTTYWSNGGNATG	degenerierte PCR <i>met1</i>
PBmet2	GCRTTNCNACYTGNCKRTG	degenerierte PCR <i>met1</i>
PBmet3	ATHACNGTNMNGAYACNAT	degenerierte PCR <i>met1</i>
emt1	GGAGCCCAAAGAGTACAAGG	RT-PCR <i>met1</i>
emt2	GAATGGCGTCTTTGTAGTGG	"
emt3	CGCCAATCGACAACGACGC	"
emt4	GGTCCTCAGCCACAATCTTG	"
emt5	CCACTACAAAGACGCCATTC	"
emt6	CCTGGTGCATACCCTCGCTC	"
emt7	CCGAAAAC TGCTGGAGCCTC	"
emt8	AGCTCGTCCCATTTCGTCTG	"
emt9	AGCTACGGCTCCGAGATCTG	"
emt10	AGATCTCGGAGCCGTAGCTC	"
Dnmt_Oex_dneu	GTGAGGTACCTTGTTGAACCGTTCATGC	Konstruktion
HSR_Seq	CAGGAAGCAATTTTCAGTTCCG	pDnmt_oex_HSR und
Dnmt_oex_u	GACTCCATGGACGTAGAGGCGGCAGTTC	pDnmt_oex_Tub
Dnmt_oex_d	GTGACGGTACC GGTTTCATGCCCGAGTAG	"
Not_kont_1u	AGAGTAAGTGCGTGGAGAGC	PCR-Kontrolle <i>met1</i> -Seq.
Not_kont_1d	CCTACTAAGCTTTTCGTATCC	"
Not_kont_2u	AGATTCTGTCCAAGTCATGG	"
Not_kont_2d	ACAACAGGAATCTGGAGTCC	"
1-5T3_1	GGTTGTGCCGGGATGGTGG	Sequenzierung <i>met1</i>
1-5T7_1	CTGCTTAAAAACCCCAAGCG	"
2-5T3_1	CTTTGTGGCGACACAGCTGG	"
2-5T3_2	GAACGAGCTCAACCTGGAGCG	"
2-5T3_3	GAAAATCCAATCGATGCGAG	"
2-5T3_4	GGGATAACAAACACGACAGG	"
2-5T7_1	GCTGGCAAAGCCAGAGGAGG	"
2-5T7_2	GGAAACGATGCAAGGATAAGG	"
2-5T7_3	GATTCTGTCTGGTCCGGGGTG	"
2-5T7_4	CTACCGCCGTTCCTCACGCC	"
3-5T3_1	GCCTCAACGCTATGATCCG	"
3-5T7_1	GTGCCAACAGCGTCTGTCTG	"
cT3/1	CTGCTGGATCTCGGTTACC	"
cT3/2	GGAGAACGTGCGCAACTTTG	"
cT3/2_1	CTCCAAACAACCCCAAGAAC	"
cT3/2_1'	CCTCTCCTGGTAACCGAGATC	"
g1-2rev_1	CTCGCTGTCCACATCCATC	"
g1-2T7_1	GCAACTGCTGTTACCGTTG	"
g1-2T7_2	CATATTGTGGGCATCAGCAGG	"
g1-2T7_3	CGTACGGACGTGTCGTGGTAC	"
g4-5T3_1	CACCGGTGTTAACGCATTAC	"
g4-5T7_1	GATGCGTGCATTTCATACACG	"
g4-5T7_2	GCTGAGTTGTGGGGTTTTAGG	"
g4-5T7_3	CGACGGCTATTTCTCTCTTTTC	"

g5-4T3_1	CCTTCGCTATGCCACCTTAC	Sequenzierung <i>met1</i>
g6-4T3_1	CCACAACGGATACAGACCCC	"
g6-4T3_2	GAGAACCCTGTCAAGGTGTG	"
g6-4T3_3	CAAAGTGCTCCCAAACAGCC	"
g6-4T7_1	CCAATCCATTCTAATAAGCCC	"
g6-4uni_1	GCATACACAATGGGCTGCAAG	"
g7-1T3_1	GGGCTTTCAATTGGGGGGTG	"
g7-1T3_2	GAGATACGATGCTGGCCAATG	"
g7-1T7_1	GGAGATAAGGAGGGGGATAAG	"
g7-1T7_2	GCAGAGGAAGGTACGGAGGA	"
L7-15T3_1	GGGGAAATCCAAATCTTGTG	"
g29_9rev2	GTA CTGCTTGACACCTGCG	"
g29_9uni2	CAACACTGCATATACAGCTG	"
g7_1t3_5	GATGGTAGCTATAGTTCCTG	"
g7_1t3_6	GATGGAGGATAGATAGCAGC	"
g7_1t7_ct1_2	GCTGCGTGACGTACATACAG	"
g7_1_ct3_2	CCTCCATATTGCATGTAACC	"
g7-15_SacIr_t3-2	ATTGCTCTCCCTACCGGATC	"
g7-15_SacII_t7-2	GATAGGTGTATGTGCGCGTC	"
g7-15_SacII_t7-3	GATTTACATGTTACAGCTAG	"
g7-15_SacII_t7-4	TTCGATGGGCCAATTTATGG	"
g7-15_Xho1_t7-2	ACTCCCGTTTTCCCTTAACC	"
g7-15_Xho1_t3-2	GGATGCCGCCACTTACTTGC	"
g7-15_SacII_t3-2	CTGAGAGCTGCAAATGGAGC	"
g7-15_EcoPstt3-2	CCGGGCTGCAGGCGGGTTGG	"
g7-15_EcoPstt7-2	CACGGCTGACAGGCACAACG	"
g7-15_I1	GACGGTGCGGGACGCGATCG	"
g7-15_I2	CCGAGACCACATGGTAAAGC	"
g7-15_I3	GCGTGTATTGCTCAAGATTG	"
g7-15_I4	CTTTCTGTCTGCCTAACACG	"
g7-15_I5	GGTGGGTCAGGTGTTCCACC	"
g7-15_I6	TGACCACTTCGGATTCTACG	"
g29_9uni3	ATACCTACTACACCTACCTG	"
g29_9kpn5'_2	ATTGACGCATTATCACGCTG	"
g29_9kpn3'_2	ACAGCAGTAGCCCTACTCAC	"
g29_9bam5'_2	CTTACAACCTCTCTTGATCG	"
g29_9bam3'_2	CCTTTGCAGAGTGCTGGAG	"
g29_9hind5'_2	ACTGTATGTGTAGGAAAGGG	"
g7_1t3_9	GCTCTTCTCGCTGGAATACC	"
g29_9bam5'	GACATCATGACGCAGGCTGC	"
g29_9bam3'	CTAGTGTGGACTTAGTGTAC	"
g2_4emt6_5'	AGTGGCGGTGTCGGGAGACG	"
g2_4emt6_3'	GTATTTCAGTGGACACGCTGG	"
g7_1T7ct1_3	TGGCGCTCGCCATGTTTCAG	"
g7_1t3_7	TCATCAAGGACGGCGTCACG	"

g7_1t3_8	AGGTGAAGGTAACCAACAAG	Sequenzierung <i>met1</i>
g29_9hind5'	TGTCGTACAAAGCCGTACGG	"
g29_9kpn5'	TCAGGACTGCACGAACGAGC	"
g29_9kpn3'	CATGTAGAGATTATGTATGG	"
g7-15_I4_2	CTAGGGTCGAGCTACAACAG	"
g7-15_I4_3	GGAACACCTGACCCACCTTG	"
g7-15_I5_2	GCGTAGCCATTTACAGCCAC	"
g7-15_I6_2	CTCCTTCGTATCGCGAGCTC	"
g29_9hind5'_3	GAGTTTCCACCCTTCCCAAG	"
g29_9bam3'_3	CGAAGCGTACCTCTATCTTC	"
g29_9bam5'_3	TTGCCCCAGTTTGCTTGCTG	"
g29_9kpn3'_3	AGCTCGACAAAGCTTGTGAC	"
g7_1t3_10	GCTGGTGGGACCTCTACATG	"
g7_1T7ct1_4	AGTGGTGCGCGTGCGTGAAG	"
cDNA3'I23'	TCAATAACCCGGATGCCAAG	"
cDNA3'I25'	TGGCATCCGGGTTATTGAGC	"
g24_3rev_1	GGAGTGTGTCTTAATTAAGG	"
g24_3rev_g1-2	GGGCATTGAGAGCCCTTTC	"
g24_3uni_1	TGCCCATCTGGGATATAAGC	"
g24_1uni_1	TACGCAAGTGCATGCATGCG	"
g24_1rev_1	CTAAACAACCCATACAATGC	"
g29_10rev_1	TATGTTTACCTATGCTCGCG	"
g29_10uni_1	AGAGCAGCGTCTCTGTATGC	"
Dnmt_f1	CATGCATGACTCAGGTGCAC	"
Dnmt_f2	ACAGACTGCTAAAGTAAAGG	"

2.3 Herkunft von Chemikalien und Enzymen

[γ - ³² P]-ATP (>5000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences (Freiburg)
[α - ³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Acrylamid	Roche (Mannheim)
Agarose	Sigma-Aldrich (München)
Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Apyrase	Sigma-Aldrich (München)
APS	Fluka (Seelze)
ATP	Roche (Mannheim)
Bacto Agar	Difco (Detroit, MI, USA)
Bacto Trypton	Difco (Detroit, MI, USA)
Bacto Yeast Extract	Difco (Detroit, MI, USA)
Biotin	Sigma-Aldrich (München)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (München)
BSA	Sigma-Aldrich (München)
Cäsiumchlorid	Biomol (Hamburg)
DEPC	Sigma-Aldrich (München)
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Amersham Biosciences (Freiburg)
DNase I	Roche (Mannheim)
ECL™ <i>Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System</i>	Amersham Biosciences (Freiburg)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
GeneClean II Kit	Bio 101 Inc. (La Jolla, CA, USA)
GFX™ <i>PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i>	Amersham Biosciences (Freiburg)
Harnstoff	GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, USA)
HEPES	Biomol (Hamburg)
Hybond™ N ⁺ -Nylonmembran	Amersham Biosciences (Freiburg)
IPTG	LOEWE BIOCHEMICA GmbH (Otterfing)
Mikrokokken-Nuklease	Sigma-Aldrich (München)
Na-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich (München)
Nuklease PI	Roche (Mannheim)
Nukleoside	Sigma-Aldrich (München)
Nukleosidmonophosphate	Sigma-Aldrich (München)
PEI-Cellulose-Dünnschichtfolien	Macherey Nagel (Hilden)
Polygram™ Cel 300 PEI/UV ₂₅₄	
pGEM-T Kit	Promega (Mannheim)
Phenol (Tris-gesättigt)	Roth (Karlsruhe)
Phosphodiesterase II	Sigma-Aldrich (München)

ProofStart™ DNA Polymerase	Qiagen (Hilden)
QIAEX™ II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAfilter™ Midi Kit	Qiagen (Hilden)
Qiagen™ Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAQuick™ Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche (Mannheim)
<i>Random Primers</i> (für RT-PCR)	Invitrogen (Karlsruhe)
Rapid-hyb buffer	Amersham Biosciences (Freiburg)
Restriktionsenzyme und Restriktionspuffer	Roche (Mannheim) New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, USA)
RNaseA	Roche (Mannheim)
<i>RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
SDS	Serva (Heidelberg)
<i>SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-Polynukleotidkinase	Roche (Mannheim)
T4 DNA Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq DNA-Polymerase	Eurogentec (Köln), Qiagen (Hilden)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Tris	USB (Cleveland, OH, USA)
X-Gal	Roche (Mannheim)
XSO ₄ (5-Bromo-4-Chloro-Indolylsulfat)	Sigma-Aldrich (München)
alle weiteren Salze, Zucker, Chemikalien und Lösungsmittel	Merck (Darmstadt)

2.4 Medien

Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Medien zeigt Tab. 4.

Tab. 4. verwendete Medien

LB ₀ (Luria Broth)	Bacto Trypton Bacto Yeast Extract NaCl H ₂ O	10 g 5 g 10 g ad 1 l
für Platten:	+ Bacto Agar	15 g/l
LB ₀ -amp	LB ₀ Nach autoklavieren hinzufügen: Ampicillin	100 µg/ml
LB ₀ -amp/X-Gal/IPTG (für Platten)	LB ₀ nach autoklavieren hinzufügen: Ampicillin X-Gal (20 mg/ml in DMFO) IPTG (100 mM)	100 µg/ml 20 µg/ml 375 µl/l
LB ₀ -Kan	LB ₀ nach autokalvieren hinzufügen: Kanamycin	50 µg/ml
TY	Bacto Trypton Bacto Yeast Extract H ₂ O mit 1N NaOH auf pH 7,2 einstellen	10 g 5 g ad 1 l
TY/Glyc.	TY Glycerin 87 % nach dem Autoklavieren mischen	1 Vol. 2 Vol.
Metall-Lösung für SVM	Na ₂ -EDTA FeCl ₃ MnCl ₂ ZnCl ₂ CoCl ₂ Na ₂ MoO ₄ H ₂ O	1,5 g 194 mg 82 mg 10 mg 4 mg 8 mg ad 1 l

SVM	Hepes Na-Glycerophosphat KCl Ca(NO ₃) ₂ MgSO ₄ Na ₂ CO ₃ Harnstoff Thiamin Biotin Vitamin B12 Metall-Lösung H ₂ O	0,6 g 50 mg 50 mg 118 mg 40 mg 20 mg 30 mg 1 mg 2,5 µg 1,5 µg 3 ml ad 1 l
	mit 10N NaOH auf pH 8,0 einstellen autoklavieren	
SVM-SO ₄	statt MgSO ₄ : MgCl ₂	
SVMN	wie SVM, ohne Harnstoff	

2.5 Puffer und Lösungen

In den Tabellen 5 - 12 sind Puffer und Lösungen, geordnet nach Anwendungsbereichen, aufgeführt.

Tab. 5. Lösungen für die Kultivierung des Phagen λ

SM-Puffer	Tris pH 7,5 NaCl MgSO ₄ Gelatine	50 mM 0,1 M 8 mM 0,01 %
Top-Agar	Agar MgSO ₄ LB ₀	7 g 10 mM ad 1 l

Tab. 6. Lösungen für die Plasmidisolierung

Lösung A	Glucose EDTA Tris/HCl, pH 8,0	50 mM 10 mM 25 mM
Lösung B	NaOH SDS	0,2 M 1 % (w/v)
Lösung C	Kalium-Acetat (5M) Eisessig H ₂ O	60 ml 11,5 ml 28,5 ml

Tab. 7. Lösungen für die DNA- und RNA-Präparation aus *V. carteri*

Vo/vox-Lysepuffer	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA, pH8,0	50 mM 10 mM
10 % Sarcosyl	N-Laurylsarcosin	10 % (w/v)
CIA	Chloroform Isoamylalkohol	24 Vol. 1 Vol.
Vo/vox-Resuspensionspuffer	Tris/Cl, pH 8,0 EDTA RNase A	50 mM 10 mM 100 µg/ml
SDS-Extraktionspuffer	Tris/Cl, pH 6,8 SDS	60 mM 2 %
Lösung C	Kalium-Acetat (5M) Eisessig H ₂ O	60 ml 11,5 ml 28,5 ml
RNA-Lysepuffer	Tris/Cl pH 8,0 NaCl EGTA SDS	50 mM 300 mM 5 mM 2 %

Tab. 8. Puffer für die Dialyse von DNA

STE	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0 NaCl	10 mM 1 mM 100 mM
TE 10.1	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA, pH 8,0	10 mM 1 mM
TE 10.01	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA, pH 8,0	10 mM 0,1 mM

Tab. 9. Lösungen für die Gelelektrophorese von DNA

8 % Polyacrylamid-Gel	Acrylamid:Bisacrylamid (29:1) 40% H ₂ O 5x TBE 10 % APS TEMED	20 ml 59,3 ml 20 ml 0,7 ml 100 µl
PA-Auftragspuffer	Bromphenolblau Xylencyanol Glycerin H ₂ O	0,25 % 0,25 % 30%
10x TBE	Tris Borsäure EDTA	0,89 M 0,89 M 25 mM
Auftragspuffer für Agarosegele	Ficoll™ 400 Bromphenolblau Xylencyanol EDTA Tris pH 7,5 H ₂ O	5 g 125 mg 125 mg 930 mg 60,5 mg ad 50 ml

Tab. 10. Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese von RNA

5x MOPS-Puffer	MOPS NaOAc EDTA	200 mM 50 mM 5 mM
RNA-Ladepuffer	0,5 M EDTA pH 8,0 Glycerin DEPC-behandeltes H ₂ O Bromphenolblau Xylencyanol	20 µl 5 ml 5 ml 40 mg 40 mg
DEPC-behandeltes Wasser	H ₂ O DEPC inkubieren 12h, 37°C, autoklavieren	1 l 0,1 ml

Tab. 11. Lösungen und Medien für die Transformation von *E.coli*

2xYT	Bacto Trypton Bacto Yeast Extract NaCl H ₂ O	16 g 10 g 5 g ad 1 l
CMN	CaCl ₂ MnCl ₂ Na-Acetat pH 5,5	100 mM 70 mM 40 mM
CMN-Glycerin	CaCl ₂ MnCl ₂ Na-Acetat pH 5,5 Glycerin	100 mM 70 mM 40 mM 15 % (v/v)

Tab. 12. Lösungen für *Southern blotting*, *Northern Blotting*, Hybridisierung und Markierung von DNA-Sonden

Depurinierungslösung	HCl	0,25 M
Denaturierungslösung	NaOH NaCl	0,5 M 1,5 M
Neutralisierungslösung	Tris pH 8,0 NaCl	0,5 M 1,5 M
SSC (20x)	NaCl Na-Citrat pH 7,0	3 M 0,3 M
STE	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0 NaCl	10 mM 1 mM 100 mM

3. Methoden

3.1 Kultivierung der Organismen

3.1.1 *Escherichia coli*-Kulturen

Escherichia coli wurde, ausgehend von Einzelkolonien, bei 37 °C in LB₀-Flüssigmedien oder auf LB₀-Agarplatten (nach Sambrook et al., 1989) angezogen. Zur Transformantenselektion wurden LB₀-amp-Platten verwendet, oder LB₀-amp/X-gal/IPTG-Platten, um zusätzlich ein „Blau-Weiß-screening“ (Vieira & Messing, 1982) auf pUC-Rekombinanten durchführen zu können. Kulturvolumina bis 5 ml wurden im Reagenzglasroller (Heidolph, Kelheim) inkubiert, größere Kulturen im Schüttelwasserbad (New Brunswick Scientific G76, New Brunswick, NJ, USA). Agarplatten wurden in temperaturkonstanten Brutschränken (Memmert, Schwabach) bebrütet. Wenn erforderlich, wurde das Bakterienwachstum photometrisch bei 600 nm Wellenlänge verfolgt (Spectronic, Bausch & Lomb, Rochester, NY, USA). Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht einer Kulturdichte von 8×10^8 Bakterien pro ml (Sambrook et al., 1989). Glycerinkulturen wurden aus 5 ml ÜK durch Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor, 5.000 Upm, 10 min, 4 °C) und anschließendem Resuspendieren des Zellschlags in 4 ml TY/Glyc. gewonnen und bei –20 °C gelagert.

3.1.2 *V. carteri*-Kulturen

Die verwendeten Stämme von *Volvox carteri* f. *nagariensis* wurden nach Starr und Jaenicke (1974) in - soweit nicht anders angegeben - Standard *Volvox*-Medium (SVM) (modifiziert nach Provasoli & Pintner, 1959) bei 27-30 °C kultiviert und in einem Hell-Dunkel-Zyklus von 16:8 h synchronisiert. Synchrones Wachstum wurde ferner durch geringe Koloniedichte und Aussortieren asynchroner Sphäroide beim Überimpfen erreicht. Jedoch wurden die Algen für manche Experimente bewusst asynchron angezogen, um DNA aus allen Lebensphasen zu erfassen. Stammkulturen wurden in Reagenzgläsern mit 10 ml SVM gehalten und nach zwei bis drei Generationen in frisches Medium überimpft. Größere Kulturvolumina (200 ml bis 9 l) wurden belüftet.

3.1.3 Kultivierung des Phagen λ

3.1.3.1 Anzucht der Wirtsbakterien

Der Phage λ wurde nach Standardmethoden kultiviert (Sambrook et al., 1989). Als Wirtsbakterium wurde der *E. coli*-Stamm NM538 verwendet. Zur Anzucht von Bakterien für die Phagenplattierung wurde *E. coli* NM538 in 5 ml LB₀-Medium, supplementiert mit 10 mM MgSO₄ und 0,4% Maltose ÜN angezogen. Am nächsten Tag wurde die Zelldichte bestimmt (vgl. 3.1.1), die Bakterien abzentrifugiert (HTZ, 3.000 Upm, RT, 5 min) und zu einer OD₆₀₀ von 2,0 in 10 mM MgSO₄ resuspendiert.

3.1.3.2 Phagenplattierung für Titerbestimmung und Genbank-*Screening*

Für Titerbestimmungen von Phagenlysaten wurden entsprechende Verdünnungsreihen in SM-Puffer erstellt. Für das Genbank-*screening* wurden in der ersten Runde 10.000-25.000 pfu, in der zweiten Runde 100-500 pfu eingesetzt. Zur Plattierung der Phagen wurden 100 μ l Phagenlysat (in SM-Puffer) mit 100 μ l vorbereiteter Wirtsbakterien vermengt und 20 min bei 37°C zur Adsorption der Phagen inkubiert. Anschließend wurden 3 ml flüssiger Top-Agar (47°C) zugegeben, kurz gemischt und auf eine trockene LB₀-Platte ausgegossen. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert, bis die Plaques gut sichtbar waren (meist ÜN, mind. 10-12 h). Beim Genbank-*Screening* als positiv identifizierte Plaques wurden mit einer Pasteurpipette ausgestochen und zur Elution der Phagen in 0,5 ml SM-Puffer überführt und ein Tropfen Chloroform hinzugefügt.

3.1.3.3 Herstellung von Plattenlysaten

Zur Herstellung von Plattenlysaten z.B. für die λ -DNA-Präparation (vgl. 3.2.7) wurden 10⁵ pfu Phagen wie unter 3.1.3.2 beschrieben plattiert und bis zur konfluenten Lyse bei 37°C bebrütet (ca. 9 h). Anschließend wurden die Platten mit 5 ml SM-Puffer überschichtet und ÜN bei 4°C zur Elution der Phagen leicht geschüttelt. Nach Abziehen des Lysats wurde mit 1 ml SM nachgewaschen. Um im Lysat befindliche Bakterien abzutöten, wurde 2 % (v/v) Chloroform zugegeben und kräftig gemischt. Chloroform, Zelltrümmer und Agarreste wurden anschließend durch Zentrifugation entfernt (Sorvall SS34-Rotor, 10.000 Upm, 4°C, 10 min). Das fertige Lysat wurde mit einem Tropfen Chloroform versetzt und bis zur Weiterverwendung bei 4°C gelagert.

3.2 Isolierung, Reinigung und Auftrennung von DNA

3.2.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch Alkalische Lyse

Für die Gewinnung kleiner Mengen an Plasmid-DNA (modifiziert nach Ish-Horowicz & Burke, 1981) wurden plasmidhaltige Klone in 1,5-5 ml LB₀-amp ÜN im Roller (37 °C) angezogen. Nach Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, RT, 1 min) wurden die Zellen in 100 µl Lösung A resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl frisch hergestellter Lösung B und fünfminütiger Inkubation bei RT erfolgte die Lyse der Zellen. Zellproteine und SDS wurden durch Mischen des Lysats mit 150 µl eiskalter Lösung C nach 10 min Inkubation auf Eis durch Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, RT, 10 min) abgetrennt. Der plasmidhaltige Überstand wurde anschließend zur Fällung der DNA mit 360 µl Isopropanol versetzt und 5 min bei RT gehalten. Nach einer weiteren Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, RT, 15 min) wurde nach dem Abziehen des Überstandes das DNA-Präzipitat mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 30-50 µl H₂O aufgenommen (Rohplasmid). Die Ausbeute lag zwischen 2 µg und 10 µg Plasmid-DNA pro ml Kultur.

3.2.2 Isolierung von reiner Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA, z.B. zur nachfolgenden automatischen Sequenzierung, wurde der Plasmid Mini Kit von Qiagen (Hilden) oder der Nucleospin Plasmid Kit von Macherey-Nagel (Hilden) verwendet. Es wurden 1,5-5 ml einer *E. coli* ÜK eingesetzt. Für die Plasmidpräparation wurde gemäß der Vorschrift des Herstellers verfahren. Die DNA mit 50 µl des mitgelieferten Elutionspuffers oder H₂O eluiert.

3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das QIAfilter™ Midi Kit von Qiagen (Hilden) eingesetzt. Die DNA wurde gemäß der Vorschrift der Herstellers aus 25-30 ml einer *E. coli* ÜK isoliert. Die DNA wurde je nach Bedarf in 100-300 µl H₂O aufgenommen. Es wurden Ausbeuten von 70-130 µg DNA erreicht.

3.2.4 Isolierung von DNA aus *V. carteri*

Zur Gewinnung von DNA aus *V. carteri* wurden, leicht modifiziert nach der Methode von Mages et al. (1988), Kulturen über ein Nitex-Sieb (Porengröße 10 µm) geerntet. Die gewonnenen Sphäroide wurden in einem Dounce-Homogenisator geöffnet und die Zellsuspension zentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 7.000 Upm, 4 °C, 10 min). Das Sediment wurde in *Volvox*-Lysepuffer (ca. 2,5 ml je l Kulturvolumen) aufgenommen, dreimal im Wechsel bei -80 °C eingefroren und bei 37 °C wieder aufgetaut, und schließlich mit 1/5 Vol. 10 % Sarcosyl versetzt. Nach erneutem Einfrieren und erneutem Auftauen wurde die Suspension 30 min auf Eis inkubiert und regelmäßig kräftig gevortext. Zum Entfernen der Zelltrümmer wurde das Lysat zentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 12.000 Upm, 4 °C, 30 min) und anschließend der Überstand mit 0,9 g/ml CsCl versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 12.000 Upm, 4 °C, 30 min), zum Überstand je ml 300 µg EtBr gegeben und schließlich die Lösung in 13,5 ml-Beckman *Quick-Seal*-Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Nach der Dichtegradientenzentrifugation (Beckman 75Ti- oder 50Ti-Rotor, Beckman - UZ L8-M, 40.000 Upm, 4 °C, 46-60 h) wurde die DNA-Bande unter UV-Licht mit einer Spritze abgezogen. Nach Dialyse gegen STE wurde zweimal mit Phenol und einmal mit CIA extrahiert. Schließlich wurde nochmals gegen TE 10.1, dann gegen TE 10.01 dialysiert.

3.2.5 Isolierung von DNA aus *V. carteri* im kleinen Maßstab

50-200 ml einer *Volvox*-Kultur wurden geerntet, die Sphäroide mit einem Dounce-Homogenisator geöffnet und durch Zentrifugation sedimentiert (Hettich Rotixa, 2.000 Upm, RT, 10 min). 300 µl des Pellets wurden in ein ERG überführt und mit 250 µl *Volvox*-Resuspensionspuffer und 250 µl SDS-Extraktionspuffer versetzt. Nach 10 min Inkubation bei 95 °C wurden 350 µl Lösung C zugesetzt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (ETZ, 14.000 Upm, RT, 5 min). Nach erneutem Zentrifugieren des Überstands wurde zum Überstand 600 µl Isopropanol zugegeben, der Ansatz 10 min auf Eis gehalten und zur Sedimentation der DNA zentrifugiert (ETZ, 14.000 Upm, 4 °C, 15 min). Die DNA wurde mit 500 µl 70% EtOH gewaschen und nach kurzem Trocknen in 100 µl H₂O aufgenommen. Evtl. vorhandene Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation entfernt. Die so gewonnene DNA wurde für PCR-Analysen eingesetzt.

3.2.6 Isolierung von RNA aus *V. carteri*

Volvox-RNA wurde mit geringfügigen Modifikationen nach der Methode von Kirk und Kirk (1985) isoliert. 400 ml einer *Volvox*-Kultur wurden geerntet, die Sphäroide mit einem Dounce-Homogenisator geöffnet und bei 5.000 g für 5 min zentrifugiert. 0.5 ml des Sediments wurden zu 5 ml RNA-Lysepuffer, versehen mit 1,5 % DDC und 1 mg Proteinase K, gegeben, gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 660 µl 2 M KCl zugegeben, 15 min auf Eis inkubiert und zum Abtrennen von ausgefallenem SDS und Zelltrümmern zentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 10.000 Upm, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde nochmals zentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 12.000 Upm, 4°C, 10 min), in ein frisches Corex-Röhrchen überführt, zur RNA-Fällung mit 1/3 Vol. 8 M LiCl versetzt und ÜN bei 4°C stehengelassen. Nach Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor, 15.000 Upm, 4°C, 30 min) wurde das RNA-Sediment dreimal mit 2 M LiCl gewaschen und jeweils 30 min bei 15.000 Upm und 4°C zentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor). Der RNA-Niederschlag wurde schließlich in 600 µl H₂O (DEPC-behandelt) gelöst, in ein 1,5 ml ERG überführt und erneut durch Zugabe von 200 µl 8 M LiCl ÜN bei 4°C gefällt. Nach Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, 4°C, 30 min) wurde das Sediment zweimal mit 600 µl 2 M LiCl gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, 4°C, 15 min) verworfen. Die RNA wurde danach in 400 µl DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen und nochmals durch Zugabe von 40 µl 2 M NaOAc und 1 ml kaltem EtOH (100 %) bei -80°C für 1h gefällt. Nach Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, 4°C, 30 min) und dreimaligem Waschen mit 1 ml kaltem 70 % EtOH wurde das RNA-Sediment 5 min im Vakuum getrocknet, in 200 µl DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurde aus der so gewonnenen Gesamt-RNA polyA⁺-mRNA isoliert, wurde der OligoTex™ mRNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt.

3.2.7 Isolierung von DNA aus dem Phagen λ

Für die Gewinnung von λ-DNA wurde der Qiagen Lambda Mini Kit verwendet (Qiagen, Hilden). Für die Präparation wurde ein Plattenlysat von zwei Platten (3.1.3.3, ca. 10 ml Lysat) eingesetzt. Es wurde nach der vom Hersteller vorgegebenen Vorschrift verfahren. Die DNA wurde in 100 µl H₂O aufgenommen.

3.2.8 Isolierung des Plasmids pBK-CMV aus λ ZAP Express

Der Phagen-Vektor λ ZAP Express (Stratagene, La Jolla, CA, USA) enthält als *insert* einen Phagemid-Vektor (pBK-CMV), in den das eigentliche cDNA-Fragment integriert ist. Nachdem das Phagemid mit Hilfe eines Helferphagen *in vivo* herausgeschnitten worden ist, kann es als Plasmid schnell und einfach weiter untersucht werden. Zum Herausschneiden wurde der *ExAssist™ Interference-Resist Helper Phage* von Stratagene (La Jolla, Ca, USA) verwendet. Es wurde dazu wie in der Vorschrift des Herstellers beschrieben vorgegangen. Die erhaltenen Bakterien, die pBK-CMV-Derivate enthielten, wurden auf LB₀-kan-Platten gezogen.

3.2.9 Trennung von Nukleinsäuren unterschiedlicher Dichte durch Dichtegradientenzentrifugation

DNA-Moleküle mit unterschiedlichem GC-Gehalt und damit unterschiedlicher Dichte (ncDNA/ctDNA) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation, leicht modifiziert nach Burton et al. (1979), getrennt. Dazu wurden 7-75 μg DNA in Lösung mit CsCl versetzt, so dass die Dichte ca. 1,706 g/cm^3 betrug (56,35 % w/w). Die Lösung wurde in ein 5,1 ml Beckman *Quick-Seal*-Ultrazentrifugenröhrchen überführt, mit CsCl-Lösung der selben Dichte aufgefüllt und die Zentrifugation gestartet (Beckman VTi65-Rotor, Beckman-UZ L8-M, 40.000 Upm, 20 °C, 24h, Bremsprogramm 9).

Nach dem Lauf wurde der Gradient vom Boden des Röhrchens abgetropft und in 100 μl -Fraktionen aufgefangen. Dazu wurde der Boden des Röhrchens mit einer Nadel (\varnothing 0,65 mm) angestochen. Um den Gradienten beim Abtropfen nicht zu zerstören und die Abtropfrate regeln zu können, wurde mit einer Peristaltikpumpe langsam Paraffinöl aus einer 1 ml-Pipette (zur Kontrolle der Fraktionsgröße) durch eine Nadel oben in das Röhrchen gepumpt. So wurde die CsCl-DNA-Lösung nach unten verdrängt (vgl. Abb. 5). Die Abtropfgeschwindigkeit betrug ca. 0,5 ml/min, je 100 μl -Fraktion fielen ca. 12-14 Tropfen an (modifiziert nach Birnie & Rickwood, 1978).

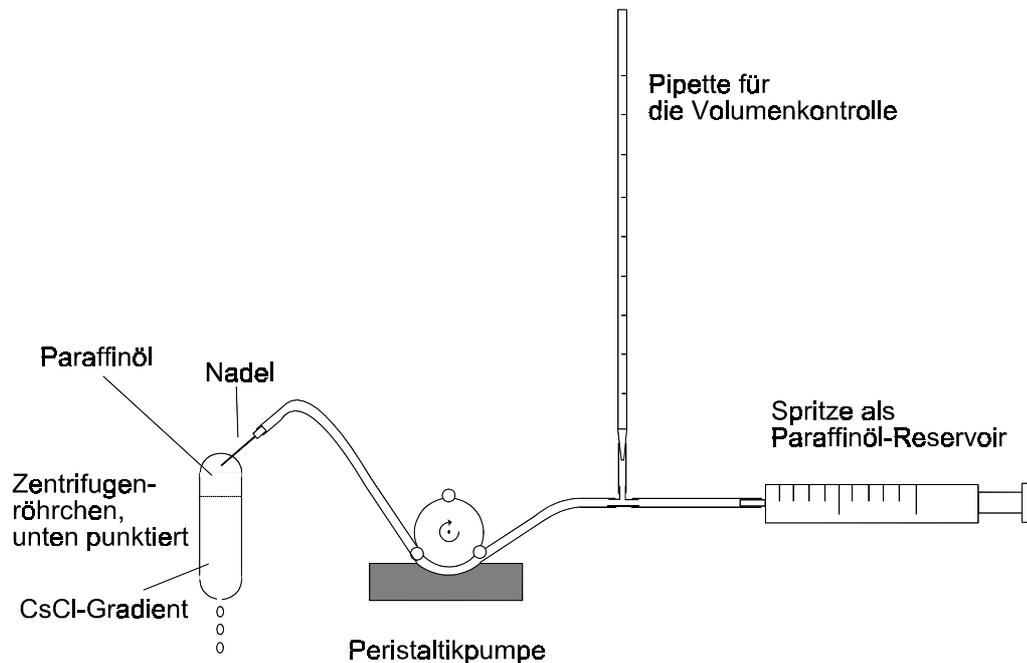


Abb. 5. Abtropfen des CsCl-Gradienten

Um den DNA-Gehalt der Fraktionen zu bestimmen, wurden sie im Photometer (LKB Ultrospec III, Amersham Biosciences, Freiburg) bei 260 nm Wellenlänge vermessen. Fraktionen, die weiter untersucht werden sollten, wurden zur Entfernung des CsCl ca. 4 h gegen TE 10.1, dann ca. 14 h gegen TE 10.01 dialysiert. Um diese kleinen Volumina dialysieren zu können, wurden sie in die Deckel von ERGs pipettiert (Fassungsvermögen ca. 200 μ l). Über den Deckelrand wurde ein Stück eines aufgeschnittenen Dialyseschlauches gestülpt und durch Aufdrücken des ERG fixiert. Zuletzt wurde das ERG ca. 3 mm unter dem Deckelrand abgeschnitten und das so erzeugte „Dialysegefäß“ mit der Membranseite nach unten in den Dialysepuffer gegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass sich vor der Membran keine Luftblase befand (Abb. 6).

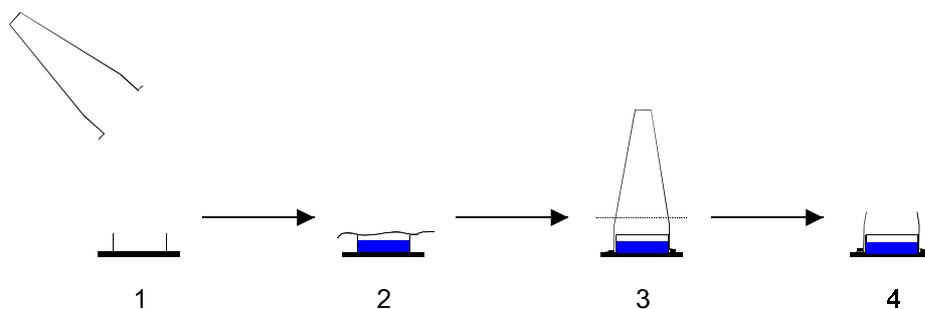


Abb. 6. Dialyse kleiner Volumina. In den abgeschnittenen Deckel eines ERG (1) wurde das Probevolumen einpipettiert und ein aufgeschnittener Dialyseschlauch übergestülpt (2). Die Membran wurde durch Aufdrücken des ERG fixiert und das ERG abgeschnitten (3). Das so erhaltene „Gefäß“ (4) wurde in den Dialysepuffer gegeben.

3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente von Größen zwischen 0,04 kb und ca. 20 kb wurden, versehen mit 1/10 Vol. Auftragspuffer, zur analytischen Größenbestimmung bzw. für präparative Zwecke auf 0,5-2%igen Agarosegelen in TBE-Puffer aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der DNA wurden dem Gel 0,5 µg/ml EtBr zugesetzt. Je nach angelegter Stromstärke (20-120 mA) und Größe des Gels betrug die Laufzeit 1-6 h. Als DNA-Molekulargewichtsstandard diente ein DNA-Leiter-Mix (peqGOLD DNA Leiter-Mix, Peqlab, Erlangen). Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Leuchtschirm (Chromato-Vue Transilluminator C60, Ultra Violet Products Inc., San Gabriel, CA, USA) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Kappa™ CF 8/1 DX-Kamerasystems (Kappa, Gleichen) photographiert. Die digitalisierten Bilder wurden über einen Mitsubishi™-Thermoprinter ausgedruckt und konnten mit der Kappa™-Software (V 3.15) zur Weiterverarbeitung am Computer abgespeichert werden. Zur quantitativen Bestimmung der DNA-Mengen in einzelnen Banden wurde deren Intensität mit einer geeigneten Software (OptiQuant™, V. 2.50, Packard Instrument Co., Meriden, CT, USA) bestimmt.

3.2.11 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA

Um niedermolekulare DNA-Proben (< 200 bp) in ihrer Größe genau bestimmen und unterscheiden zu können, wurden sie mit 1/6 Vol. PA-Ladepuffer versehen und auf 8%igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt (Sambrook et al., 1989). Als Laufpuffer diente 1xTBE, bei einer angelegten Spannung von 8 V/cm betrug die Laufzeit ca. 1-2 h. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel nach dem Lauf in einer EtBr-Färbelösung (0,5 µg/ml in 1x TBE) ca. 30 min geschwenkt und wie unter 3.2.10 beschrieben photographiert.

3.2.12 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

RNA wurde auf denaturierenden Agarosegelen (1-1,5 %) mit 2,2 M Formaldehyd in 1x MOPS-Puffer aufgetrennt (Sambrook et al., 1989). Die RNA-Proben wurden mit 2 µl 5x MOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd, 10 µl Formamid und H₂O auf 20 µl Gesamtvolumen (oder ein Vielfaches davon) eingestellt, 15 min bei 65°C denaturiert und mit 0,1 Vol. RNA-Ladepuffer gemischt. Nach Auftrag auf das Gel wurden die Proben ca. 5-8 h bei 70-90 V aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine käuflich erworbene RNA-Leiter (Roche,

Mannheim). Um die RNA sichtbar zu machen, wurde das Gel mit EtBr-Färbelösung (0,5 µg/ml) ca. 15 min gefärbt und wie unter 3.2.10 beschrieben photographiert. Von Gelen für *Northern-Blots* wurde der zu blottende Bereich abgetrennt, nicht gefärbt, und vor dem Blotten 10 min in H₂O und 10 min in 20x SSC gewaschen. Um Verunreinigungen durch RNasen zu vermeiden, wurde für alle Lösungen DEPC-behandeltes Wasser verwendet.

3.2.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente wurden zur Reinigung aus präparativen Agarosegelen unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 1,5 ml ERGs überführt. Zur Isolierung der DNA wurde der *QIAQuick™ Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) oder der *GFX™ PCR DNA Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Dazu wurde nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Die DNA wurde je nach Bedarf mit 30-50 µl H₂O oder mit kommerziellem Elutionspuffer eluiert.

3.3 Enzymatische und chemische Modifizierung von DNA

3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsverdau von DNA (0,5-2 µg für analytische und bis zu 10 µg für präparative Ansätze) wurden in 10-100 µl Gesamtvolumen mit 1/10 Vol. 10x-Restriktionspuffer und 2-20 U Restriktionsenzym durchgeführt und 1-10 h inkubiert. Die Auswahl des geeigneten Restriktionspuffers sowie der Inkubationstemperatur erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Zum Verdau von Rohplasmiden aus der Plasmid-Minipräparation (3.2.1) wurde zusätzlich 50 ng RNaseA zugegeben.

3.3.2 PCR-Amplifizierung von DNA und RNA

Die *Polymerase chain reaction* (PCR) erlaubt die gezielte Amplifikation gewünschter DNA-Abschnitte. Für alle PCR-Amplifikationen wurde ein Thermocycler des Typs Uno II (Bio-metra, Göttingen) verwendet. Bei der Auswahl der verwendeten Primer wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperaturen beider Oligonukleotide (je ca. 20mer) sich nicht wesentlich

unterschieden. Die Reaktionsbedingungen richteten sich nach dem jeweiligen Experiment und wurden entsprechend optimiert. Je nach Anforderungen wurde herkömmliche Taq-Polymerase (Eurogentec, Köln; Qiagen, Hilden) oder eine Polymerase mit *proofreading*-Aktivität (ProofStart™ DNA Polymerase, Qiagen, Hilden) verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurden in sterilen, ultradünnen 0,2 ml PCR-Tubes (BIOzym, Hess. Oldendorf) folgende Ansätze zusammengestellt:

Steriles H ₂ O	variabel
10x Reaktionspuffer	5 µl
dNTP's (je 2 mM)	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
Primer 1 (25 mM)	1 µl
Primer 2 (25 mM)	1 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2-0,5 µl
Template-DNA	variabel
Gesamtmenge	50 µl

Die DNA wurde meistens durch 35 Zyklen bei folgenden Temperatur- und Zeitbedingungen amplifiziert:

Denaturierung:	15-45 s, 94 °C
<i>Annealing</i> :	15-60 s, 50-60°C
Elongation:	30-120 s, 72 °C

Vor Beginn des ersten Zyklus wurde zusätzlich 2 min bei 95 °C denaturiert. Nach Ablauf der 35 Zyklen wurde 5-15 min bei 72 °C inkubiert (Vervollständigung der Elongation), danach bis zur Weiterverarbeitung auf 4 °C gekühlt. Ein Teil oder auch die gesamte Menge des Ansatzes wurde im folgenden auf ein Agarosegel zur Auftrennung der amplifizierten DNA aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde, wenn nötig, die erhaltene Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert (3.2.7).

Die Amplifikation von RNA (RT-PCR) erfolgte wie oben beschrieben nach dem Umschreiben in cDNA mit Reverser Transkriptase. Für die reverse Transkription wurde die *SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase* zusammen mit den dafür empfohlenen *Random Primers* und dem *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Vorgaben des Herstellers eingesetzt.

3.3.3 Enzymatische Hydrolyse von DNA in Nukleotide und deren radioaktive Markierung für die Dünnschicht-Chromatographie: ^{32}P -postlabeling

Um DNA mit dünnschichtchromatographischen Methoden auf Nukleotidebene auf ihre Bestandteile untersuchen zu können, wurde die Methode des ^{32}P -postlabeling angewendet, die von Randerath et al. (1981) entwickelt wurde. Im Gegensatz zur radioaktiven Markierung *in vivo* wird hier die isolierte DNA *in vitro* markiert. Der Vorteil dieses Verfahrens ist die sehr hohe Nachweisempfindlichkeit (Basen, die mit einer Häufigkeit von weniger als 0,01% in der DNA auftreten, können noch detektiert werden, Wilson et al., 1986) bei relativ geringem experimentellen Aufwand. Das Prinzip des ^{32}P -postlabeling zeigt Abb. 7.

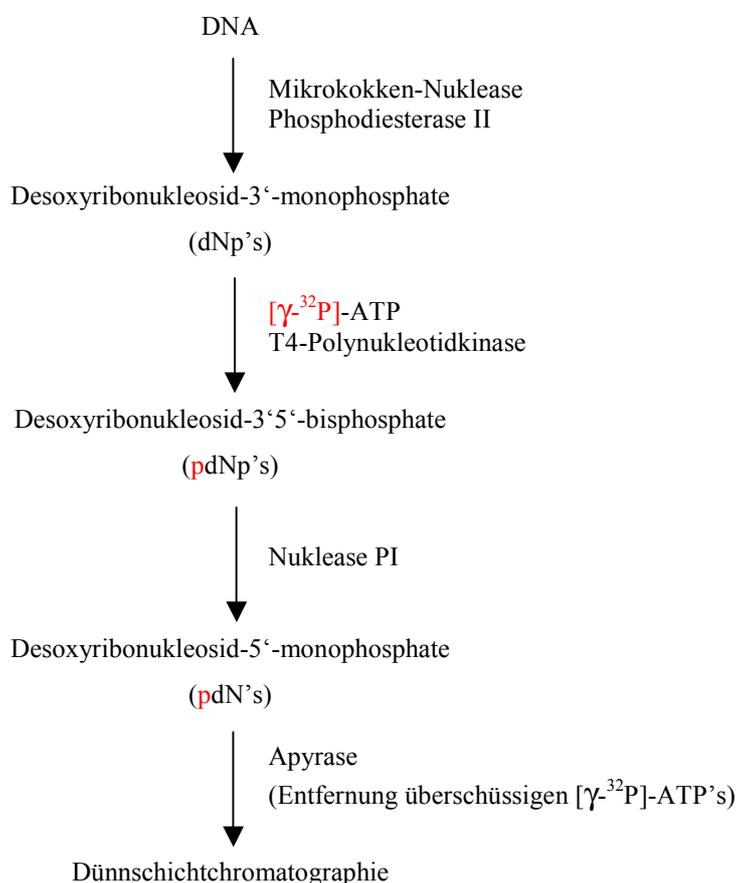


Abb. 7. Prinzip des ^{32}P -postlabeling. Genauere Erläuterungen im Text. rot: Position des radioaktiven Phosphats (Nomenklatur: 5'-pdNp-3').

Grundvoraussetzung war die Reinigung der zu untersuchenden DNA von RNA und deren Bausteinen, da Ribonukleosidmonophosphate bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung zusätzliche Signale geben und somit die Auswertung erschweren. Dazu wurden 10-

20 µg Ausgangs-DNA, isoliert durch Dichtegradientenzentrifugation (3.2.4, 3.2.9) oder QIAfilter™ Midi Kit (3.2.3) 1 h bei 50 °C in 0,3 M NaOH zur Hydrolyse der RNA inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz durch Zugabe von 1N HCl neutralisiert und mit dem QIAEX™ II *Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Dazu wurden zum Ansatz 3 Vol. Puffer QX1 und 2 Vol. H₂O (Plasmid-DNA nur 3 Vol. Puffer QX1) und je 5 µg DNA 10 µg QIAEX™ II- Glasmilch zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT unter gelegentlichem Mixen wurde abzentrifugiert (ETZ, 14.000 Upm, RT, 30 s) und zweimal mit 500 µl Puffer PE gewaschen. Nach dem Trocknen des Sediments bei RT wurde die DNA in einem geeigneten Vol. H₂O (die Endkonzentration der DNA sollte 300 ng/µl nicht unterschreiten) durch 10 min Inkubation bei 50 °C eluiert.

Von dieser DNA-Präparation wurden 4-6 µg für das ³²P-*postlabeling* (leicht modifiziert nach Gommers-Ampt et al., 1991; Leonard et al., 1993) eingesetzt. Für die Analyse von Chloroplasten-DNA wurde aufgrund der geringen Ausbeute bei deren Präparation (0,5 µg) die Größe des ersten Ansatzes halbiert. Die DNA wurde mit Mikrokokken-Nuklease (5 U) und Phosphodiesterase II (0,25 U) in 30 µl 2,5 mM Tris pH 8,8, 2,5 mM CaCl₂ 6-7 h bei 37 °C in Desoxyribonukleosid-3'-monophosphate verdaut. Diese wurden nach 5 min Erhitzen auf 100 °C (zur Inaktivierung der Enzyme) und Zentrifugieren (ETZ, 14.000 Upm, RT, 10 min) in ³²P-markierte Desoxyribonukleosid-3'5'-bisphosphate überführt. Dazu wurden 5 µl von obigem Verdau mit T4-Polynukleotidkinase (5 U), 25 µCi [γ-³²P]-ATP und 10 µM ATP in einem Gesamtvolumen von 25 µl Reaktionspuffer, der aus dem vom Enzymhersteller mitgelieferten 10x-Puffer hergestellt wurde, 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach 10 min Erhitzen auf 100 °C, Abzentrifugieren (ETZ, 14.000 Upm, RT, 10 min) und Überführen des ÜS in ein neues Reaktionsgefäß wurde das 3'-Phosphat durch Zugabe von Nuklease PI (5 U) und ZnCl₂ (Endkonzentration 0,1 mM) auf ein Gesamtvolumen von 31 µl und anschließenden Verdau für 3 h bei 37 °C entfernt. Überschüssiges [γ-³²P]-ATP wurde zuletzt durch Hinzufügen von Apyrase (70 µU) und CaCl₂ (Endkonzentration 5 mM) 45 min bei 37 °C hydrolysiert (Endvol. 38,6 µl). Die Präparationen wurden dann bis zur dünnenschichtchromatographischen Auftrennung bei -20 °C aufbewahrt. Vor dem Auftrag wurden die Proben abzentrifugiert (ETZ, 14.000 Upm, RT, 10 min).

3.3.4 Bisulfit-Behandlung von DNA zur Detektion von 5-Methylcytosin im Sequenzkontext

Das von Frommer et al. (1992) entwickelte *bisulfite genomic sequencing* ermöglicht es, für jedes einzelne C in einer bekannten DNA-Sequenz zu bestimmen, ob es als ^5mC oder als „normales“ C vorliegt. Das grundlegende Prinzip dieser Methode ist, dass ein nicht modifiziertes C durch die Reaktion mit Bisulfit desaminiert und in ein Uracil überführt wird (Abb. 8), während das mit ^5mC nicht geschieht. Diese Reaktion ist streng einzelstrangspezifisch (Clark et al., 1994). Nach anschließender Amplifikation des zu untersuchenden Abschnitts mit PCR, Klonierung der PCR-Fragmente und Sequenzierung individueller Klone erhält man also eine Sequenz, in der nicht modifizierte C's durch T's ersetzt sind. Die verbleibenden C's weisen auf die Positionen hin, an denen ^5mC vorlag. Jede Sequenz repräsentiert dabei den Methylierungsstatus in einer einzelnen Zelle. Das Prinzip der Methode zeigt Abb. 9.

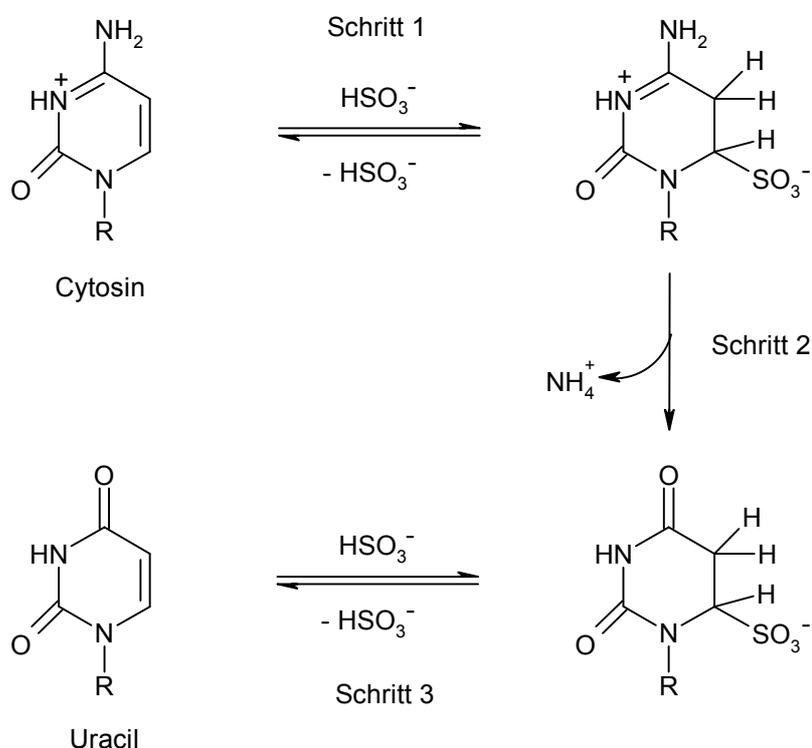


Abb. 8. Desaminierung von Cytosin durch Bisulfit. Cytosin-Derivate reagieren reversibel mit Bisulfit unter Bildung eines 5,6-Dihydro-6-sulfonats (Schritt 1), das unter den Reaktionsbedingungen spontan einer Desaminierung unterliegt (Schritt 2). Anschließend wird das Bisulfit wieder freigesetzt, bevorzugt unter alkalischen Bedingungen (Schritt 3). (nach Hayatsu, 1976)

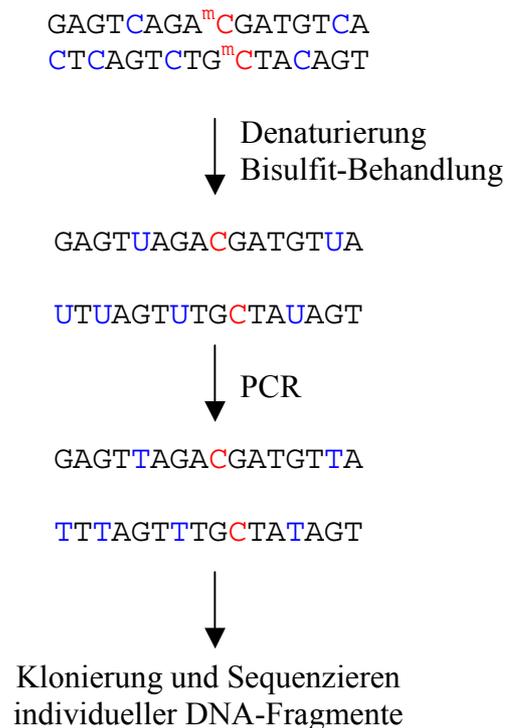


Abb. 9. Das Prinzip des *bisulfite genomic sequencing*. Nähere Erläuterungen siehe Text.

3.3.4.1 Reaktion von DNA mit Bisulfit

Es wurde einer Vorschrift der Arbeitsgruppe Doerfler, Universität zu Köln (Zeschngk et al., 1997) verfahren. Alle verwendeten Lösungen wurden mit entgastem Wasser hergestellt und unter Stickstoff aufbewahrt. Genomische DNA (5 µg oder 200 ng + 5 µg Heringsperma-DNA) wurde auf ein Volumen von 64 µl gebracht und zur Denaturierung mit 2 µl 10 M NaOH (Endkonz. 0,3 M) 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur vollständigen Denaturierung (Voraussetzung für das Funktionieren der Bisulfit-Reaktion) wurde der Ansatz 3 min auf 95 °C erhitzt, dann sofort auf Eis abgekühlt und auch während der folgenden Schritte strikt auf Eis gehalten. Zur Herstellung der Bisulfit-Lösung wurden 8,1 g Natriumbisulfit in 16 ml H₂O gelöst, 1 ml 40 mM Hydrochinon hinzugefügt und der pH-Wert mit 600 µl 10 M NaOH auf 5,0 eingestellt. Die denaturierte DNA-Lösung wurde mit 1,2 ml der Bisulfit-Lösung vermischt, mit Mineralöl überschichtet und 16-18 h bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA aus der Lösung mit 5 µl Glasmilch (GeneClean II-Kit, Bio 101 Inc., La Jolla, CA, USA) isoliert. Dazu wurde 10 min bei RT mit der Glasmilch inkubiert, dann abzentrifugiert

(ETZ, 14.000 Upm, RT, 30 s) und dreimal mit 1 ml Waschpuffer „New Wash“ gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die DNA durch Inkubation bei 55 °C für 5 min und anschließender Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, RT, 30 s) in 100 µl H₂O eluiert. Zur Neutralisierung des Ansatzes und zum Abschluss der Bisulfit-Reaktion (vgl. Abb. 7, Schritt 3) wurden 3 µl 10 M NaOH zugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde im folgenden durch Zupipettieren von 100 µl 6 M NH₄OAc und 400 µl EtOH (100 %) bei -20 °C ÜN gefällt. Am nächsten Tag wurde abzentrifugiert (ETZ, 14.000 Upm, 4 °C, 30 min), das DNA-Präzipitat mit 0,5 ml 70 % EtOH (-20 °C) gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl H₂O aufgenommen.

3.3.4.2 PCR-Amplifikation des zu untersuchenden Abschnitts

Die DNA wurde für den *sense*- und *antisense*-Strang mit zwei unabhängigen PCR-Amplifikationen auf ihren Methylierungszustand untersucht (nach der Bisulfit-Reaktion sind die beiden Stränge nicht mehr komplementär, vgl. Abb. 8). Bei der Auswahl der auf die bisulfitveränderte DNA angepassten 32mer-Primer (vgl. Tabelle 3) wurde darauf geachtet, dass sie in etwa gleiche Schmelztemperaturen aufwiesen und möglichst wenige CpG-Dinukleotide (das bei Eukaryonten häufigste Sequenzmotiv für ^{5m}C) überdeckten. Wenn ein CpG-Dinukleotid im Primer nicht vermieden werden konnte, wurden an der Stelle des potentiell methylierten C die entsprechenden Basen in gleichen Teilen eingebaut, die für das unveränderte ^{5m}C (also C bzw. G, je nach Orientierung des Primers) und für das letztendlich zu T modifizierte normale C (also T bzw. A) stehen müssen. Außerdem wurden am 3'-Ende CC-Dinukleotide angestrebt sowie interne Komplementarität und Komplementarität zwischen den verwendeten Primerpaaren vermieden. Die Länge der amplifizierten Abschnitte betrug ca. 550-650 bp. Für die PCR-Reaktion wurden Ansätze mit 25 µl Gesamtvolumen und folgender Zusammensetzung erstellt:

Steriles H ₂ O	18,2 µl
10x Reaktionspuffer	5 µl
dNTP's (je 2 mM)	1,25 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,85 µl
Primer 1 (25 mM)	0,5 µl
Primer 2 (25 mM)	0,5 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Bisulfit-behandelte DNA	1 µl

Die PCR wurde in einem Uno II - Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. 1 µl des PCR-Produkt wurde mit im PCR-Fragment nach innen versetzten (*nested*) Primern reamplifiziert. Die Bedingungen für die beiden PCR-Reaktionen fasst Tab. 13 zusammen.

Tab. 13. PCR-Bedingungen zur Amplifikation von Bisulfit-behandelter DNA

PCR 1	PCR 2
94 °C, 5 min	94 °C, 5 min
35-40 Zyklen:	35 Zyklen:
Denaturierung: 94 °C, 15-30 s	Denaturierung: 94 °C, 15-30 s
Annealing: 53-54°C, 15-30 s	Annealing: 54-57 °C, 15-30 s
Elongation: 72 °C, 30-60 s	Elongation: 72 °C, 30-60 s
72 °C, 5 min	72 °C, 5 min

3.3.4.3 Klonierung und Sequenzierung des PCR-Produkts

Das PCR-Ansatz wurde zur Aufreinigung auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die resultierende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus der Agarose isoliert (vgl. 3.2.7). Das gereinigte PCR-Produkt wurde in einen pGEM-T™-Vektor kloniert (pGEM-T™ Kit, Promega; Ansatz: 7 µl PCR-Produkt, 1 µl Vektor, 1 µl Puffer, 1 µl T4-Ligase, 4 °C, ÜN) und in *E. coli* DH10B transformiert (vgl. 3.6). Positive, durch „Blau-Weiß-*screening*“ identifizierte Klone wurden weiterkultiviert, Plasmid-DNA isoliert (vgl. 3.2.2) durch geeignete Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit überprüft und sequenziert (vgl. 3.5). Zur Sequenzierung wurden die im Vektor bindenden Primer SP6 und T7 (vgl. Tab. 3) verwendet. Das Sequenzergebnis eines einzelnen Klons repräsentiert letztendlich für den ausgewählten Abschnitt den Methylierungsstatus einer einzelnen Zelle des untersuchten Organismus.

3.3.5 Methylierung von DNA mit SssI-Methyltransferase

SssI-Methyltransferase modifiziert das C in allen CpG-Motiven der zu behandelnden DNA zu ^{5m}C. 5-30 µg DNA wurden eingesetzt, wobei die Ansatzgröße so gewählt wurde, dass die Konzentration der DNA 0,1 µg/µl betrug. Entsprechend wurde der mitgelieferte 10x Puffer und S-Adenosylmethionin (Endkonz. 160 µM) zugegeben. Die Methylierungsreaktion

erfolgte für 2 h bei 37°C, anschließend wurde das Enzym inaktiviert (20 min, 37°C). Die Vollständigkeit der Methylierung wurde mit methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen überprüft.

3.4 Zweidimensionale Dünnschicht-Chromatographie von DNA-Präparationen

Die durch ^{32}P -*postlabeling* radioaktiv markierten Nukleotide (vgl. 3.3.3) wurden durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf 20x20 cm großen mit Polyethylenimin imprägnierten Celluloseplatten mit Leuchtstoff (Polygram™ CEL 300 PEI/UV₂₅₄, Macherey-Nagel, Hilden) aufgetrennt. Je nach Alter der Probe wurden 2-4 µl der radioaktiv markierten Nukleotid-Präparationen aufgetragen (ca. 40-80 ng Nukleotid-Gesamtmenge), dazu außerdem 2 µl einer Mischung aus dAMP, dCMP, dGMP, dTMP sowie ^5m dCMP (je 2 µg/µl). Diese als Referenz verwendeten Nukleotide konnten dank des fluoreszierenden Farbstoffs auf den Platten leicht unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht werden. Ebenso wurden testweise auch AMP, CMP, GMP und UMP aufgebracht, um das Laufverhalten dieser RNA-Bausteine zu bestimmen. Der Proben-Auftragungspunkt lag im Eck, jeweils 2 cm von den Rändern entfernt. Nach dem Auftrag wurden die Platten im kalten Luftstrom eines Föns getrocknet, bis der Auftragungsfleck nicht mehr sichtbar war, dann noch 5 min weitergetrocknet und schließlich in die Laufkammer (20x20x10 cm, Glas, Desaga, Heidelberg) gestellt.

Die Chromatographie wurde durchgeführt wie bei Gommers-Ampt et al. (1991) beschrieben. Die Folien wurden vor dem Probenauftrag in 0,1 M Ammoniumformiat pH 3,5 (hergestellt durch Titration von Ameisensäure mit konz. Ammoniak) 20 min gewässert und 15 min im kalten Luftstrom eines Föns getrocknet. Das Laufmittel in der ersten Dimension war 0,1 M Ammoniumformiat pH 3,5 (100 ml), die Laufzeit betrug ca. 75 min. Nach dem Trocknen (10 min mit kaltem Fön, 60 min im Abzug) wurden die Folien zur vollständigen Entfernung des Ammoniumformiats 15 min in Methanol gewaschen und wieder ca. 15 min mit dem kalten Fön getrocknet. Die zweite Dimension wurde in 100 ml gesättigtem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 3,5 entwickelt (Laufzeit 2,5 - 3 h). Nach erneutem Trocknen (15 min Fön kalt) wurden das Ergebnis der Auftrennung durch Autoradiographie (3.8.1) oder mit dem PhosphorImager (3.8.2) sichtbar gemacht.

3.5 Sequenzanalyse und Sequenzbearbeitung

Die DNA-Sequenzanalyse wurde größtenteils als Auftragssequenzierung an einem ABI 310-Sequencer am Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg bzw. von der Fa. Entelechon (Regensburg) durchgeführt.

Sequenzen wurden vor allem mit folgenden Programmen computergestützt ausgewertet:

- Zahlreiche Auswertungen wie Erstellung von Restriktionskarten und Alignments sowie Genstrukturvorhersagen wurden mit dem GCG-Programmpaket (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.) durchgeführt.
- Zur schnellen Erstellung von *alignments* und Exon-Intron-Abgleichung diente *Dotlet* von Marco Pagni und Thomas Junier (Schweizerisches Institut für Bioinformatik; <http://www.isrec.isb-sib.ch/java/dotlet/Dotlet.html>)
- Datenbanksuchen wurden v.a. mit BLAST (Altschul et al., 1997) in den Datenbanken am NCBI durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- Von allen Rohsequenzen der *met1*- und *C-ars*-Sequenzierprojekte wurde jeweils lokale BLAST-Datenbanken (Altschul et al., 1997) angelegt, um neue Rohsequenzen schnell gegen die bereits vorhandenen abgleichen zu können. Dazu wurden die vom NCBI zur Verfügung gestellten BLAST-Programmpakete in der gerade aktuellen Version verwendet (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/executables/>). Zur einfacheren Konvertierung der Rohsequenzen in das Datenbankformat wurde ein Hilfsprogramm selbst entwickelt. Ebenso wurde eine einfache Benutzeroberfläche für BLAST programmiert. Diese Programme sind online verfügbar (<http://www.biologie.uni-regensburg.de/Genetik/Programme/>)
- Für weitere Analysen wurden zahlreiche in Internet verfügbare Datenbanken und Programme benutzt.

3.6 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Zellen der Stämme DH10B und JM110 für die Transformation wurden modifiziert nach D. Alexander (ARCO Plant Cell Research Institute, Stanford, USA) hergestellt. 100 ml einer hundertfach in 2xYT verdünnten ÜN-Kultur wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀=1,0 geschüttelt. Nach Zugabe von 2 ml 1 M MgCl₂ wurde 10 min bei 37 °C,

anschließend 1 h im Eisbad inkubiert. Nach Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor, 6.000 Upm, 4 °C, 5 min) wurde das Sediment in 20 ml kaltem CMN-Puffer resuspendiert und 60 min auf Eis gehalten. Nach erneuter Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor, 6.000 Upm, 4 °C, 5 min) wurde das Sediment in 4 ml CMN-Glycerin resuspendiert, zu 200 µl portioniert und bei -80 °C eingefroren. Zur Transformation wurden zu einer geeigneten Menge Plasmid-DNA (10-100 ng, 5-20 µl bei Ligationsansätzen) 100 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis gehalten. Nach einem Hitzeschritt (90 sec, 42 °C) wurde der Ansatz nochmals 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 10-100 µl des Ansatzes auf geeignete LB₀-Selektionsplatten plattiert und ÜN bebrütet.

3.7 Transformation von *Volvox carteri*

Die genetische Transformation von *V. carteri* erfolgte mit der *particle gun*-Methode (Schiedlmeier et al., 1994). Als Rezipienten kamen sowohl die *nitA*⁻-Stämme 153-48 (WT-Morphologie) und 153-68 (*regA*-Phänotyp) wie auch *nitA*⁺-Stämme (WT und verschiedene *nitA*-Transformanten) zum Einsatz. Als Selektionsmarker bei *nitA*⁻-Stämmen diente das *nitA*-Gen auf dem Plasmid pVcNR15 (Gruber et al., 1996). Nur Transformanten können in Medium mit Nitrat als einziger Stickstoff-Quelle (SVMN) wachsen. Des Weiteren wurde das *aphVIII*-Gen (Plasmid pHSR250aphVIII) als Selektionsmarker verwendet, das *Volvox* Resistenz gegen das Antibiotikum Paromomycin verleiht (T. Jakobiak, pers. Mitteilung). Eine Selektion mit Paramomycin ist mit jedem beliebigen *Volvox*-Stamm möglich.

Algen mit *regA*-Morphologie wurden vor der Transformation konzentriert und die Sphäroide in einem Dounce-Homogenisator geöffnet. Für Transformationen mit pVcNR15 wurden die Algen zudem gründlich mit SVMN gewaschen. Bei Algen mit WT-Morphologie können nur die Gonidien transformiert werden. Nachdem die Sphäroide aufkonzentriert und mit einem Dounce-Homogenisator geöffnet worden waren, wurde durch Zugabe von Percoll (5 % Endkonzentration) die Dichte der Algensuspension so eingestellt, dass die Gonidien durch Zentrifugation (Hettich Rotixa, 1.350 Upm, RT, 5 min) von den somatischen Zellen abgetrennt werden konnten. Für Transformationen mit pVcNR15 wurden die Gonidien wiederum gründlich mit SVMN gewaschen.

Pro Transformationsansatz wurden von Selektionsplasmid-DNA (pVcNR15 oder pHSR250aphVIII) und der Plasmid-DNA des nicht-selektierten Markers je 1 µg auf 1 mg

Goldpartikel gefällt. In 10 µl 70 % EtOH suspendiert wurden die Goldpartikel sodann mit 6 bar Heliumdruck auf die in einer Petrischale befindlichen Algen (0,1 – 0,2 ml Suspension) geschossen. Für die Selektion auf *nitA* wurden die Algen in 30 ml SVMN aufgenommen. Bei Selektion mit Paromomycin wurden die Algen in SVM resuspendiert und nach 3 Tagen das Antibiotikum zugegeben (10 µg/ml Endkonzentration). Nach 7-20 Tagen wurden potentielle Transformanten isoliert. Dabei wurde je Ansatz nur eine Transformante weiterkultiviert, um eine zufällige Auswahl von Geschwistern zu vermeiden. Ca. 30-80 % der *nitA*⁺- bzw. Paromomycin-resistenten Transformanten können als Cotransformanten erwartet werden und haben somit auch das unselektierte Transgen aufgenommen (Schiedlmeier et al., 1994).

3.8 Hybridisierung und Detektion von Nukleinsäuren

3.8.1 Übertragung von DNA aus Agarosegelen auf Nylon-Filter (*Southern Blot*)

DNA aus Agarosegelen wurde durch Kapillartransfer (modifiziert nach Southern, 1975) auf Hybond™ N⁺-Nylonmembranen (Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese zunächst 20 min in Depurinierungslösung, dann 20-30 min in Denaturierungslösung und schließlich 40-60 min in Neutralisierungslösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Als Transferpuffer diente 10x SSC. Nach kurzem Waschen der Membran in 2x SSC wurde sie zur Immobilisierung der DNA 2 h bei 80 °C gebacken.

3.8.2 Direktes Aufbringen von DNA auf Nylon-Filter (*Dot Blot*)

Um Kopienzahlen z.B. von Transgenen zu bestimmen und entsprechende Daten aus *Southern Blots* zu bestätigen, wurden *Dot Blots* durchgeführt. Die Transformanten-DNAs, Kontroll-DNAs und Verdünnungen von Referenz-DNAs zur Erstellung einer Eichgerade wurden auf ein Volumen von 50 µl gebracht und mit 50 µl 20x SSC versetzt. Ein Stapel aus einer Hybond™ N⁺-Nylonmembran (Amersham Biosciences, Freiburg) und zwei Whatman-Filterpapieren wurde in 10x SSC angefeuchtet und in eine kommerzielle *Dot Blot*-Apparatur eingespannt. Durch Anlegen von Vakuum konnten so die Proben exakt in ca. 5 mm großen Punkten durch die Membran gesogen werden, wobei die DNA an die Membran adsorbierte. Nach kurzem Trocknen wurde die Membran zur Denaturierung der DNA zuerst 5 min in

Denaturierungslösung, dann 1 min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Anschließend wurde die DNA durch UV-Crosslinking an der Membran fixiert und bis zur Hybridisierung zwischen zwei Whatman-Papieren aufbewahrt. Die *Dot Blot*-Technik wurde auch angewandt, um Plasmid- und λ -DNAs schnell mittels Hybridisierung auf ihre Identität zu überprüfen.

3.8.3 Übertragung von RNA aus Agarosegelen auf Nylon-Filter (*Northern Blot*)

RNA aus Agarosegelen wurde analog zur *Southern*-Technik (3.8.1) auf Hybond™ N⁺-Nylonmembranen (Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Vor dem Kapillartransfer wurde das Gel 10 min in DEPC-behandeltem H₂O und 10 min in 20xSSC gewaschen. Als Transferpuffer diente 10xSSC. Zur Fixierung der RNA wurden die Membranen nach dem *blotting* 2 h bei 80°C gebacken.

3.8.4 Screening von λ -Genbanken

Von Phagenplatten, wie in 3.1.3.2 beschrieben hergestellt, wurde durch „*plaque lifting*“ Phagen-DNA auf Hybond™ N⁺-Nylonmembranen (Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Dazu wurden die Membranen 1 min auf die Platten aufgelegt und die Lage der Membranen markiert, um später die Hybridisierungssignale den Plaques zuordnen zu können. Die Membranen wurden anschließend 7 min in Denaturierungslösung und 1 min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Sodann wurden die Membranen zur Fixierung der DNA 2h bei 80°C gebacken und bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

3.8.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Radioaktive Markierungen von DNA wurde mit dem *Random Primed DNA-Labeling Kit* (Roche, Mannheim) durchgeführt. Dazu wurde die DNA (0,1-1 μ g) zunächst 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Dann wurden die Desoxynukleotide dATP, dGTP, dTTP (je 25 mM Endkonzentration), sowie der Reaktionspuffer mit einem Gemisch statistischer Hexanukleotide (als unspezifische Primer) und [α -³²P]-dCTP (50 μ Ci, 3000 Ci/mmol) zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 U Klenow-Polymerase gestartet und 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit STE auf ein Volumen von 70 μ l gebracht und über eine Nucltrap™-Säule (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

gereinigt. Dazu wurde die Säule mit 70 µl STE angefeuchtet, dann der Ansatz aufgeladen und durchgedrückt und schließlich mit 70 µl STE nachgespült. Wenn nur einzelne Sonden radioaktiv markiert werden mussten, wurde auch eine Auftragsmarkierung durch *Random Primed Labeling* (Hartmann Analytic, Braunschweig) in Anspruch genommen.

3.8.6 Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen der Membranen

Vor der Hybridisierung wurden die Nylonmembranen je nach Größe in 8-13 ml *Rapid-hyb buffer* (Amersham Biosciences, Freiburg) bei 65 °C im Hybridisierungssofen (*Mini Hybridisation Oven*, Appligene) vorhybridisiert. Zur Hybridisierung wurde die zuvor denaturierte Sonde (5 min, 95 °C) zugegeben und ÜN bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen jeweils 20 min zunächst in 2x SSC, 0,1 % SDS bei RT, dann 2x SSC, 0,1 % SDS bei 65 °C und, je nach Bedarf weiter jeweils 20 min in 0,2x SSC, 0,1 % SDS bei 65 °C und evtl. bei noch höheren Temperaturen gewaschen. Danach wurden die Membranen auf ein feuchtes Whatman-Papier gelegt, in Folie eingeschweißt und eine Autoradiographie durchgeführt (3.9).

3.8.7 Nichtradioaktive Detektion von Nukleinsäuren

Für *Southern-Blots* und *Dot Blots* mit λ -DNA und Plasmid-DNAs wurden nicht-radioaktive Hybridisierungen nach dem ECL™-Verfahren (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Zur Herstellung der Sonden, Hybridisierung und Detektion wurde dabei verfahren wie vom Hersteller vorgeschrieben. Die Hybridisierungen wurden im Hybridisierungssofen durchgeführt.

3.9 Autoradiographie

3.9.1 Autoradiographie mittels Röntgenfilm

Zur Autoradiographie wurde auf die Dünnschicht-Platten und Membranen in Filmkassetten ein Röntgenfilm (Fuji medical x-ray Film, Fuji Photo Film Co., Japan oder Kodak Biomax™ MS, Kodak, Rochester, NY, USA) aufgelegt und, je nach Bedarf, ca. 2-70 h bei RT oder

-70 °C exponiert (Biomax™-Film mit Verstärkungs-Schirm). Für Hybridisierungen nach dem ECL™-Verfahren wurde ein Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg) 0,5-15 min exponiert, anschließend 2-4 min entwickelt (Rodinal Entwickler, Kodak) und 2 min fixiert (Tetenal Fixiersalz, Kodak).

3.9.2 Autoradiographie mittels PhosphorImager

Zur radioaktiven Autoradiographie wurde auch ein PhosphorImager (Cyclone™ Storage Phosphor System, Packard Instruments Co., Meriden, CT, USA) eingesetzt. Dazu wurden auf die Dünnschicht-Platten spezielle *screens* ca. 1-15 h aufgelegt, die anschließend im PhosphorImager gemessen wurden. Die in digitaler Form vorliegenden Daten wurden mit der zugehörigen Software (OptiQuant V. 2.50) ausgewertet. Auf diese Weise war eine sowohl schnelle als auch reproduzierbare quantitative Analyse der Autoradiogramme möglich.

3.10 Rückgewinnung von Plasmiden aus *Volvox*-Transformanten (*plasmid rescue*)

10 µg genomischer DNA von *Volvox*-Transformanten wurde mit 50 U *SalI* in *SalI*-Restriktionspuffer ÜN verdaut. Anschließend wurde das Enzym inaktiviert (20 min, 65°C) und mit Phenol und CIA extrahiert. Die DNA wurde mit EtOH gefällt, gewaschen und in 400 µl Ligase-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 6 U T4-DNA-Ligase wurde der Ansatz ÜN bei 14°C inkubiert, um die genomischen DNA-Fragmente zu zirkularisieren. Die DNA wurde danach wiederum mit EtOH gefällt, in 20 µl H₂O aufgenommen und zur Transformation von *E. coli* DH10B verwendet (vgl. 3.6) Auf LB-Ampicillin-Platten wurde auf Transformanten selektiert. Die enthaltenen Plasmide wurden isoliert und durch Restriktionskartierung und Sequenzierung charakterisiert.

3.11 Tests von *Volvox*-Transformanten auf Arylsulfatase-Aktivität

3.11.1 Qualitativer Schnelltest

Zur qualitativen Analyse von Transformanten auf Arylsulfatase-Aktivität wurden einige Sphäroide in 1 ml SVMN-Medium überführt und XSO₄ (5-Bromo-4-Chloro-Indolylsulfat) zu einer Endkonzentration von 0,3 mM zugegeben. XSO₄ wird als Substrat von der Arylsulfatase gespalten, wobei ein Indigofarbstoff entsteht. Transformanten, die die exogene Arylsulfatase exprimierten, konnten deutlich anhand der Blaufärbung der Sphäroide identifiziert werden.

3.11.2 Quantitativer Test

Zur quantitativen Bestimmung der Arylsulfatase-Aktivität einzelner Transformanten wurde ein photometrischer Farbstest durchgeführt (Ohresser et al., 1997). Je nach Zelldichte wurden dazu 10-30 ml einer *Volvox*-Kultur abzentrifugiert (10 min, 4.000 Upm, 4°C, Sorvall SS34-Rotor), die Algen in 3 ml des Überstandes aufgenommen und 2x 15 sec. unter Eiskühlung mit Ultraschall (70 W) aufgeschlossen. Zur Präzipitation von Zelltrümmern wurde anschließend in ERGs zentrifugiert (ETZ, 14.000 Upm, RT, 5 min). 500 µl des Überstandes wurden mit 8 µl 50mM α-Naphthylsulfat versetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion durch 500 µl 4% SDS / 0,2 M NaOAc pH 4,8 wurden 100 µl o-Dianisidin (10 mg/ml) zugegeben. Dieses koppelt mit dem durch die Arylsulfatase freigesetzten α-Naphthol, was einen purpurnen, in SDS löslichen Niederschlag ergibt. Nach 2 min Reaktionszeit wurde die Absorption bei 540 nm bestimmt. Die relative Ars-Aktivität konnte somit ausgedrückt werden als OD₅₄₀ per mg Gesamtprotein in der Probe. Die Proteinmenge in der Probe wurde mit einem kommerziellen Kit bestimmt (Roti-Nanoquant, Roth, Karlsruhe).

4. Ergebnisse

4.1 Analyse von DNA-Modifikationen bei *Volvox*

Unterschiedliche Bandenmuster bei Restriktionsanalysen nativer und klonierter DNA von *V. carteri* (Kirk, 1998) sowie ein wiederholt beobachtetes *silencing* zuvor exprimierter Transgene gaben Hinweise auf mögliche (inaktivierende) DNA-Modifikationen bei dieser Alge. In einer Diplomarbeit (Babinger, 1999) wurde deshalb erstmals *Volvox*-DNA mit chromatographischen und massenspektroskopischen Methoden qualitativ und quantitativ auf DNA-Methylierung untersucht. So wurde mittels HPLC-MS-Analyse eines DNA-Hydrolysats das Vorhandensein von ^5mC und ^6mA nachgewiesen. Durch Dünnschichtchromatographie radioaktiv markierter Nukleosidmonophosphate der DNA von *V. carteri* HK10 wurden diese Ergebnisse bestätigt und der Anteil von ^5mC am Gesamt-Cytosin mit 1,15 % bestimmt, ^6mA macht 0,25 % des Adenins aus. *V. carteri* ist damit einer der ersten eukaryotischen Vielzeller, bei dem ^6mA in der DNA nachgewiesen wurde.

Bei diesen Experimenten wurde eine Gesamt-Präparation der *V. carteri* HK10-DNA verwendet, die neben nuklärer DNA (ncDNA) auch 5-7 % Chloroplasten-DNA (ctDNA) enthielt. Der Mitochondrien-DNA-Anteil war mit < 1 % zu vernachlässigen (Kirk, 1998). Aufgrund früherer Befunde, nach denen bei der verwandten Grünalge *C. reinhardtii* in bestimmten Lebensphasen (z.B. in Gameten und Zygoten) der Cytosin-Methylierungsgrad der ctDNA bis zu 50 % betragen kann (Feng & Chiang, 1984), wurden ncDNA und ctDNA durch Dichtezentrifugation getrennt, um auszuschließen, dass die beobachteten Modifikationen der „ncDNA“ primär von der ctDNA stammten. In einer ncDNA-Präparation, deren ctDNA-Anteil kleiner 2 % war, blieb der Gehalt an ^5mC mit 1,1 % nahezu konstant, ebenso der von ^6mA mit 0,3 %. Somit stammt der Hauptanteil an ^5mC und ^6mA aus ncDNA (Babinger, 1999). Diese Ergebnisse ließen drei Fragen unbeantwortet: (1) Gilt der festgestellte Gehalt an ^5mC (1,15 %) und ^6mA (0,25 %) generell für *V. carteri*, oder unterscheiden sich die Anteile in DNAs der genetisch kompatiblen Stämme HK10 (Japan) und Poona (Indien)? (2) Treten ^5mC und ^6mA -Modifikationen überhaupt in der ctDNA von *Volvox* auf? (3) Unterscheiden sich Soma- und Keimbahnzellen (Gonidien) im Grad der DNA-Modifikation?

4.1.1 Quantifizierung modifizierter Basen in DNAs verschiedener *Volvox*-Stämme

Kreuzungen zu Etablierung von Gen- und RFLP-Karten von *V. carteri* f. *nagariensis* wurden vorwiegend mit zwei Linien aus Japan (HK10, weiblich) und Indien (Poona, männlich) durchgeführt, weil vom männlichen Stamm aus Japan (HK9) nur sterile, vegetativ proliferierende Formen existieren. Der Stamm HK 10 wurde 1967 in einem Reisfeld bei Kobe/Japan isoliert (Starr, 1969). *V. carteri* f. *nagariensis* Poona stammt aus der Umgebung von Poona in Kerala/Indien (Adams et al., 1990). Bei Restriktionsanalysen unterscheiden sich diese Stämme im Fragmentierungsmuster, wenn z.B. das Nitratreduktase-Gen (*nitA*) von HK10 und Poona verglichen wird. Methylierungssensitive Enzyme, die einzelne Schnittstellen in HK10-DNA nicht erkannten, konnten Poona-DNA im gleichen Sequenzkontext schneiden (Kirk, 1998). Ist also der Anteil an methylierten Basen im Stamm Poona niedriger?

Zur Quantifizierung von ^{5m}C und ^{6m}A in *V. carteri* Poona-DNA wurde die Methode des ^{32}P -*postlabeling* verwendet, mit der Basen bis zu einem Anteil von 0,01 % detektiert werden können (Randerath et al., 1981; Wilson et al., 1986). Poona-Gesamt-DNA wurde enzymatisch zu Nukleosid-5'-monophosphaten verdaut und mit ^{32}P markiert (vgl. 3.3.3). Mit den Kontrollen, *V. carteri* HK10 DNA und Plasmid-DNA (pSK⁻) aus *E. coli* DH10B und JM110, wurde entsprechend verfahren. DNA aus *E. coli* DH10B (*dam*⁺, *dcm*⁺) enthält sowohl ^{5m}C als auch ^{6m}A , während in DNA aus *E. coli* JM110 (*dam*⁻, *dcm*⁻) diese beiden Modifikationen nicht vorkommen. In der bekannten Sequenz des Plasmids pSK⁻ kann leicht die Anzahl der vom Dam-System (G^{*}ATC) und Dcm-System (C^{*}CWGG) methylierten Motive ausgezählt und der theoretisch zu erwartende Anteil von ^{5m}C (0,67 %) und ^{6m}A (2,04 %) berechnet werden.

Die radioaktiv markierten DNA-Hydrolysate wurden auf PEI-imprägnierte Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetragen (Abb. 10, vgl. 3.4). Um das Laufverhalten der verschiedenen Nukleosid-Monophosphate in der 2D-DC zu bestimmen, wurde eine Standard-Mischung von definierten, kommerziell bezogenen Nukleotiden in einer mit UV-Licht (254 nm) detektierbaren Menge (je 4 µg) aufgetragen. Ihre Positionen relativ zueinander zeigt Abb. 10C. Die Kontroll-DNA aus *E. coli* DH10B zeigt deutliche Signale von $^{5m}dCMP$ und $^{6m}dAMP$ (Abb. 10A, Pfeile), die DNA aus *E. coli* JM110 erwartungsgemäß nicht (Abb. 10B). Die Autoradiogramme von *V. carteri* HK10-DNA (Abb. 10D) und Poona-DNA (Abb. 10E) zeigen beide die ^{5m}C - und ^{6m}A -Signale (Pfeile).

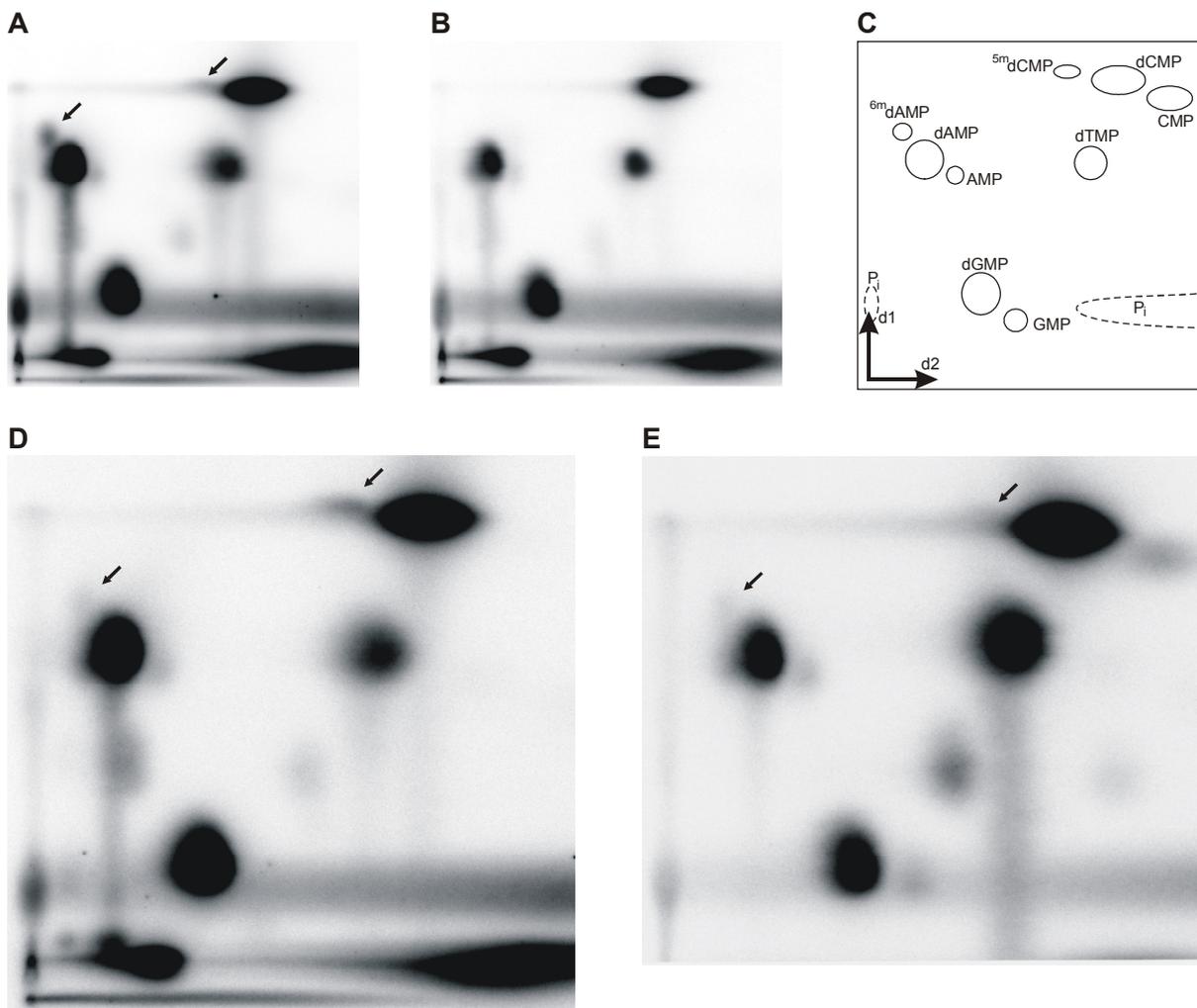


Abb. 10. Zweidimensionale dünnschicht-chromatographische Auftrennung ³²P-markierter Nucleosid-Monophosphate aus DNA-Hydrolysaten zweier Kontrollen (*E. coli*) und verschiedener *Volvox*-DNAs. **A.** Plasmid-DNA (pSK⁻) aus *E. coli* DH10B (*dcm*⁺ *dam*⁺) mit 0,67 % ^{5m}C- und 2,04 % ^{6m}A-Anteil (Pfeile). **B.** pSK⁻-DNA aus *E. coli* JM110 (*dcm*⁻ *dam*⁻). **C.** Schema des Laufverhaltens der UV-detektierten Standard-Nucleosid-Monophosphate und von anorganischem Phosphat (P_i). d1, erste Dimension (0,3 M Ammoniumformiat, pH 3,5); d2, zweite Dimension (gesättigte wässrige Ammoniumsulfat-Lösung, pH 3,5). **D:** *V. carteri* HK10 Gesamt-DNA. **E:** *V. carteri* Poon Gesamt-DNA. (A-D nach Babinger, 1999)

Zur Quantifizierung von ^{5m}C und ^{6m}A wurden mit dem PhosphoImager gewonnene Autoradiogramme computergestützt ausgewertet (OptiquantTM-Software). Zu jeder Auswertung wurden dabei bis zu vier unabhängige Ansätze einbezogen (Tab. 14). Technisch bedingt, vermutlich aufgrund leicht unterschiedlicher Substratspezifität der Polynukleotidkinase (Talaska et al., 1992), werden jedoch nicht alle Nucleotide in gleichem Maße radioaktiv markiert, was besonders am immer leicht unterrepräsentierten dTMP sichtbar wird. Deshalb wurde als Referenz für die Quantifizierung die pSK⁻-Probe aus *E. coli* DH10B (*dam*⁺, *dcm*⁺) herangezogen, für die zu erwartende Anteile von ^{5m}C (0,67 %) und ^{6m}A

(2,04 %) berechnet werden konnten. Während für ^{5m}C der gemessene Wert (0,69 %) mit dem Erwartungswert sehr gut übereinstimmte, wurde für ^{6m}A (2,75 %) ein Korrekturfaktor von 0,74 zur Angleichung eingeführt und bei der Auswertung aller ^{6m}A -Messwerte eingesetzt (vgl. Tab. 14).

In der Poona-DNA liegt nach Quantifizierung und Korrektur 0,8 % des Cytosins als ^{5m}C vor, der Anteil an ^{6m}A beträgt 0,3 %. Bei *V. carteri* HK10 wurden durch Einbeziehung neuer Messungen die früheren Werte von 1,15 % und 0,25 % auf 1,1 % und 0,3 % präzisiert. In Tab. 14 sind die Messwerte mit weiteren Ergebnissen (4.1.2 und 4.1.3) zusammengefasst.

Neben den Signalen der vier Hauptnukleotide sowie $^{5m}dCMP$ und $^{6m}dAMP$ sind auf den Platten einige weitere Signale zu erkennen, die teilweise in Abb. 10C aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt sind. Eindeutig identifiziert werden konnten Komponenten aus RNA und unvollständig umgesetzte Nukleosid-3'5'-diphosphate, bei anderen handelt es sich vermutlich um modifizierte Basen z.B. aus tRNA (Babinger, 1999). Dennoch kann das Vorhandensein von weiteren modifizierten Basen in der *Volvox*-DNA nicht ausgeschlossen werden.

Während die DNA des *V. carteri*-Stammes Poona also gleiche Mengen an ^{6m}A aufweist wie die DNA des Stammes HK10, ist der Gehalt an ^{5m}C um ca. 30 % niedriger. Ein eindeutiger Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Fragmentierungsmuster bei Restriktionsverdauen konnte bisher aber noch nicht gezeigt werden (vgl. 5.1).

4.1.2 Quantifizierung von ^{5m}C und ^{6m}A in Kern- und Chloroplasten-DNA

Nach Analyse angereicherter ncDNA (Babinger, 1999) war bereits zu vermuten, dass die nachgewiesenen Mengen von ^{5m}C und ^{6m}A nicht auf der alleinigen Methylierung von ctDNA beruhen können. Eine direkte Untersuchung von reiner ctDNA selbst war wegen der zu geringen Ausbeuten zunächst nicht durchzuführen.

Um doch genügend ctDNA für eine dünnschichtchromatographische Untersuchung zu gewinnen, wurden insgesamt 470 μg *Volvox*-Gesamt-DNA durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in Ansätzen zu je ca. 20-70 μg aufgetrennt (3.2.9), zu 0,1 ml fraktioniert und photometrisch vermessen (Abb. 11A). Da die nur geringfügig unterschiedliche Dichte von ncDNA ($\rho=1,715 \text{ g/cm}^3$) und ctDNA ($\rho=1,707 \text{ g/cm}^3$) (Kochert, 1975) eine Gewinnung von höher konzentrierter ctDNA in einem Zentrifugationsschritt nicht erlaubte, wurden die

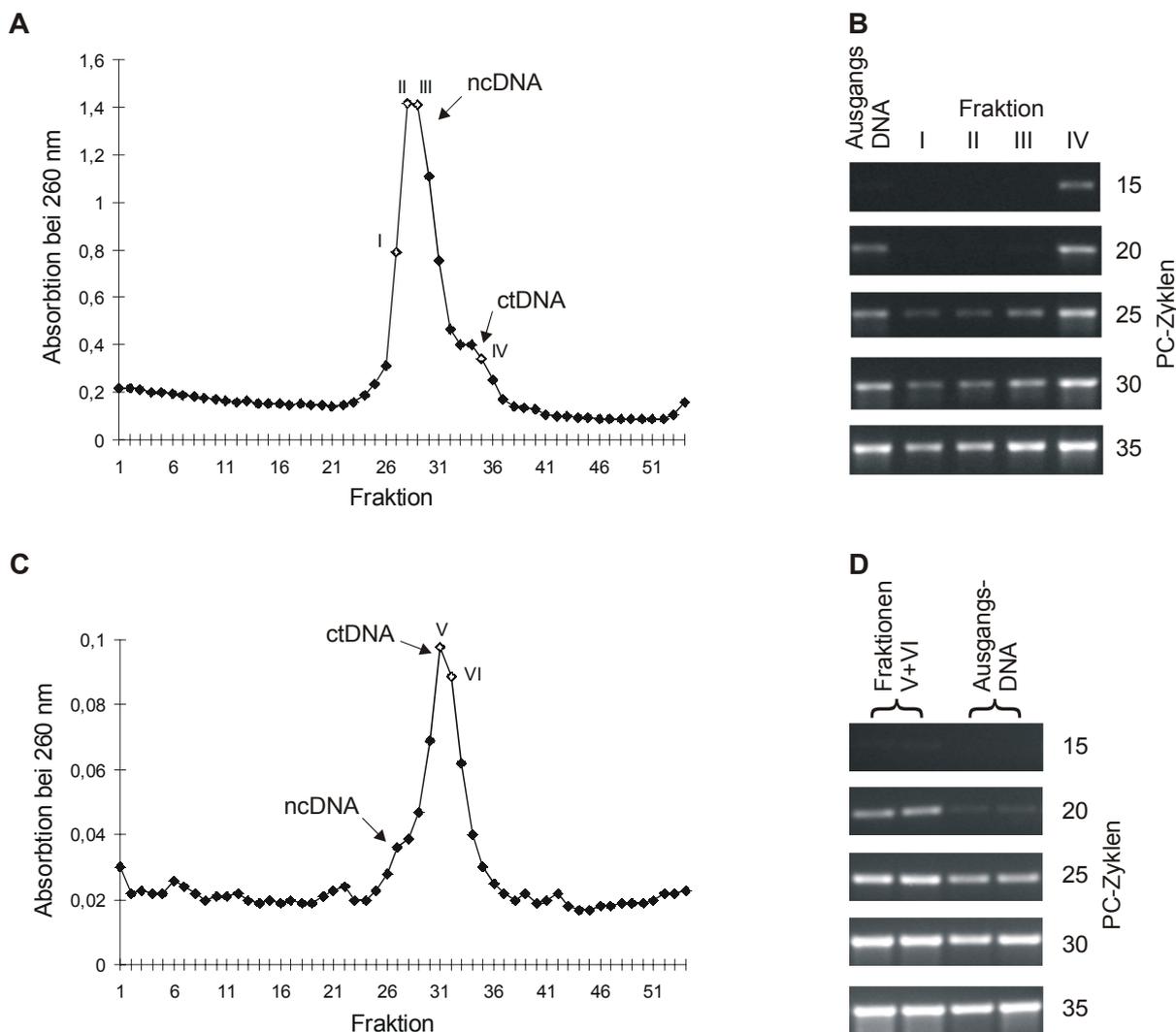


Abb. 11. CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation von *V. carteri* HK10 DNA und Bestimmung des Chloroplasten-DNA-Gehalts durch PCR. **A.** Insgesamt 470 µg gereinigte Gesamt-DNA wurde in mehreren Ansätzen (je 20-70 µg) durch Dichte-Zentrifugation aufgetrennt, zu 0,1 ml fraktioniert und photometrisch über 260 nm-Absorption vermessen. Exemplarisch ist das Profil eines Ansatzes gezeigt. Der Haupt-Gipfel enthält die ncDNA ($\rho = 1,715 \text{ g/cm}^3$), die Schulter die ctDNA ($\rho = 1,707 \text{ g/cm}^3$). **B.** Der ctDNA-Gehalt der Gesamt-DNA und der Fraktionen I-IV aus (A) wurde durch PCR-Amplifikation eines Abschnitts des Chloroplasten-codierten *rbcL*-Gens abgeschätzt. Dazu wurden die Intensitäten der Banden nach 25 Zyklen densitometrisch verglichen. **C.** Die Fraktionen 33-37 aus A wurden zusammen mit den ctDNA-Fractionen weiterer Ansätze zur weiteren Reinigung der ctDNA erneut dichte-zentrifugiert. Es resultierte eine Schulter von noch enthaltener ncDNA und ein Haupt-Gipfel von ctDNA. **D.** Die vereinigten Fraktionen V und VI wurden wie unter B mittels PCR mit Gesamt-DNA verglichen.

ctDNA-Fractionen aus den ersten Zentrifugationen zusammengefasst (zusammen ca. 23 µg DNA) und erneut zentrifugiert (Abb. 11C).

Der Trennungsgrad von ctDNA und ncDNA war aus den Elutionsprofilen nicht genau genug abzuschätzen. Deshalb wurde der Gehalt an ctDNA in verschiedenen Fraktionen im Vergleich zur Ausgangs-Gesamt-DNA durch PCR ermittelt. Dazu wurde aus gleichen Mengen DNA mit

den Primern *rbcL5'* und *rbcL3'* ein 462 bp-Fragment aus dem chloroplasten-kodierten Gen der großen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase (*rbcL*, Nozaki et al., 1995) amplifiziert (Abb. 11B, D). Nach 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen wurden aus den parallel durchgeführten PCR-Ansätzen Proben entnommen, elektrophoretisch analysiert und abgeschätzt, bis zu welcher Zyklenzahl bei allen Proben eine gleichmäßige, exponentielle Amplifikation anzunehmen war. Die Banden nach 25 Zyklen wurden densitometrisch vermessen und aus den Intensitäten der Gehalt an ctDNA abgeschätzt.

Die Fraktionen I und II enthalten demnach ca. 27 % der Menge an ctDNA in der Gesamt-DNA (auf 100 % gesetzt), Fraktion III 57 % und Fraktion IV 162 % (Babinger, 1999). Bei einem postulierten absoluten Anteil von ctDNA in der Gesamt-DNA-Präparation von 6,5 % (Kochert, 1975) ergibt das absolute 1,8 % für Fraktion I und II sowie 10,5 % für Fraktion IV. Die Anreicherung von ctDNA in den vereinigten Fraktionen V und VI entsprach ca. 370 % im Vergleich zur Gesamt-DNA, entsprechend einem absoluten ctDNA-Gehalt von mindestens 24 %. Die Ausbeute betrug ca. 0,6 µg.

Proben dieser angereicherten ncDNA und ctDNA wurden mittels ^{32}P -postlabeling (3.3.3) dünnschichtchromatographisch untersucht (Abb. 12A,B). Die Intensitäten der Signale von ^5mC und ^6mA wurden mittels PhosphorImager bestimmt und so wiederum die relativen Anteile der modifizierten Basen berechnet. Für ^5mC resultierte in der angereicherten ncDNA ein Anteil von 1,1 %, der ^6mA -Anteil lag bei 0,3 %. Die entsprechenden Werte für die angereicherte ctDNA lagen bei 0,8 % (^5mC) und 0,1 % (^6mA)(Tab. 14). Für eine Extrapolation des Methylierungsgrades in 100 % ctDNA standen nun jeweils drei Werte aus DNA-Präparationen mit 2 %, 6,5 % und 24 % ctDNA-Anteil für ^5mC und ^6mA zur Verfügung. Alle drei Werte reflektieren die Summe der Anteile modifizierter Basen in ctDNA/ncDNA-

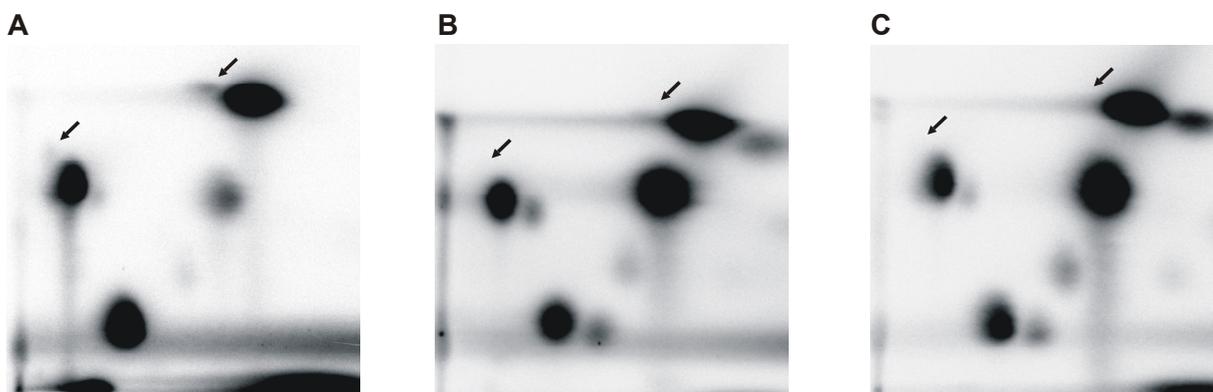


Abb. 12. Zweidimensionale dünnschicht-chromatographische Auftrennung ^{32}P -markierter Nucleosid-Monophosphate aus verschiedenen *Volvox*-DNA-Präparationen (HK10). **A.** angereicherte Kern-DNA. (Babinger, 1999) **B.** angereicherte Chloroplasten-DNA. **C.** Gonidien-DNA. Die Positionen des ^5mC - und ^6mA -Signals sind jeweils durch Pfeile markiert.

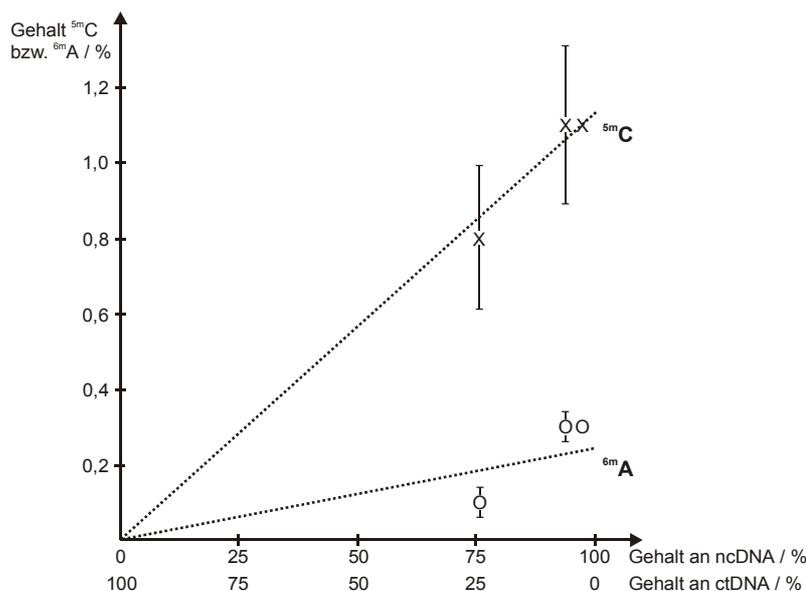


Abb. 13. Extrapolation des Gehalts modifizierter Basen in reiner ctDNA. Werte von ^{5m}C (X) und Werte von ^{6m}A (O) gekennzeichnet aus Tab. 14.

Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung. Die relative Abreicherung bei höherem ctDNA-Anteil gibt einen Hinweis auf nur geringe Mengen modifizierter Basen in ctDNA. Aufgrund der Unschärfe jeweils nur dreier relativ eng beieinanderliegender Messwerte können exakte Werte für die Mengen modifizierter Basen in 100 % ctDNA nicht berechnet werden. Eine Extrapolation unter diesen Einschränkungen führt zu einem Anteil von 0 % für ^{5m}C wie für ^{6m}A (Abb. 13).

Die ctDNA von *V. carteri* weist also keine (oder nur minimale) Methylierung von Cytosin und Adenin auf. Die gemessenen Werte von 1,1 % (^{5m}C) bzw. 0,3 % (^{6m}A) resultieren allein aus der Methylierung der ncDNA. Im Rahmen der Messgenauigkeit geben sie trotz der in den Proben noch enthaltenen 6,5 % bzw. 2 % ctDNA der Methylierungsgrad der ncDNA wieder.

4.1.3 Analyse von ^{5m}C und ^{6m}A in Gonidien-DNA

Coleman und Maguire (1982) beobachteten mit mikrospektrofluorometrischen Methoden einen enormen Anstieg des ctDNA-Gehalts während des Reifungsprozesses in Gonidien. Ein reifes Gonidium enthält demnach die bis zu 2300-fache ctDNA-Menge einer somatischen Zelle, ausreichend, um alle durch Teilung resultierenden somatischen Zellen eines Sphäroids mit einer ctDNA-Fraktion auszustatten. Danach würde ein Gonidium ca. 10^5 Chloroplasten-Genome enthalten (Kirk, 1998), und die ctDNA würde über 99 % der Gesamt-DNA in der Zelle ausmachen. Den Ergebnissen von Coleman und Maguire stehen jedoch Messungen von

Kochert (1975) durch analytische Ultrazentrifugation gegenüber, die den ctDNA-Gehalt in Gonidien 6-8 h vor Beginn der Teilungen mit 30 % angeben.

Das Problem dieser Diskrepanz wurde im Rahmen dieser Arbeit neu aufgerollt. Sollte die Beobachtung von Coleman und Maguire zutreffen, wäre die Isolierung von DNA aus reifen Gonidien eine (im Gegensatz zur Dichtegradientenzentrifugation; 4.1.2) einfache Methode, fast reine ctDNA zu gewinnen. Träfe das Konzept von Kochert zu, dann könnte man zusätzliche Erkenntnisse über den Methylierungsgrad der ncDNA in Gonidien gewinnen.

Aus 20 l einer *V. carteri* HK10 - Kultur wurden über ein Percoll-Kissen (3.7) reife Gonidien abgetrennt. Um den Anteil somatischer Zellen zu reduzieren, wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt und anschließend die Gonidien mehrmals auf einem Nitex-Filter mit 10 µm Maschenweite gewaschen. So wurde ein Verhältnis von Somazellen : Gonidien-Zellen von ~1:1 erreicht. Aus dieser Gonidien-Präparation wurde die DNA isoliert und durch PCR der Anteil an ctDNA bestimmt (4.1.2). Der resultierende ctDNA-Anteil betrug 15 %. Berücksichtigt man die Rate somatischer Zellen mit 50 %, dann ergibt sich ein ctDNA-Anteil in Gonidien von rund 30 %, was dem von Kochert (1975) beobachteten Wert entspricht.

Die Gonidien-DNA wurde isoliert und durch ^{32}P -*postlabeling* und Dünnschichtchromatographie auf die Anteile an modifizierten Basen untersucht. Die quantitative Auswertung der Signale (Abb. 12C, Pfeile) ergab einen Anteil von 0,5 % 5mC , aber kein eindeutiges 6mA -Signal. Eine Messung der 6mA -Position im Chromatogramm ergab Werte < 0,1 %. Gonidien-ncDNA enthält also deutlich geringere (~50 %) Anteile an modifizierten Basen; dabei ist aber der vier- bis fünfmal höhere Anteil an (nichtmodifizierter) ctDNA zu berücksichtigen, wodurch scheinbar geringere Werte resultieren.

Der gemessene Gehalt an 5mC und 6mA aller untersuchten DNA-Proben ist in Tab. 14 zusammengefasst.

Tab. 14. Gehalt von ^{5m}C und ^{6m}A in Bakterien- und Algen-DNA

DNA-Probe	% ^{5m} C ^{a, c}	% ^{6m} A _{exp} ^{a, b, c}	% ^{6m} A _{corr} (^{6m} A _{exp} x F) ^b
pSK ⁻ (<i>E. coli</i> DH10B; <i>dam</i> ⁺ , <i>dcm</i> ⁺)	0,69 ± 0,02 (3)	2,75 ± 0,06 (3)	2,04
<i>V. carteri</i> HK10 Gesamt-DNA (6.5% ctDNA) ^{d, h}	1,1 ± 0,21 (4)	0,4 ± 0,05 (4)	0,3 ± 0,04
<i>V. carteri</i> HK10 angereicherte ncDNA (2% ctDNA) ^{e, h}	1,1 (1)	0,4 (1)	0,3
<i>V. carteri</i> HK10 angereicherte ctDNA (≥24% ctDNA) ^f	0,8 ± 0,19 (3)	0,1 ± 0,05 (3)	0,1 ± 0,04
<i>V. carteri</i> HK10 Gonidien-DNA (15% ctDNA) ^g	0,5 ± 0,08 (2)	<0,1 ± 0,01 (2)	<0,1 ± 0,01
<i>V. carteri</i> Poona Gesamt-DNA	0,8 ± 0,10 (2)	0,4 ± 0,08 (2)	0,3 ± 0,06
<i>C. reinhardtii</i> 302cw15 ^{+ h} Gesamt-DNA	0,7 (1)	0,40 (1)	0,30

^a Zur Bestimmung der Anteile von ^{5m}C und ^{6m}A in den DNAs wurden die Radioaktivitäten der methylierten (p^mdN) und unmethylierten (pdN) Nukleotide nach Dünnschichtchromatographie durch *Phosphorimaging* gemessen und zueinander in Relation gesetzt gemäß:

$$\%p^m dN = \frac{p^m dN}{p^m dN + pdN} \times 100$$

^b Der Korrekturfaktor F=0,74 resultiert aus dem Verhältnis des für pSK⁻ experimentell bestimmten Werts ^{6m}A_{exp} zum theoretischen Sequenzwert (Dam-Methylierung von C⁺ATG)

^c Die Werte geben den Durchschnitt von (n) Experimenten ± mittlere Abweichung wieder.

^d Anteil an ctDNA gemäß (Kochert, 1975).

^e DNA aus den Fraktionen I und II (Abb. 11A). Der Restgehalt an ctDNA (2%) wurde aus den PCR-Daten berechnet (Abb. 11B)

^f DNA aus den Fraktionen V und VI (Abb. 11C). Der Gehalt an ctDNA wurde aus den PCR-Daten berechnet (Abb. 11D)

^g DNA aus einer Gonidien-Präparation. Der Gehalt an ctDNA wurde ebenfalls durch PCR bestimmt.

^h Werte nach Babinger (1999)

4.2 Charakterisierung des Gens *met1* für DNA-Methyltransferase von *V. carteri*

In der DNA von *V. carteri* HK10 liegen ca. 1,1 % des Cytosins methyliert vor. Eine Funktion der Cytosin-Methylierung ist das Stilllegen von Fremd-DNA (Babinger et al., 2001). Um Art und Funktion der DNA-Methylierung bei *Volvox* besser verstehen zu können, sollten genetische und enzymatische Grundlagen dieses Vorgangs studiert werden. Der erste Schritt dahin wäre die Charakterisierung des codierenden Gens *met1* für die DNA-Methyltransferase, die für die Aufrechterhaltung der CpG-Methylierung sorgt. Überexpression und/oder Abschaltung des Gens sollten Hinweise auf die biologische Funktion der CpG-Methylierung bei *Volvox* geben. Nachdem bisher nur Methyltransferasen von höheren Pflanzen charakterisiert wurden, könnten aus dem *met1*-Gen einer Grünalge wie *V. carteri* ferner Einsichten in die evolutionäre Entwicklung der DNA-Methylierung und der daran beteiligten Enzyme gewonnen werden.

4.2.1 Gewinnung einer *met1*-Sonde mittels PCR

DNA-Cytosin-Methyltransferasen weisen im Gegensatz zu Adenin-Methyltransferasen eine hochkonservierte C-terminale Methyltransferase-Domäne von ca. 500 AS Länge auf, die N-terminale Domäne ist deutlich weniger konserviert (Abb. 14). Selbst zwischen Pro- und Eukaryonten besteht hohe Homologie von acht konservierten Motiven. Motiv I und X sind an der Bindung des Methyl donors S-Adenosylmethionin beteiligt, Motiv IV bildet das aktive

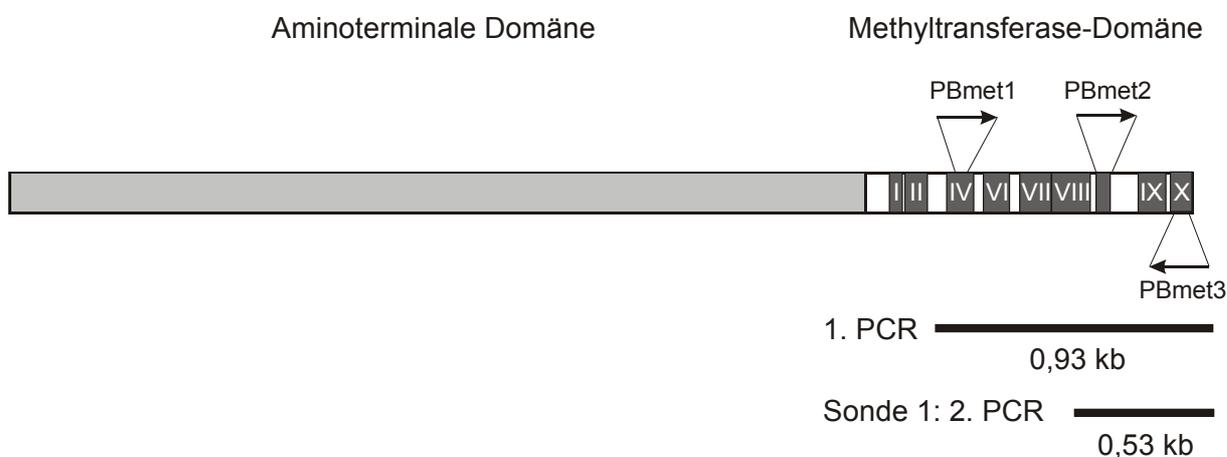


Abb. 14. Schematische Genkarte von *met1* mit konservierten Domänen. I-X (dunkelgrau), Konservierte Domänen (siehe Text); weiß, Methyltransferase-Domäne; hellgrau, aminoterminal Domäne. Die degenerierten Primer P_{met}1-3 und die mit ihnen amplifizierten PCR-Produkte sind abgebildet.

Zentrum. Der Bereich zwischen Motiv VIII und IX ist für die Erkennung der Zielsequenz verantwortlich und enthält weitere konservierte Bereiche. Die Motive III und V fehlen bei Eukaryonten. Die hohe Konserviertheit der Motive bietet sich geradezu an, aus ihrem Bereich degenerierte Primer abzuleiten und zur Isolierung des Gens mittels PCR zu verwenden. Dazu wurde mit den publizierten Aminosäuresequenzen von 15 ausgewählten eukaryotischen, pflanzlichen und tierischen Methyltransferasen mit dem Programm PILEUP (GCG-Paket) ein *multiple alignment* erstellt (Abb. 15) und geeignete degenerierte Primer abgeleitet. Aus einer cDNA-Genbibliothek in λ ZAP Express (B. Cresnar, pers. Mitteilung) isolierte λ -DNA diente als Matrize für die PCR. Mit den Primern PBmet1 und PBmet2 konnte so ein 0,93 kb großes Fragment amplifiziert werden. Zur Erhöhung der Spezifität wurde es mit dem Primer PBmet2 und dem weiter innen (*nested*) liegenden Primer PBmet3 reamplifiziert (Abb. 14). Das

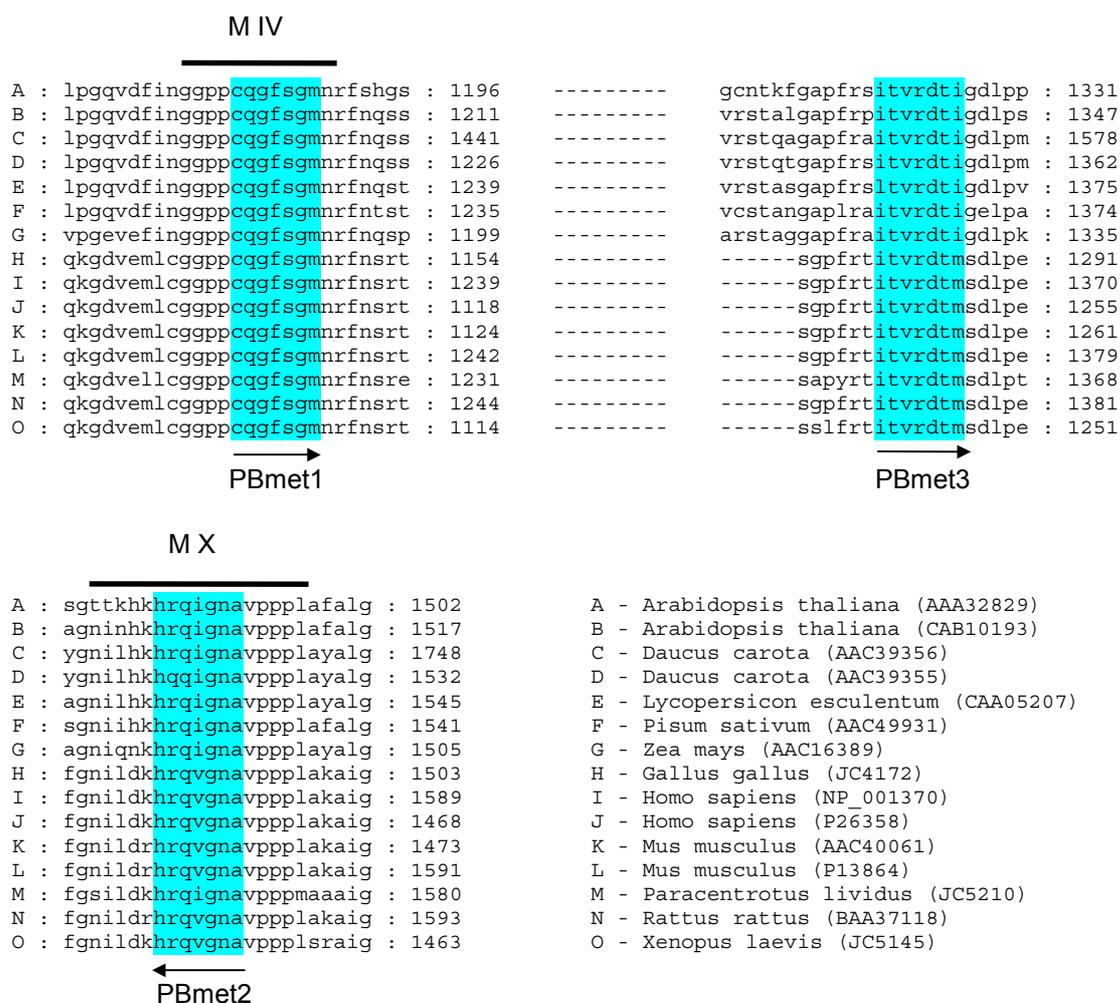


Abb. 15. Teilabschnitte eines *alignment* von 15 Methyltransferase-Proteinsequenzen unterschiedlicher Spezies (siehe Legende rechts unten, *GenBank Accession No.* in Klammern). M IV, M X, Methyltransferase-Motive, Pbm1-3, abgeleitete degenerierte Primer (vgl. Tab. 3); blau hinterlegt, hochkonservierte Bereiche, von denen die Primer abgeleitet wurden.

Produkt dieser zweiten PCR wurde in den pGEM™-Vektor kloniert (pmet5/8) und sequenziert. Eine BLAST-Suche gegen die NR-Datenbank am NCBI ergab, dass die abgeleitete Peptid-Sequenz 72 % Identität zu bekannten Methyltransferasen hatte. Dieses 530 bp große DNA-Fragment, im folgenden als „Sonde 1“ (Abb. 14) bezeichnet, wurde für das *screening* einer genomischen und einer cDNA-Genbibliothek von *V. carteri* eingesetzt.

4.2.2 *Screening* einer genomischen und cDNA-Genbibliothek, Sequenzanalyse

Für das *screening* einer cDNA-Genbibliothek, die im λ -Vektor ZAP Express vorliegt (B. Cresnar, pers. Mitteilung), wurden in der ersten Runde 130.000 Phagen eingesetzt und mit Sonde 1 (Abb. 14) getestet. Es wurden vier positive *plaques* erhalten. Zur Isolierung einzelner λ -Klone wurde eine zweite *screening*-Runde durchgeführt. Aus je einem der erhaltenen positiven λ -Klone wurde mit dem ExAssist™ Helferphagen *in vivo* das Plasmid pBK-CMV mit der integrierten cDNA herausgeschnitten (3.2.8). Die so gewonnenen vier Klone wurden durch Restriktionskartierung und Sequenzanalyse charakterisiert. Die Sequenzen zweier Klone ergaben in einer BLAST-Suche hohe Übereinstimmung mit den *C. reinhardtii*-Genen für Alternative Oxidase (*GenBank Accession No.* AF047832) bzw. Alanin-Transaminase (*GenBank Accession No.* U31975), wiesen aber keine Methyltransferase-Motive auf. Dagegen wurden die Klone c2-4 und c4-5 als Methyltransferase-Genfragmente identifiziert. Der nach Restriktionsanalyse und Ansequenzierung längere Klon c2-4 wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt und doppelsträngig durchsequenziert. Er enthielt einen 2.746 bp langen Abschnitt der *met1*-cDNA, der mit PolyA endet und die 1.209 bp lange 3'-NTR sowie 1.537 bp des codierenden Bereichs umfasst. Bereits bekannte pflanzliche Methyltransferasen haben eine Größe von ca. 1.500-1.700 AS, entsprechend ca. 4,5-5 kb codierender Sequenz. Unter der Annahme, dass die *Met1*-codierende Sequenz von *V. carteri* eine ähnliche Größe hat, deckt der cDNA-Klon c2-4 ca. ein Drittel des gesamten codierenden Bereichs und somit fast die gesamte Methyltransferase-Domäne ab (Abb. 16). Um längere cDNA-Klone zu erhalten, wurde ein weiteres *screening* der cDNA-Genbibliothek durchgeführt und positive λ -Klone durch einen PCR-Schnelltest analysiert, jedoch ohne Erfolg (Cakstina, 2001).

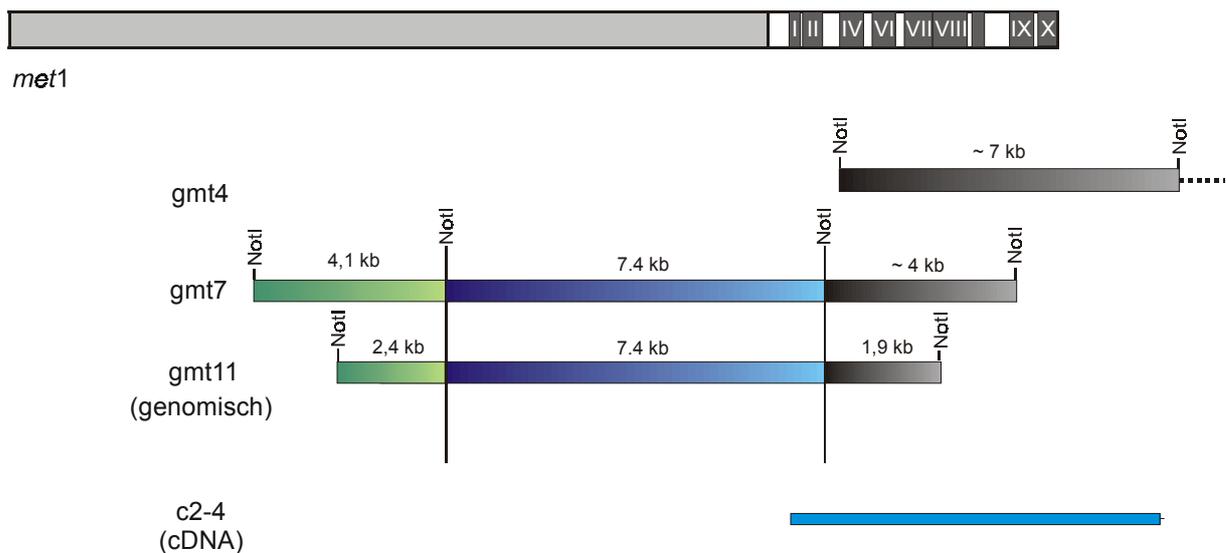


Abb. 16. Schema des *met1*-Gens (vgl. Abb. 14) mit drei genomischen Klonen und einer partiellen cDNA. Die Klone gmt4, gmt7 und gmt11 wurden aus einer genomischen *Volvox*-Genbibliothek (Kirk et al., 1999) isoliert, der Klon c2-4 stammt aus einer cDNA-Bibliothek von *V. carteri* HK10 (B. Cresnar, pers. Mitteilung). Relevante Restriktionsschnittstellen (*NotI*) und die Fragmentlängen sind angegeben.

Zum *screening* einer genomischen *V. carteri*-Genbibliothek in λ DASH II (Kirk et al., 1999) mit Sonde 1 wurden 50.000 Phagen eingesetzt. Aus der ersten *screening*-Runde gingen 13 potentiell positive *plaques* hervor, drei davon (gmt4, gmt7 und gmt11) erwiesen sich auch in der zweiten Runde als positiv. Die DNA dieser λ -Klone wurde mittels Restriktionskartierung analysiert. Es stellte sich heraus, dass gmt11 vollständig in gmt7 enthalten ist und dass beide mit gmt4 überlappen (Abb. 16). Von allen drei λ -Klonen wurden Subklone hergestellt und partiell sequenziert, so dass eine zusammenhängende genomische Sequenz etabliert werden konnte. Um auszuschließen, dass zwischen zwei aneinandergrenzenden Subklonen ein Sequenzabschnitt verloren gegangen war (aufgrund von zwei eng benachbarten Schnittstellen eines verwendeten Enzyms), wurden solche Bereiche durch PCR direkt aus dem λ -Klon und Sequenzierung abgesichert. Soweit möglich, wurden jedoch überlappende Subklone für die Sequenzbestimmung herangezogen.

Die erhaltene genomische Sequenz wurde mit der vorhandenen cDNA-Sequenz abgeglichen und so die Lage der Exons und Introns festgelegt. Im 5'-Bereich, für den noch keine cDNA-Information vorhanden war, wurden durch Datenbankvergleiche potentielle Exons lokalisiert. Die Datenbankvergleiche ergaben des weiteren, dass auch der am weitesten *upstream* reichende λ -Klon gmt7 nicht das 5'-Ende des *met1*-Gens enthält. Dies ergab die Notwendigkeit eines erneuten *screening* der genomischen Genbibliothek.

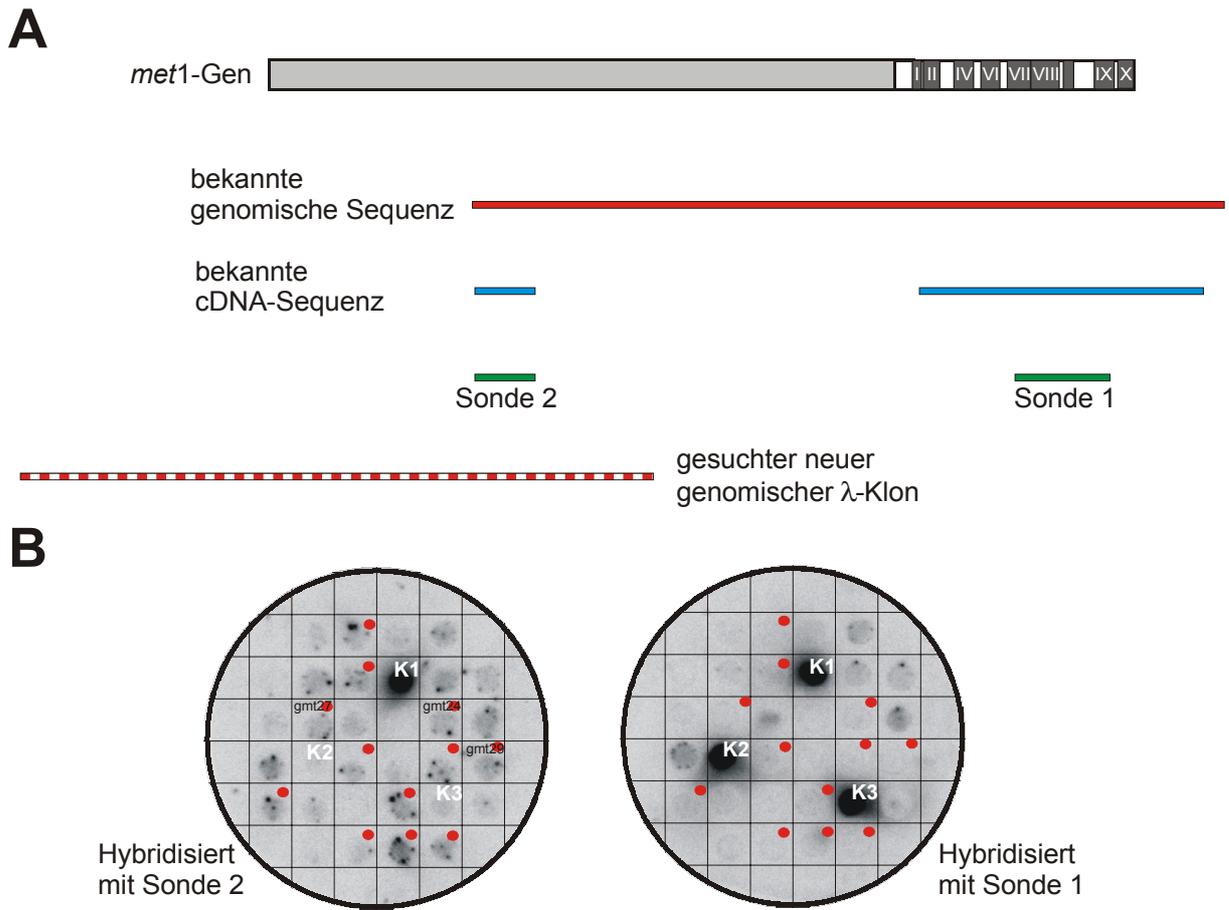


Abb. 17. Differentielle *screening*-Strategie zur Isolierung neuer λ -Klone aus einer genomischen *Volvox*-Genbibliothek. **A.** Schema des *met1*-Gens (Abb. 14) mit Kennzeichnung der bereits sequenzierten genomischen (roter Balken) und cDNA-Bereiche (blaue Balken) (vgl. Abb. 15) sowie der Sonden 1 und 2 (grüne Balken). **B.** Durch Hybridisierung mit Sonde 2 isolierte λ -Klone wurden zusammen mit Kontroll-Klonen (K1-K3) kultiviert, auf Nylon-Membranen übertragen und mit Sonde 1 (rechts) und Sonde 2 (links) auf Hybridisierung getestet (siehe Text). Rote Punkte, nur mit Sonde 2, nicht mit Sonde 1 hybridisierende Klone; gmt24, gmt27, gmt29, weiterverwendete Klone.

Aus zwei geeigneten, durch Datenbankvergleiche gewonnenen, potentiellen Exons wurden Primer gewählt, um damit mittels RT-PCR (3.3.2) eine weiter 5' gelegene cDNA-Sonde zu gewinnen (Cakstina, 2001). Als Matrize wurde mRNA eingesetzt, die aus mehreren synchronen *V. carteri*-Kulturen 0-10 Stunden nach Beginn der Embryogenese gewonnen worden war (3.2.6). Das 713 bp große PCR-Produkt *emt1/2* wurde durch Sequenzierung und Datenbankvergleich als *met1*-spezifisch bestätigt und als „Sonde 2“ verwendet (Abb. 17A). Mit dieser Sonde wurde erneut ein *screening* mit 200.000 Phagen durchgeführt und 29 positive *plaques* identifiziert. Um den Aufwand mehrerer Runden mit allen Klonen zu reduzieren, wurde eine differentielle *screening*-Strategie verfolgt (Abb. 17B). *E. coli* NM538 wurde dazu ohne Phagen mit Top-Agar auf LB-Platten ausgebracht (vgl. 3.1.3.2). Auf die so vorbereiteten Platten wurden 1 μ l-Proben der Phagenlysate der 29 positiven *plaques* sowie

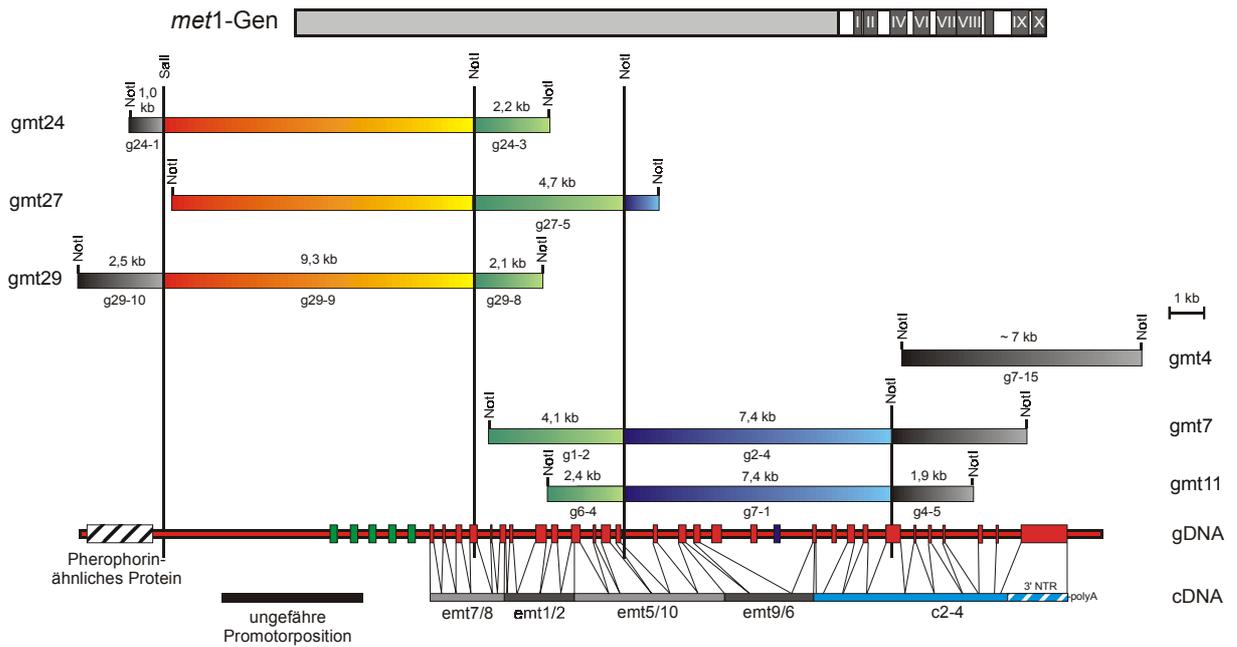


Abb. 18. Struktur von *met1* aus *V. carteri*. Unter einem Schema der *Met1* (vgl. Abb. 14) sind die sechs überlappenden λ -Klone *gmt4* (Teilfragment), *gmt7*, *gmt11*, *gmt24*, *gmt27* und *gmt29* dargestellt. Wichtige Restriktionsschnittstellen (*NotI*, *Sall*) und Subklone sind angegeben. Der rote Balken darunter symbolisiert den sequenzierten genomischen Bereich. Aus der cDNA abgeleitete Exons sind durch breitere, rote Kästchen markiert, durch *gene finding*-Programme zusätzlich abgeleitete Exons durch grüne und blaue Kästchen. Die Lage des Gens eines Pherophorin-ähnlichen Proteins ist durch schwarze Schraffierung gekennzeichnet. Die cDNA-Klone *c2-4* (blauer Balken, 3'NTR schraffiert), *emt1/2*, *emt7/8*, *emt5/10* und *emt9/6* (verschiedene Grautöne) sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Die ungefähre Lage des Promotors ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet.

von drei Kontroll-Phagenlysaten (K1-K3) im Raster aufgetragen. (K1 kann sowohl mit Sonde 1 als auch mit Sonde 2 hybridisieren, K2 und K3 nur mit Sonde 1). Nach ÜN-Bebrütung wurden *plaque lifts* (3.8.3) auf zwei Membranen durchgeführt. Eine der Membranen wurde mit Sonde 1 getestet, die andere mit Sonde 2. Diejenigen λ -Klone, die ein Hybridisierungssignal mit Sonde 2, nicht aber mit Sonde 1 ergaben, sollten den 5'-Bereich des *met1*-Gens abdecken. Auf diese Weise wurden die Klone *gmt24*, *gmt27* und *gmt29* zur Weiterarbeit ausgewählt und in einer zweiten *screening*-Runde sauber vereinzelt. Die DNAs dieser drei Klone wurden mittels Restriktionsanalysen kartiert, geeignete Subklone gewonnen und jeweils sequenziert. Die Sequenzen wurden daraufhin mit denen der bereits vorhandenen Klone *gmt4*, *gmt7* und *gmt11* abgeglichen. Mit den sechs genomischen Klonen war, wie sich herausstellte, das gesamte *met1*-Gen abgedeckt (Abb. 18).

Parallel zur genomischen Sequenz wurden Strategien verfolgt, um die cDNA-Sequenz zu vervollständigen. Der Versuch, die noch bestehende Lücke zwischen *emt1/2* (Sonde 2) und *c2-4* (Abb. 18) durch RT-PCR zu schließen, führte – vermutlich aufgrund der zu großen

Distanz oder der zu geringen Repräsentanz der *met1*-mRNA in der Gesamt-mRNA – nicht zum Erfolg. Nachdem der fehlende Bereich genomisch sequenziert worden war, wurden durch Datenbankvergleiche der genomischen Sequenz potentielle Exonbereiche vorhergesagt und neue Primer für die RT-PCR abgeleitet. Durch Aufteilung der Lücke zwischen *emt1/2* und *c2-4* wurden auf diese Weise die beiden cDNA-Fragmente *emt5/10* (688 bp) und *emt9/6* (620 bp) erhalten. Ebenso konnte durch Vorhersage von Exonbereichen und Wahl entsprechender RT-PCR-Primer das weiter 5' gelegene Fragment *emt7/8* (727 bp) amplifiziert werden (Abb. 18).

Trotz dieser Fortschritte konnte nicht die gesamte cDNA erhalten werden: Ein 5'-Sequenzbereich von geschätzten 1,3-1,8 kb blieb offen. Die aminoternale Domäne der Methyltransferasen ist nur schwach konserviert, weshalb die Identifizierung von Exons über Datenbankvergleiche in diesem Bereich nicht möglich war. Versuche, den 5'-Abschnitt der cDNA mittels 5'RACE zu erhalten, waren nicht erfolgreich, möglicherweise wegen der geringen Mengen an *met1*-mRNA. Andererseits steht fest, dass das *met1*-Gen vollständig durch die vorhandenen λ -Klone abgedeckt ist, weil Datenbankvergleiche der *upstream* gelegenen Sequenz der λ -Klone *gmt24* und *gmt29* ergaben, dass dort ein neues Gen mit großer Ähnlichkeit zu Pherophorinen (Godl et al., 1995) beginnt (*Accession No.* CAA57826, P81132, CAD22154, P81131, vgl. Abb. 18).

Die bisher bekannte cDNA-Sequenz umfasst 5,6 kb, davon 4,4 kb codierende Sequenz, mit einer Kapazität für 1468 AS-Reste. Der Großteil der bekannten Methyltransferasen umfasst 1500-1700 AS-Reste, die mit Met1 verwandte Methyltransferase Cmt2 aus *C. reinhardtii* besteht vermutlich aus 1981 AS. Von größeren Teilen des 5'- und 3'-Bereichs des *C. reinhardtii*-Gens fehlt allerdings noch cDNA-Information. Die Proteinsequenz in diesen Bereichen ist mittels *gene finding*-Programmen vorhergesagt, Sequenz und Größe des Proteins sind deshalb nicht gesichert (J. Umen, pers. Mitteilung). Die Länge der für *V. carteri met1* noch fehlenden Sequenz zwischen Startcodon und dem Beginn der bereits bekannten cDNA-Sequenz liegt demnach zwischen 100 und 1.500 bp.

Die Anwendung des *gene finding*-Algorithmus von Fickett (1982) (Programm TestCode, GCG-Paket) auf die genomische Sequenz im fraglichen Bereich lässt auf das Vorhandensein von vier bis sechs weiteren Exons schließen (Abb. 19, grün markierte Bereiche in Abb. 18). TestCode bewertet die positionsspezifische Häufigkeit des Auftretens der Basen im Vergleich zu einer Zufallssequenz gleicher Basenzusammensetzung. Liegt die Bewertung über einer oberen Schwelle, ist ein Exon an dieser Position sehr wahrscheinlich, liegt sie unter einer

unteren Schwelle, kann ein Exon nahezu ausgeschlossen werden. Die in Abb. 19 (unten) markierten Exons III-VI besitzen relativ hohe Wahrscheinlichkeit, Exon II hat zwar eine gute TestCode-Bewertung, aber es enthält in allen drei Leserahmen zahlreiche Stop-Codons. Exon I wiederum erfüllt alle nötigen Kriterien. Weiter *upstream* wurden auch mit anderen *gene finding*-Programmen keine signifikanten Exons gefunden. Die hier prognostizierten Exons umfassen ca. 1,3-2,0 kb und würden damit dem anhand der Länge der verwandten Methyltransferase von *C. reinhardtii* erwarteten Wert entsprechen. Es ist geplant, mit neuen Primern aus diesen Bereichen durch RT-PCR die cDNA soweit möglich zu vervollständigen und das dann noch fehlende 5'-Ende der cDNA mit 5'-RACE zu identifizieren.

Anhand der bisher bekannten cDNA- und genomischen Sequenzen konnten – unter Berücksichtigung der *Volvox*-typischen Konsensus-Sequenz für Exon-Intron-Übergänge, G/GTRRG--(Intron)--CAG/N (Stark, 1999) – die Grenzen der Exons exakt festgelegt werden. Die meisten Übergänge entsprachen (mit geringen Abweichungen) diesem Konsensus. Bei drei Introns gab es jedoch deutliche Abweichungen, auch treten an zweien diesen Stellen Leserastersprünge in der cDNA-Sequenz auf. Vermutlich ist an diesen Stellen die durch RT-PCR gewonnene cDNA-Sequenz unvollständig, wahrscheinlich aufgrund der Ausbildung von

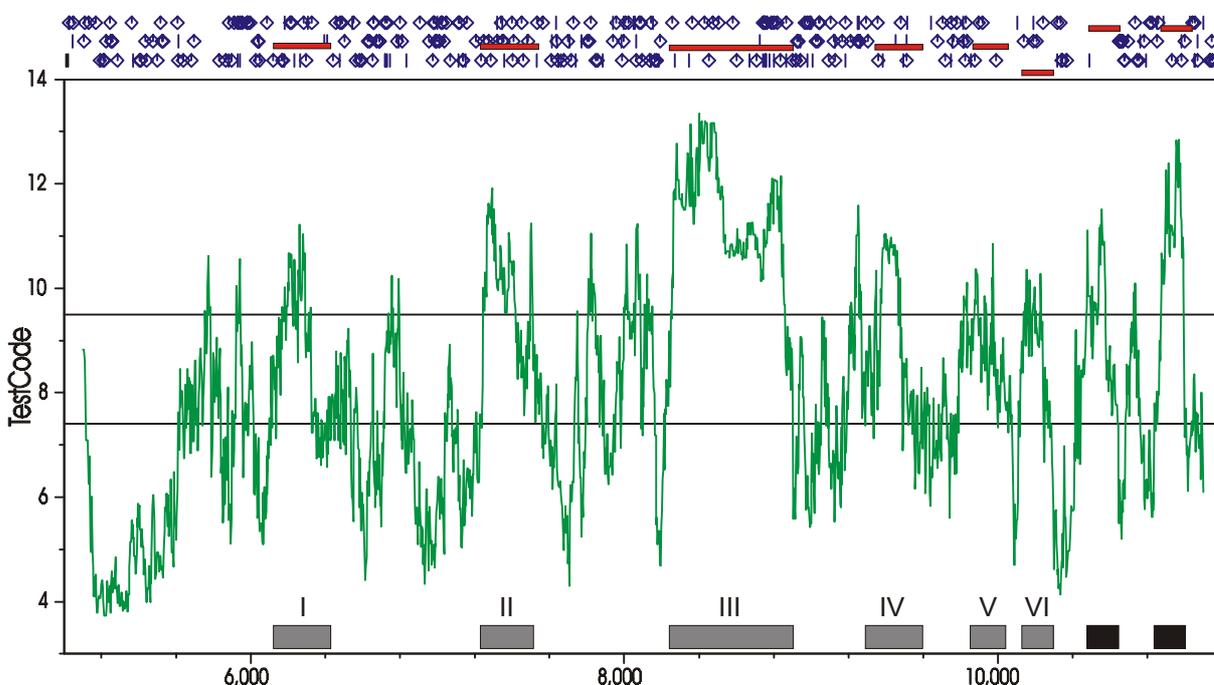


Abb. 19. Analyse der genomischen *met1*-Sequenz auf potentielle Exons mit TestCode (GCG-Paket). Grün, Bewertung der Exon-Wahrscheinlichkeit, liegt die Kurve über der oberen Linie, ist ein Exon in diesem Bereich wahrscheinlich. Blaue senkrechte Striche, Startcodons in den drei Leserahmen; blaue Rauten, Stopcodons. Schwarze Balken, Lage bereits bekannter Exons; graue Balken, vorhergesagte Exons; rote Linien oben: Übertragung der Exonpositionen in die Leserahmen; Nummerierung der Sequenz wie in Anhang A1.

RNA-Sekundärstrukturen bei der reversen Transkription. Datenbankvergleiche und Genstrukturvorhersage-Algorithmen ergaben, dass die an das Intron angrenzenden Exons weiter in das „Intron“ hineinreichen. Im dritten fraglichen Intron wurde durch Datenbankvergleiche ein potentiell Exon mit Homologie zu bekannten Methyltransferasen gefunden (blau markiert in Abb. 18). Auch hier ging somit offensichtlich cDNA-Information bei der RT-PCR verloren. Insgesamt weist das Gen somit mindestens 29, wahrscheinlich über 35 Exons auf.

Einige Teile der Sequenzaufklärung der Methyltransferase wurden von Inese Cakstina im Rahmen ihrer Master-Arbeit durchgeführt (Cakstina, 2001). Dies sind im einzelnen Teile der Subklonierung und Sequenzierung der genomischen λ -Klone gmt4, gmt7 und gmt11, die Isolierung und Sequenzierung des Klons c2-4 sowie die Gewinnung und Sequenzierung des cDNA-Abschnitts emt1/2.

Insgesamt wurde ein fast 30 kb langer Genomabschnitt großteils doppelsträngig sequenziert, *met1* umfasst davon mindestens 18,3 kb, wahrscheinlich bis zu 25 kb. Von der cDNA sind bisher 5,6 kb bekannt, davon sind 4,4 kb codierende Sequenz, der Rest enthält 3'NTR und PolyA-Signal. Zwei hochrepetitive Motive in Introns konnten nicht vollständig sequenziert werden. Die gesamte genomische und cDNA-Sequenz und die abgeleitete Peptidsequenz ist mit Anmerkungen zum Sequenzierungsgrad im Anhang (A1) enthalten.

4.2.3 Untersuchungen zur Expression und Funktion von Met1

Obwohl der *met1*-Promotor in der genomischen Sequenz noch nicht identifiziert werden konnte (4.2.2), kann man voraussagen, dass er eine sehr schwache Transkription initiiert: Sowohl die Schwierigkeit, durch die sehr empfindliche RT-PCR zu einer vollständigen cDNA zu gelangen (4.2.2) als auch das Ausbleiben von *Northern*-Signalen sowohl mit Gesamt-RNA als auch mit mRNA aus synchron sowie asynchron gewachsenen *Volvox*-Kulturen (Cakstina, 2001) unterstreichen diese Vermutung. Dies entspricht Befunden mit dem Gen der Methyltransferase Cmt2 von *C. reinhardtii*, deren mRNA erst nach extrem langer Exposition ein äußerst schwaches Signal ergab (J. Umen, pers. Mitteilung).

Expressionsanalysen durch *Western-Blotting* waren aufgrund des Fehlens eines spezifischen Antikörpers bisher nicht möglich. Alle kommerziellen Antikörper gegen tierische Methyltransferasen erkannten laut Auskunft der Hersteller die Met1-Proteinsequenz von *V. carteri* nicht.

Die biologische Funktion des Met1-Enzyms könnte über *knock-out* Mutanten erforscht werden. Wegen der zu ineffizienten homologen Rekombination funktioniert diese Methode allerdings in *V. carteri* nicht (Hallmann et al., 1997). Deshalb wurde versucht, die *met1*-Expression durch die Einschleusung eines *antisense*-Konstrukts zu reduzieren (Cakstina, 2001). Bei einem Ausfallen der Methyltransferase-Aktivität sollte – falls es sich bei Met1 um eine Erhaltungsmethyltransferase handelt – eine genomweite Hypomethylierung mit zahlreichen Konsequenzen auf Genregulation und *silencing* von Transgenen und Transposons eintreten (4.3). Es wurden phänotypisch auffällige Transformanten erhalten, die Defekte in der Inversion und Gonidienentwicklung zeigten. Jedoch wurden solche Defekte auch bei Transformanten ohne das *Antisense*-Konstrukt beobachtet, wenn auch mit etwas geringerer Frequenz. Wiederholungen der Transformationsexperimente im Rahmen dieser Arbeit führten zu Reproduktion dieser uneindeutigen Ergebnisse. Ein Versuch, durch das *antisense*-Konstrukt eine Hypomethylierung des stillgelegtes *C-ars*-Reportergens in Hill 183 (ähnlich wie mit 5-Aza-Cytidin; 4.3.1.2) herbeizuführen und somit seine Reaktivierung zu erreichen, schlug ebenfalls fehl. Als Ursache ist eine nicht ausreichende Reduktion der ohnehin schon schwachen Expression des *met1*-Gens durch das *antisense*-Konstrukt anzunehmen.

Eine Überexpression des *met1*-Gens sollte zu einer schnelleren, vielleicht sogar erhöhten DNA-Methylierung in *Volvox* führen. Um eine massive Überexpression und somit einen starken Effekt zu erreichen, wurde der für die Methyltransferase-Domäne von Met1 codierende cDNA-Abschnitt hinter starke Promotoren kloniert. Bei pDnmt_oex_Tub kam der *Volvox* β 2-Tubulin-Promotor zum Einsatz, bei pDnmt_oex_HSR ein *hsp70/rbcS3*-Fusionspromotor (T. Jakobiak, pers. Mitteilung). Beide Konstrukte sind fertiggestellt, erste Transformationsexperimente befinden sich in der Durchführung.

Datenbanksuchen mit der *V. carteri met1*-Sequenz ergeben als beste Treffer pflanzliche Methyltransferasen der Met1/Dnmt1-Klasse. Von den meisten Vertretern dieser Familie wird angenommen, dass es sich um Erhaltungsmethyltransferasen handelt (Finnegan & Kovac, 2000). Eine Funktion von Met1 als Erhaltungsmethyltransferase ist daher naheliegend (vgl. 5.2).

4.3 Biologische Funktion der DNA-Methylierung bei *V. carteri*

4.3.1 Silencing von Transgenen

Wiederholt wurde nach Transformation von *Volvox* mit dem Selektionsmarker *nitA* beobachtet, dass zunächst im Selektionsmedium stabil wachsende Transformanten nach einigen Wochen absterben. Bei Co-Transformation mit einem nicht-selektionierten Transgen wie *ars* wurde zunächst Ars-Aktivität registriert, die nach einiger Zeit abnahm und völlig verschwand. So zeigten die Transformanten Hill 181 und Hill 183 (Kobl, 1993), die neben dem Selektionsmarker pVcNR1 (*nitA*) ein Konstrukt mit dem Arylsulfatase-Gen aus *C. reinhardtii* (*C-ars*) unter Kontrolle des starken, konstitutiven *Volvox* β 2-Tubulin-Promotors (Plasmid pIK2) enthielten, zunächst Ars-Aktivität. Mindestens eine intakt integrierte Kopie des Transgens wurde durch *Southern*-Analyse nachgewiesen. Bei einem erneuten Ars-Test nach sechs Jahren wies Hill 183 keine Ars-Aktivität des Transgens mehr auf, wohl aber Hill 181. Dieser Vorgang ist im Diagramm (Abb. 20) schematisch dargestellt. Die Ursache für den Aktivitätsausfall bei Hill 183 wurde daraufhin untersucht.

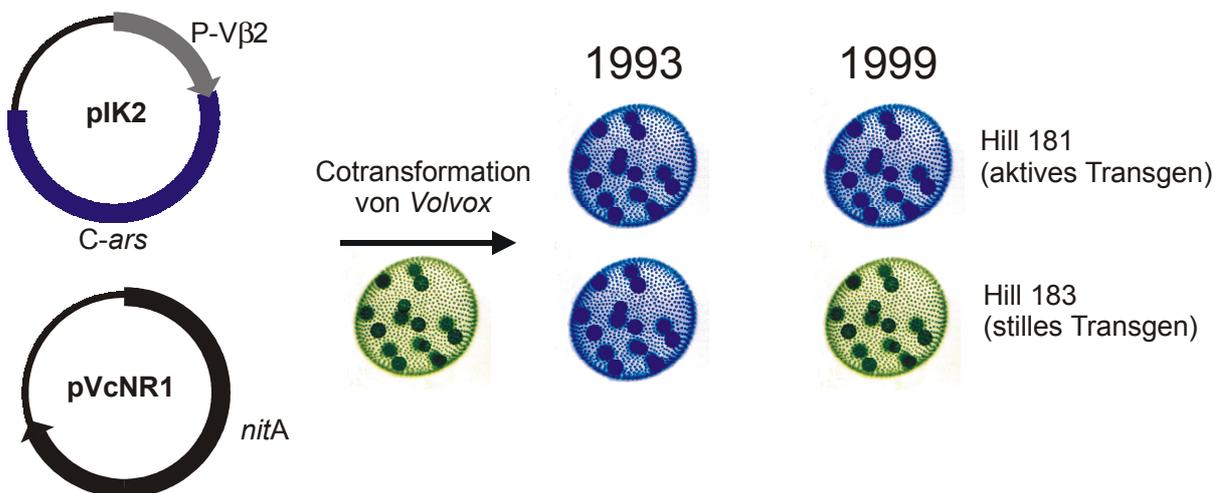


Abb. 20. Daueraktivität (Hill 181) und *silencing* (Hill 183) des *ars*-Transgens sechs Jahre nach Transformation von *V. carteri* 153-81. Links sind das selektierte (pVcNR1) und nicht-selektierte (pIK2) Plasmid, die für die Co-Transformation von *V. carteri* 153-81 eingesetzt wurden, gezeigt. Die unabhängig isolierten Co-Transformanten Hill 181 und Hill 183 wiesen 1993 den Phänotyp Ars⁺ auf (Blaufärbung; 3.11.1). Bei erneutem Test nach sechs Jahren war Hill 181 Ars⁺, Hill 183 dagegen Ars⁻, obwohl das Transgen noch integriert im Transformantengenom vorlag.

4.3.1.1 Molekulare Analysen des integrierten *C-ars*-Transgens: Concatemer-Bildung und Tandem-Integration

Der Verlust der Transgenfunktion bei Hill 183 kann zwei Ursachen haben: (1) Teilweiser oder vollständiger Verlust des *ars*-Transgens; (2) Modifikation der Fremd-DNA (und Chromatinkondensation). Beide Alternativen wurden hier untersucht.

Transformanten von *V. carteri* enthalten häufig mehrere Kopien der transformierenden Plasmid-DNA stabil ins Kerngenom integriert. Das trifft sowohl für Hill 181 wie Hill 183 zu, wie *Southern*-Analysen (Abb. 21) zeigen. Die DNA der Transformanten, des *Volvox* WT (HK10) und Kontroll-Plasmid-DNA wurde mit *SalI*, *BamHI* oder *SalI/BamHI* verdaut und nach elektrophoretischer Auftrennung und Membran-Transfer gegen zwei Sonden hybridisiert. Sonde I erkennt den P-V β 2-Promotor und Sonde II einen Großteil des codierenden Bereichs von *C-ars*. pIK2-Plasmid-DNA ergibt mit Sonde I Banden von 11,2 kb (*SalI*-Verdau) bzw. 3,8 kb (*SalI/BamHI*) und mit Sonde II Banden von 11,2 kb (*SalI*) bzw. 4,5 kb (*SalI/BamHI*) (Abb. 21A). Diese Banden treten erwartungsgemäß bei den Kontrollen im *Southern-Blot* auf (Abb. 21B; Spuren 3, 4, 10, 11). Ebenso hybridisieren 11,2 kb-, 4,5 kb- und 3,8 kb-Fragmente bei Hill 183-DNA (Abb. 21B; Spuren 5, 6) und Hill 181-DNA (Abb. 21B; Spuren 7, 8) mit starken Signalen. Beide Transformanten enthalten demnach das intakte Transgen in mehreren Kopien. Deshalb kann die fehlende Ars-Aktivität von Hill 183 nicht durch den Verlust des Transgens bedingt sein.

Wenn das Transgen über Bereiche in das Genom integriert, die von den Sonden abgedeckt werden, so müssen auch weitere Fragmente anderer Größe hybridisieren. So reflektiert das 6,3 kb - Fragment, das mit Sonde I in *SalI/BamHI* verdauter DNA von Hill 181 und 183 hybridisiert (Abb. 21B, Spuren 6 und 8), vermutlich eine solche Integration über den 3,8 kb großen Abschnitt, der den P-V β 2-Promotor enthält. Eine weitere, unabhängig integrierte Kopie von pIK2 könnte das 7,2 kb *SalI/BamHI*-Fragment in Spur 8 ebenso repräsentieren.

Zur Abschätzung der Kopienzahl des mehrfach integrierten Transgens wurde als Referenz die 5,8 kb *SalI*-Bande des als Einzelkopie vorliegenden endogenen β 2-Tubulin-Gen herangezogen (Abb. 21B; Spuren 1, 5-8, Sonde I). Zusätzlich wurden die DNAs der Plasmide pJD27 und pIK2 in einfachem (Abb. 21B, Spuren 2-4) und zehnfachem (Abb. 21B, Spuren 9-11) molaren Verhältnis zur genomischen DNA als Referenzen für die Interpolation der Signalintensitäten aufgetragen. Die Signalstärken der hybridisierenden Banden wurden in den mittels PhosphoImager gewonnenen Autoradiogrammen vermessen. Danach enthält Hill 181

24 (± 7) intakte Kopien des Transgens, Hill 183 enthält 7 (± 2). Diese Werte wurden zusätzlich durch *dot blot* – Analysen bestätigt (nicht gezeigt).

Doch wie liegen die Mehrfach-Kopien des Transgens in den Genomen vor? Starke, identische Banden mehrerer Kopien wurden bisher als Tandem-Integrationen des Transgens interpretiert. Gerade bei der biolistischen Transformation von *Volvox* werden solche Bandenmuster häufig

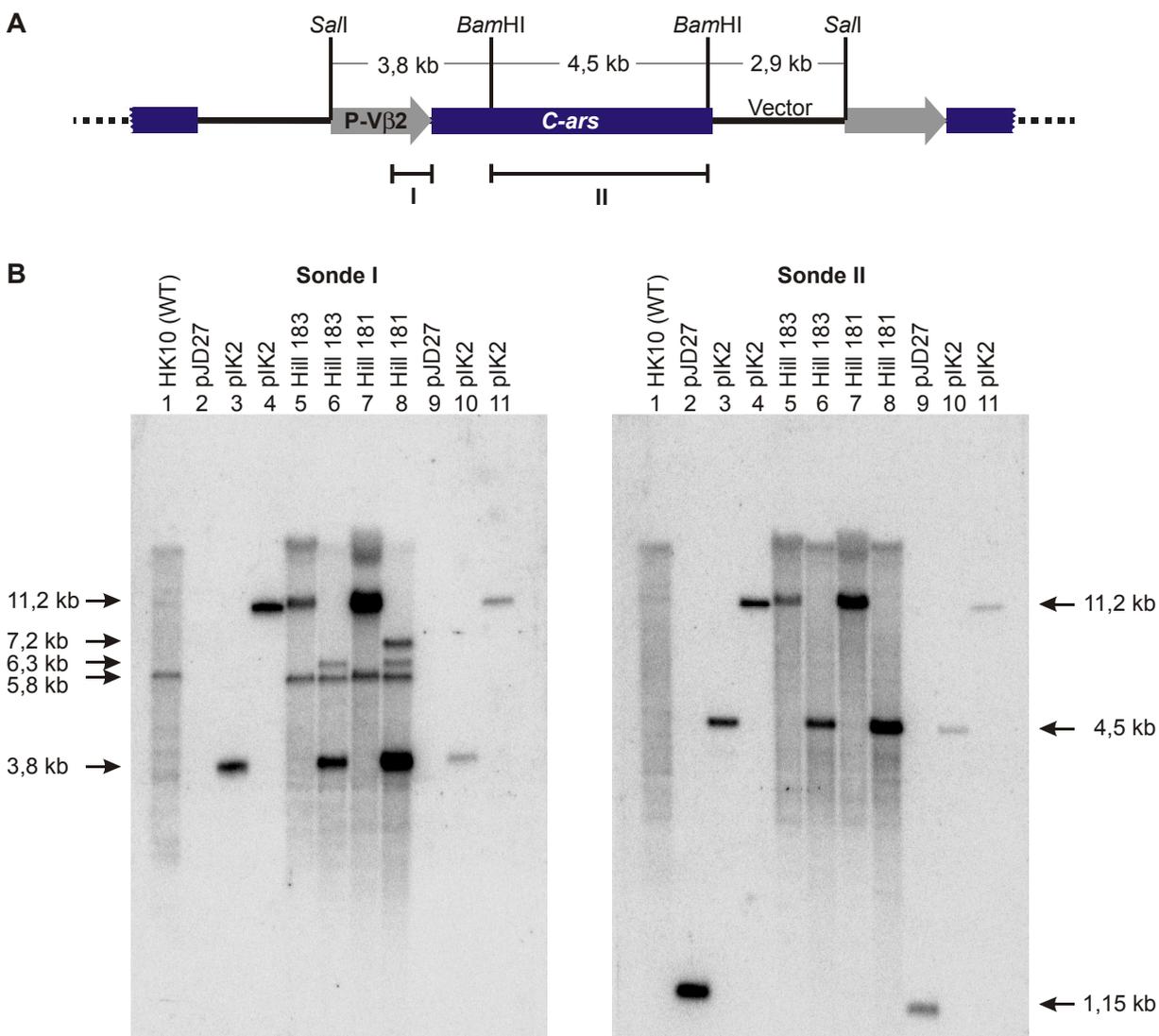


Abb. 21. Tandem-Struktur der integrierten *C-ars*-Kopien und *Southern*-Analyse der Transformanten. **A.** Postulierte Tandem-Anordnung der transgenen DNA in den Transformanten Hill 181 und Hill 183. Die Lage der verwendeten Sonden (I, II) ist eingezeichnet. P-V β 2, *Volvox* β 2-Tubulin-Promotor; *C-ars*, Arylsulfatase-Gen von *C. reinhardtii*. **B.** *Southern Blots* verschiedener genomischer *Volvox*-DNAs (Hill 181, Hill 183, HK10) und Kontroll-Plasmide (pIK2, pJD27). Die DNAs wurden wie folgt mit Restriktionsenzymen verdaut: Spuren 2,9, *Bam*HI; Spuren 4,5,7,11, *Sall*; Spuren 1,3,6,8,10, *Bam*HI/*Sall*. Von genomischer DNA wurden je 2 μ g je Spur aufgetragen, von den Plasmiden 1950 pg (pIK2) und 950 pg (pJD27), entsprechend zehn Kopien pro Genom (Spuren 2-4), bzw. 195 pg (pIK2) und 95 pg (pJD27), entsprechend einer Kopie pro Genom. Die Signalstärken der Banden (Phosphorimager) wurden zur Abschätzung der Kopienzahl des Transgens herangezogen. Die Bandengrößen (links und rechts angegeben) dienten zur Identifizierung der Fragmente (Babinger et al., 2001).

beobachtet (Schiedlmeier et al., 1994). Diese Vermutung ist am einfachsten durch *plasmid rescue* zu verifizieren. Fragmente eines *Sall*-Verdau der Gesamt-DNAs von Hill 181 und Hill 183 wurden durch Ligase zirkularisiert und nach Transformation von *E. coli* DH10B mittels Ampicillin auf replizierende Plasmide selektiert (3.10). Durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt, wurden in beiden Ansätzen vollständig intakte pIK2- und pVcNR1-Plasmide erhalten. Zusätzlich wurden auch Hybrid-Plasmide aus pIK2 und pVcNR1 identifiziert, die über ihren identischen, pUC-abgeleiteten Vektor-Anteil fusioniert waren (Abb. 22).

Die plausibelste Erklärung für diesen Befund lautet: Mehrere der zur Transformation eingesetzten Plasmide rekombinieren vor der Integration ins Genom zu einem zirkulären Concatemer. Da in allen untersuchten Fällen das Rekombinationsereignis im identischen Vektoranteil von pIK2 und pVcNR1 stattfand, sollte es sich um homologe Rekombination nach dem Campbell-Schema (Campbell, 1962) handeln. Die Integration ins Genom findet dagegen statistisch, d.h. nicht-homolog durch Einfach-*crossover* statt (Schiedlmeier et al., 1994). Danach liegen mehrere Kopien des Transgens als Tandem vor und führen bei Restriktion zu den beobachteten, starken Hybridisierungssignalen. Diejenige Kopie des Transgens, die bei der Integration des circulären Concatemers geteilt wird und dann links und

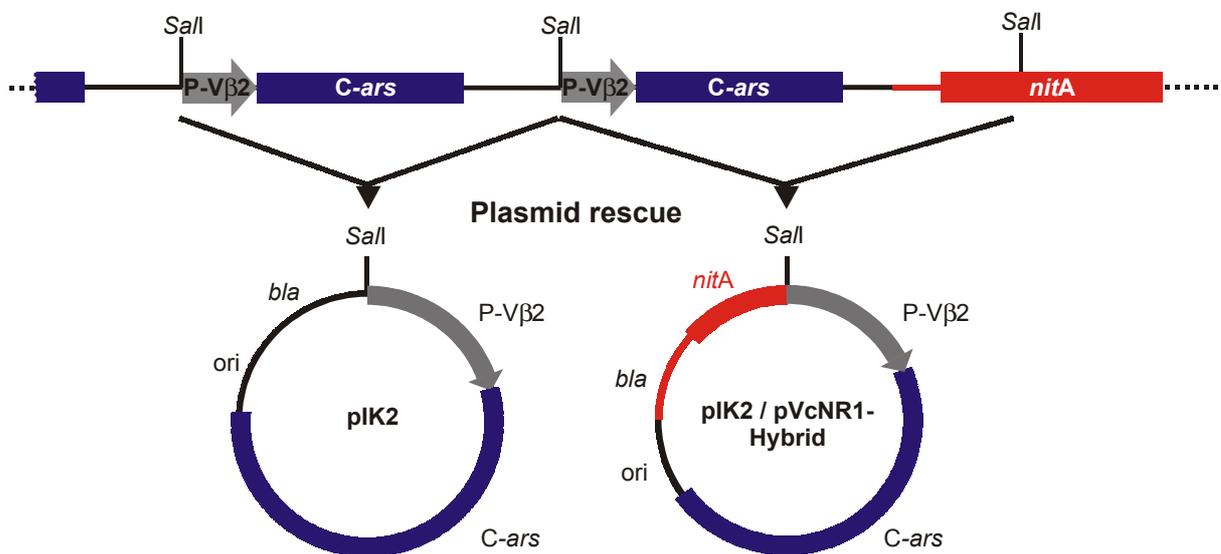


Abb. 22. Analyse der Tandem-Integration zweier Transgene (*C-ars*, *nitA*) durch plasmid rescue. Durch *Sall*-Verdau von Transformanten-DNA, anschließende Ligierung, Transformation von *E. coli* und Selektion auf Ampicillin wurden replizierende transgene Plasmid-DNAs zurückgewonnen. Die Struktur der Plasmide wurde durch Restriktionskartierung und Sequenzierung bestätigt. Das resultierende pIK2/pVcNR1-Hybridplasmid lässt darauf schließen, dass Plasmide vor der Integration ins Genom über ihre identischen pUC-abgeleiteten Vektoranteile (rot/schwarz) homolog zu Concatemeren rekombinieren können. Neben pIK2 und dem Hybrid wurde auch pVcNR1 isoliert (hier nicht gezeigt). Abkürzungen wie in Abb. 22; ori, *origin of replication*; bla, β -Lactamase-Gen; nitA, Nitratreduktase-Gen (Babinger et al., 2001).

rechts das Tandem-Integrat flankiert, ergibt die im *Southern Blot* beobachteten Zusatzbanden (7,2 und 6,3 kb, Spuren 6 und 8, Abb. 21B).

Sowohl Hill 181 als auch Hill 183 enthalten also intakte, vollständige Kopien von pIK2 in Tandem-Anordnung. Das Fehlen von Ars-Aktivität bei Hill 183 kann demnach nicht auf eine Beschädigung oder einen Verlust des Transgens zurückgeführt werden.

4.3.1.2 Reaktivierung eines stillen Transgens durch Methyltransferase- und Histon-deacetylase-Hemmer

Methylierung von DNA ist Folge oder Begleiterscheinung einer transkriptionell inaktiven Heterochromatinstruktur, die durch eine Deacetylierung der Histone H3 und H4 gekennzeichnet ist. Vor einigen Jahren wurde ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen den epigenetischen Prozessen der Histon-Deacetylierung und der DNA-Methylierung beschrieben (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998). Um experimentell in diesen Gen-Inaktivierungsmechanismus einzugreifen, bieten sich zwei Ansatzpunkte, nämlich die DNA-Methyltransferase und die Histon-Deacetylase. Für beide Enzyme gibt es Hemmstoffe, mit denen wiederholt stillgelegte Gene reaktiviert werden konnten: Das Basenanalogue 5-Azacytidin (AzaC) hemmt irreversibel Methyltransferasen (Klaas et al., 1989), während Trichostatin A (TSA) reversibel die Histondeacetylase inhibiert (Cameron et al., 1999).

Die *V. carteri*-Transformante Hill 183 wurde in Gegenwart von 0,2 mM bzw. 0,5 mM AzaC kultiviert und nach sechs Tagen qualitativ auf Ars-Aktivität überprüft (3.11.1). Das Experiment ist in Abb. 23 photographisch dokumentiert. Während die Kontroll-Kultur von Hill 181 mit XSO₄ eine kräftige Blaufärbung zeigte (Abb. 23B), war dies bei Hill 183 ohne AzaC nicht der Fall (Abb. 23D). In Gegenwart von 0,2 mM AzaC (Abb. 23E) stellte sich jedoch eine leichte, türkisblaue Färbung ein, die bei 0,5 mM AzaC (Abb. 23F) deutlich verstärkt auftrat. Das Ergebnis gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Aktivität des transgenen *ars* bei Hill 183 durch DNA-Methylierung „abgeschaltet“ wurde.

Zur Untersuchung eines Effekts des Deacetylase-Hemmers TSA wurden die *Volvox*-Stämme 153-81, Hill 181 und Hill 183 zehn Tage in Gegenwart von 0 nM, 100 nM und 500 nM TSA kultiviert. Die Ars-Aktivitäten wurden anschließend quantitativ bestimmt (3.11.2). Während 153-81 immer eine niedrige (endogene) und Hill 181 immer eine hohe Ars-Aktivität zeigte, stieg die bei Hill 183 gemessene Ars-Aktivität mit zunehmender TSA-Konzentration an (Tab. 15).

Beide Untersuchungen geben also gute Hinweise darauf, dass ein *silencing* des *C-ars*-Transgens durch DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung den Verlust der Ars-Aktivität von Hill 183 verursacht hatten.

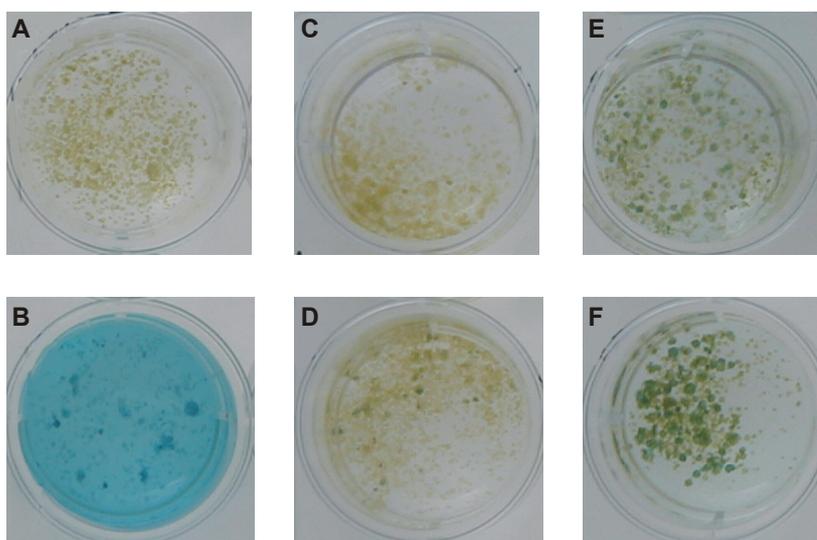


Abb. 23. Reaktivierung des stillen *C-ars* – Transgens in Hill 183. Die Ars-Aktivität wurde durch Zugabe von 0,3 mM XSO₄ sichtbar gemacht (Blaufärbung) **A.** Hill 181 **B.** Hill 181 +XSO₄ **C.** Hill 183 **D.** Hill 183 +XSO₄ **E.** Hill 183 +0,2 mM AzaC +XSO₄ **F.** Hill 183 +0,5 mM AzaC +XSO₄

Tab. 15. Reaktivierung des stummen *ars*-Transgens bei Hill 183 durch Inkubation mit Trichostatin A.

Stamm	Relative Ars-Aktivität ¹ bei		
	0 nM TSA	100 nM TSA	500 nM TSA
153-81	13	13	20
Hill 181	111	377	162
Hill 183	9	16	64

¹ Die relative Ars-Aktivität (*Ars_r*) wurde aus den OD₅₄₀-Werten des α-Naphthylsulfat-Tests (3.11.2) durch Normierung auf den Gehalt an Gesamt-Protein in jeder Probe gemäß

$$Ars_r = \frac{OD_{540}}{mg \text{ Gesamtprotein}}$$

berechnet.

4.3.1.3 Korrelation von Transgen-Inaktivierung und CpG-Methylierung

Die Ergebnisse der Reaktivierungsversuche (4.3.1.2) weisen auf Beteiligung von Cytosin-Methylierungen an der Inaktivierung des *C-ars*-Transgens in Hill 183 hin. Die Richtigkeit dieser Vermutung lässt sich direkt durch *bisulfite genomic sequencing* (3.3.4) des aktiven und stummen Transgens verifizieren. Da die sequenzspezifische Methylierung von Säuger- und Pflanzenpromotoren häufig mit Langzeit-Transkriptionshemmung einhergeht (Finnegan et al., 1998), war es von großem Interesse, erstmals das DNA-Methylierungsmuster bei einer Grünalge zu analysieren. Zwei Regionen am 5'- und am 3'-Ende des *C-ars*-Transgens wurden für die Analyse mittels *bisulfite genomic sequencing* ausgewählt.

Region I umfasst den essentiellen Teil des P-V β 2-Promotors, den Beginn des Exons I von *C-ars* und einen dazwischen liegenden, bei der Klonierung des Konstrukts entstandenen Linkerbereich. Region II deckt Exon 14 und Teile der beiden benachbarten Introns ab (Abb. 24A). Das Ergebnis der Bisulfit-Sequenzierung (Abb. 24B, C) ist mittels Säulen von 10 Kreisen je DNA-Strang veranschaulicht, die jeweils 10 unabhängige klonierte PCR-Produkte (und damit potentiell unabhängige Kopien des Transgens) repräsentieren. Da über 99 % des methylierten Cytosins in CpG-Dinukleotiden gefunden wurde, sind nur CpG-Positionen auf diese Weise markiert. Die Ergebnisse sind, aufgeschlüsselt für die einzelnen Abschnitte der beiden untersuchten Regionen, in Tab. 16 zusammengefasst. Tab. 17 führt den CpG-Methylierungsgrad jedes einzelnen PCR-Klons auf.

Das *bisulfite genomic sequencing* liefert folgende Erkenntnisse über die DNA-Methylierung in *C-ars*:

- Die Inaktivierung des Transgens in Hill 183 korreliert mit der Methylierung von CpG-Dinukleotiden im *C-ars*-Transgen. Der Methylierungsgrad ist bei Hill 183 zwischen 3,5x und 14x höher als in entsprechenden Sequenzbereichen von Hill 181.
- Die geringe Methylierung in Hill 181 ist nicht gleichmäßig auf alle Klone verteilt (Tab. 17). Vielmehr sind wenige Klone stark, die meisten jedoch gar nicht methyliert. Dies lässt auf zwei voneinander unabhängige Integrationen des Transgens (vermutlich jeweils in multipler Kopienzahl) schließen, von denen die eine methyliert ist, die andere nicht.
- Die DNA-Methylierung ist, wie bei Säugern, aber untypisch für Pflanzen (Finnegan et al., 1998), auf CpG-Dinukleotide beschränkt.

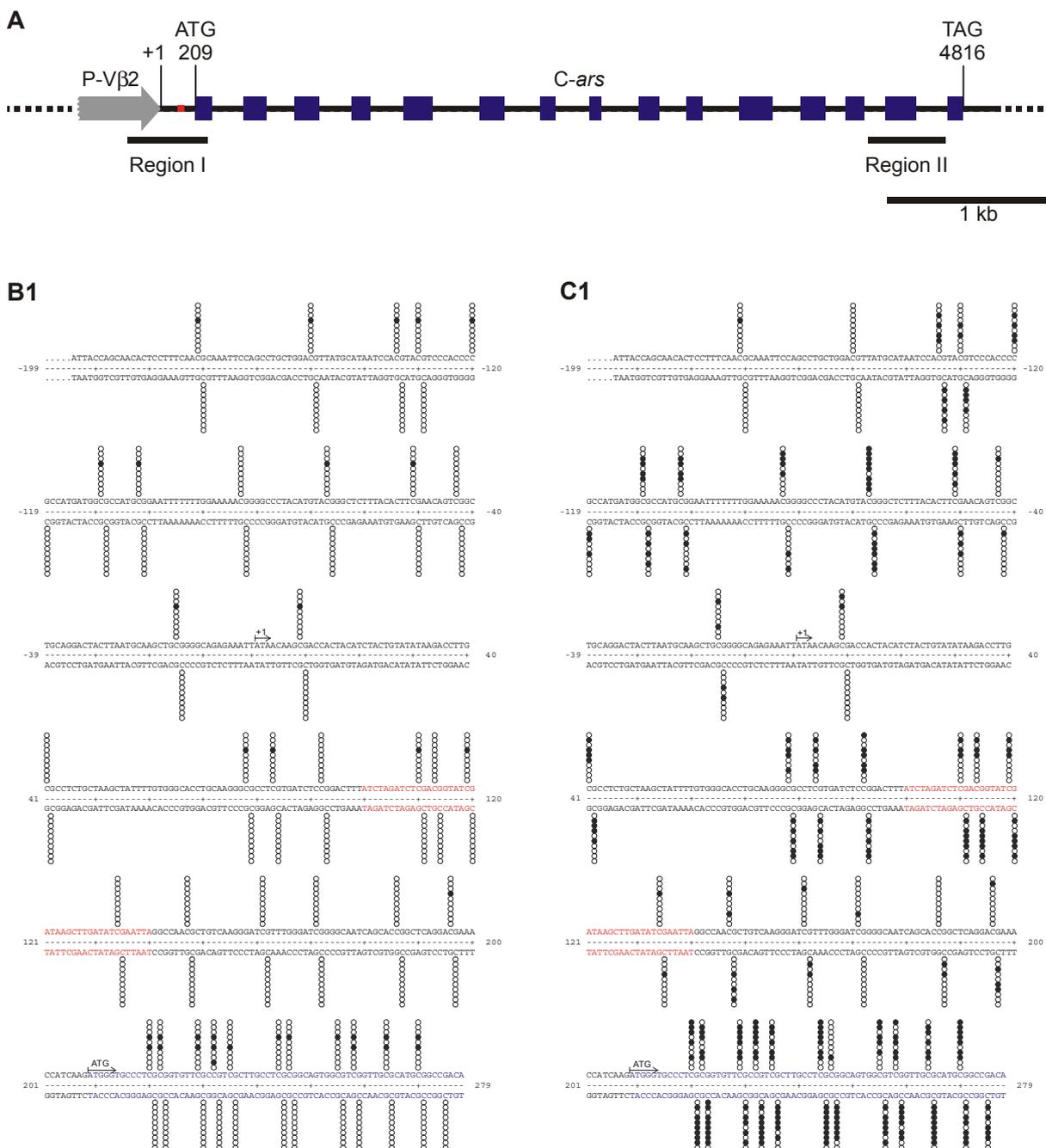
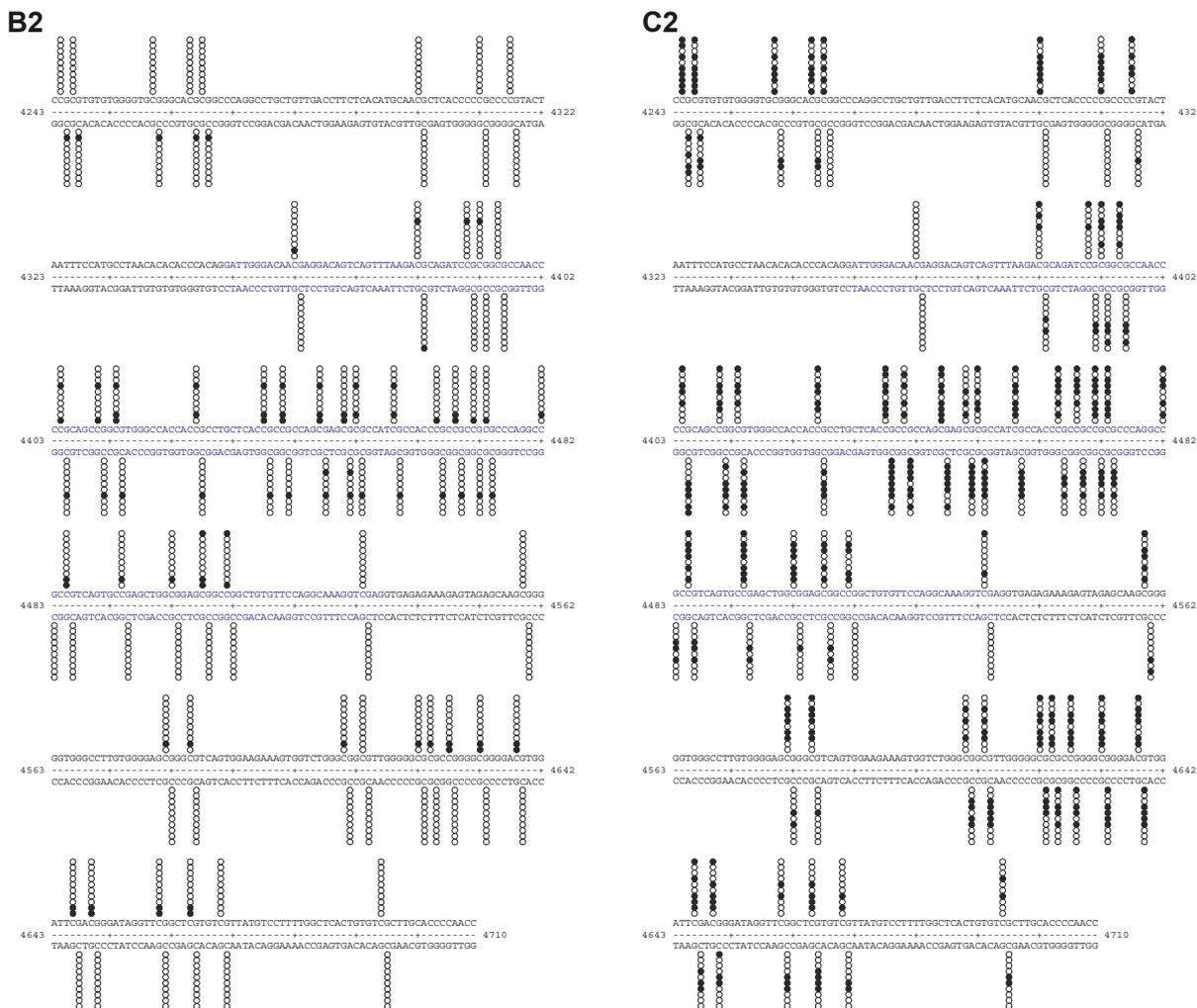


Abb. 24. (Diese und nächste Seite) Physikalische Karte des P-Vβ2/C-ars-Transgens (A) und Vergleich der CpG-Methylierungsmuster in den Regionen I und II von Hill 181 (B) und Hill 183 (C). **A.** Genetische Karte des P-Vβ2/C-ars Konstrukts, das als Transgen in Hill 181 und Hill 183 eingeschleust worden war. Die Nummerierung von Transkriptionsstart (+1), Translationsstart (ATG) und –Stop (TAG) entspricht den bei *GenBank* hinterlegten *Volvox* β2tub (*GenBank accession No.* L24547) und *Chlamydomonas ars2* (*GenBank accession No.* AF333184) Sequenzen. Exons (blaue Boxen), Introns (schwarze Linien), Promotor (grauer Pfeil) und die Verbindung zwischen P-Vβ2 und C-ars (rot) sind markiert. Die Balken „Region I“ und „Region II“ kennzeichnen die Abschnitte, die mittels *bisulfite genomic sequencing* analysiert wurden (B und C). **B, C.** Methylierungsmuster der Regionen I (B1, C1) und 2 (B2, C2) in den Transformanten Hill 181 (B) und Hill 183 (C). Nummerierung und Farbcode wie in A. Die methylierbaren CpG-Dinukleotide sind in jedem Strang durch Säulen von 10 Kreisen markiert und repräsentieren jeweils 10 unabhängig sequenzierte Klone. Jede horizontale Reihe von Kreisen zeigt somit den Methylierungszustand eines einzelnen klonierten Produkts aus der Bisulfit-PCR. Gefüllte Kreise stehen für methylierte, offene Kreise für unmethylierte Cytosine (Babinger et al., 2001).



- Die CpG-Dichte ist in den Exons am höchsten, ca. doppelt so hoch als in Introns und im Promotor. Auch der CpG-Methylierungsgrad ist in den Exons am höchsten (Tab. 16).
- Die Methylierung ist nicht auf den Promotorbereich beschränkt, sondern erstreckt sich mit Schwankungen über das gesamte Gen (Tab. 16).

Von *C-ars* war zwar die cDNA-Sequenz (J. Davies, pers. Mitteilung, *GenBank Accession No.* AY095343), nicht aber die genomische Sequenz bekannt. Deshalb wurde vor der *bisulfite genomic sequencing* - Analyse zunächst der komplette codierende Bereich des *C-ars*-Gens sequenziert und zur Festlegung der Exongrenzen mit der bekannten cDNA-Sequenz abgeglichen. Von den Plasmiden pIK2 und pJD54 wurden verschiedene Subklone erstellt, deren *Inserts* mittels *primer walking* und mit Primern aus der bekannten cDNA-Sequenz durchsequenziert wurden. Die Exon-Intron-Struktur des Gens ist in Abb. 24A dargestellt. Die erhaltene genomische Sequenz (Anhang) wurde bei *GenBank* hinterlegt (*Accession No.* AF333184).

Tab. 16. CpG-Methylierung von C-ars in Hill 181 und Hill 183.^a

	Position	Funktion	Häufigkeit von CpG (%) ^b	CpG-Methylierung(%) ^c	
				Hill 181	Hill 183
Region I ^d	-194/-1	β2-Tubulin-Promotor	6	4	30
	+1/120	5' NTR (β2-tubulin)	7	3	40
	121/208	5' NTR (C-ars)	7	1	14
	209/279	Exon 1 (C-ars)	17	8	60
Region II ^d	4243/4350	Intron 13 (C-ars)	7	3	39
	4351/4536	Exon 14 (C-ars)	14	12	42
	4537/4710	Intron 14 (C-ars)	9	6	39

^a nach Babinger et al. (2001)

^b Anzahl von CpG-Dinukleotiden pro 100 Nukleotide.

^c Anteil methylierter CpGs an allen CpG-Motiven im jeweiligen Abschnitt

^d Regionen I und II wie in Abb. 24A.

Tab. 17. Klonale Analyse der CpG-Methylierung (in %) in jedem der 10 Klone im sense- (SE) und antisense- Strang (AS) von Hill 181 und Hill 183.^a

Region I ^b				Region II ^b			
Hill 181		Hill 183		Hill 181		Hill 183	
SE	AS	SE	AS	SE	AS	SE	AS
70	0	62	76	54	28	78	74
21	0	54	76	42	10	74	64
3	0	54	63	24	4	72	54
0	0	51	47	4	2	70	42
0	0	49	45	0	0	66	28
0	0	46	42	0	0	52	18
0	0	22	39	0	0	34	18
0	0	14	24	0	0	18	14
0	0	3	5	0	0	16	2
0	0	0	0	0	0	8	2
9	0	35	42	12	4	49	32

Mittel

^a nach Babinger et al. (2001)

^b Regionen I und II von C-ars wie in Abb. 24A.

4.3.1.4 Transformation von *V. carteri* mit *in vitro*-methylierter DNA

Die bisherigen Ergebnisse (4.3.1.1 – 4.3.1.3) sind ein deutlicher Hinweis auf den ursächlichen Zusammenhang zwischen der Abschaltung eines Transgens und DNA-Methylierung. Wenn diese These stimmt, sollte ein *in vitro* CpG-methyliertes Reportergen nach Transformation von *V. carteri* nicht exprimiert werden. Dieser Ansatz wurde deshalb weiterverfolgt.

Als Konstrukt wurde das bereits zuvor verwendete Plasmid pIK2 mit dem *C-ars*-Reportergen gewählt. Bei *C-ars*-Expression lässt sich die Ars-Aktivität über einen Farbttest nachweisen (3.11.1). Zwei Parallel-Ansätze wurden durchgeführt: Im ersten wurde pIK2-DNA mit dem Enzym *SssI* CpG-methyliert (3.3.5) und zur Transformation eingesetzt, im zweiten wurde mit unbehandelter pIK2-DNA transformiert. Die zur Selektion in den Cotransformations-Experimenten verwendete pVcNR15-DNA blieb immer nicht methyliert (Abb. 25A). Nach jeweils fünf Transformationsexperimenten wurde zwischen den beiden Ansätzen gewechselt,

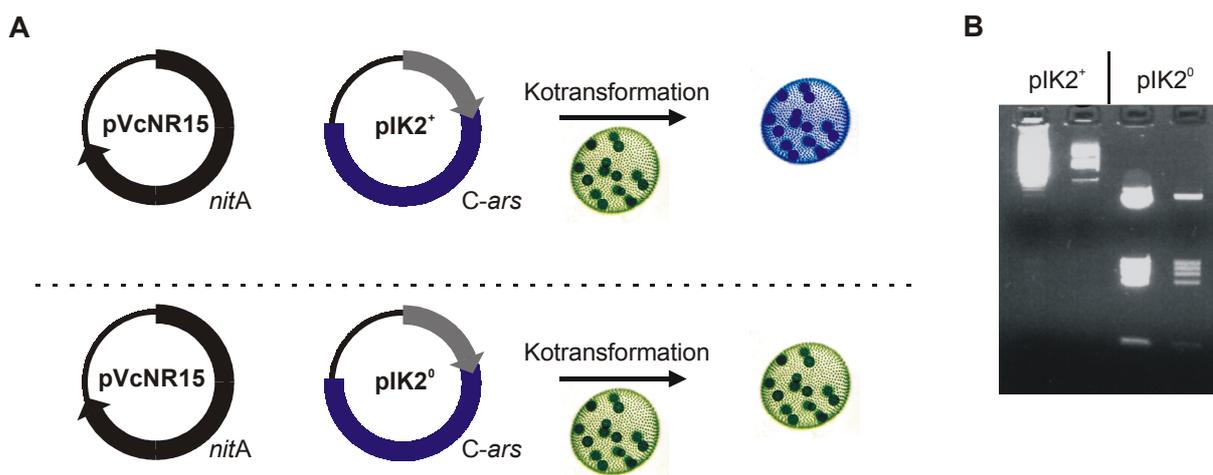


Abb. 25. Schema der Transformation von *V. carteri* 153-68 mit *in vitro* CpG-methylierter DNA. **A.** Plasmide pVcNR15 (*nitA*, Selektionsmarker) und pIK2 (*C-ars*, Reportergen). pIK2⁺, methyliert, pIK2[°], nicht methyliert. Kotransformation von *V. carteri* 153-68, XSO₄-Test auf Ars-Aktivität. **B:** SaclI-Restriktionsmuster von pIK2⁺ und pIK2[°]. SaclI schneidet im Sequenzmotiv CCGC/GG, jedoch nicht die methylierte Sequenz.

Tab. 18. Transformation von *V. carteri* 153-68 mit CpG-methylierter und nicht-CpG-methylierter *C-ars*-DNA.^a

Ansatz	Transformations-Experimente	Unabhängige NitA ⁺ Transformanten	Ars ⁺ Cotransformanten
<i>C-ars</i> methyliert	45	30	0 (0 %)
<i>C-ars</i> nicht methyliert	43	51	30 (59 %)

^a Die DNA des Selektionsmarkers *nitA* lag in beiden Experimenten nicht methyliert vor.

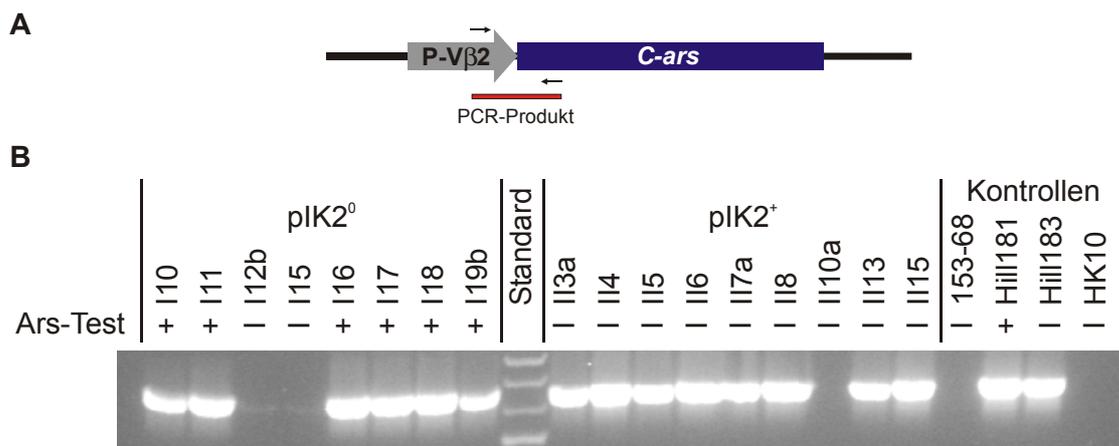


Abb. 26. Analyse des *C-ars*-Transgens in ausgewählten Transformanten durch PCR. **A.** Physikalische Karte des *C-ars*-Konstrukts mit Lage der verwendeten Primer und des erwarteten PCR-Produkts. **B.** PCR-Analyse der transgenen *C-ars*-DNA von Transformanten (Tab. 18) mit nicht-methyliertem (pIK2⁰) und methyliertem (pIK2⁺) transgenen Konstrukt und von Kontroll-DNAs. Positiver (+) und negativer (-) Ars-Enzymtest sind für jeden der 21 Stämme angegeben.

um einen Einfluss durch Altern der präparierten Rezipientenzellen im Verlauf der Transformation auszuschließen. Die erfolgreiche Methylierung von pIK2 wurde vor der Transformation mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym *SacII* überprüft (Abb. 25B). *SacII* schneidet im Sequenzmotiv CCGCGG, jedoch nicht die methylierte Sequenz, C*CG*CGG.

Insgesamt wurden 45 (pIK2 methyliert) bzw. 43 (pIK2 nicht methyliert) Transformationsexperimente durchgeführt (Tab. 18). Je Ansatz wurden zwei Transformanten selektiert und auf Ars-Aktivität getestet (3.11.1). Wie Tab. 18 zeigt, resultierte aus 30 Nit⁺-Transformanten keine Ars⁺ Co-Transformante, wenn das *C-ars*-Reporter gen zuvor CpG-methyliert worden war. Dagegen wurden mit nicht-methyliertem *C-ars* 59 % Ars⁺ Co-Transformanten erhalten. Die höhere Gesamtzahl an Nit⁺-Transformanten bei nicht-methyliertem *C-ars* ergab sich, weil die beiden selektierten Transformanten aus einem Ansatz nur dann als unabhängig gezählt wurden, wenn sie sich in der Ars-Aktivität unterschieden.

Um den ursächlichen Zusammenhang zwischen CpG-Methylierung und Ausfall von Co-Transformanten zu belegen, wurden Transformanten beider Kategorien (Tab. 18) mittels PCR auf Präsenz des *C-ars*-Konstruktes hin überprüft. Dazu wurden Primer (Prom1IntegVkon, ONARS1) im P-Vβ2-Promotor und im kodierenden Bereich von *C-ars* gewählt, mit denen ein für das Konstrukt spezifisches PCR-Produkt von 669 bp amplifiziert werden konnte (Abb. 26A). Erwartungsgemäß konnte nach Transformation mit nicht-methyliertem pIK2 in allen sechs getesteten Ars⁺-Klonen das *C-ars*-Konstrukt nachgewiesen werden (ebenso in den Hill-

Kontrollen, vgl. 4.3.1.1), nicht jedoch in den beiden *Ars*-Klonen. Ferner enthielten acht von neun Klonen nach Transformation mit methyliertem pIK2 das *C-ars* Reporterkonstrukt, obwohl sie keine *Ars*-Aktivität zeigten (Abb. 26B).

Somit enthielten letztere höchstwahrscheinlich ein intaktes *C-ars*-Transgen, das durch die CpG-Methylierung stillgelegt wurde. Für die Transformanten mit methyliertem pIK2 wurde durch weiterführende *Southern*-Analysen eindeutig gezeigt, dass das intakte *C-ars*-Transgen CpG-methyliert im Genom vorliegt (Köppl, 2003). Zwischen der Transformation und diesen Untersuchungen vergingen mehrere Monate. Die *in vitro* erzeugte CpG-Methylierung des Transgens wird also in den *Volvox*-Transformanten stabil weitervererbt und bewirkt eine andauernde Stilllegung des Transgens.

Erstmals bei einer Grünalge wurde hier nachgewiesen, dass CpG-Methylierung transformierender DNA die Genexpression blockiert. Eine „natürliche“ Funktion dieser epigenetischen Veränderung besteht offenbar darin, Fremdgene zu inaktivieren. Dies wurde anhand eines heterologen Reportergens, *C-ars*, demonstriert.

4.3.2 *Silencing* von Transposons durch CpG-Methylierung

V. carteri kann künstlich eingeschleuste Fremd-DNA erkennen und durch CpG-Methylierung stilllegen. Gibt es darüber hinaus eine angestammte Funktion der DNA-Methylierung in *Volvox*? Yoder et al. (1997) postulieren, dass die Hauptaufgabe der DNA-Methylierung das „Inschachhalten von intragenomischen Parasiten“ wie Transposons und Retroelementen sei. Trifft dies für *Volvox carteri* zu?

4.3.2.1 Test auf Methylierung von endogenen Transposons mittels *Southern*-Analysen

Im Genom von *Volvox* wurden mehr als zehn verschiedene Transposons und Retroelemente identifiziert (vgl. 1.). Einige davon wurden exemplarisch für Untersuchungen auf CpG-Methylierung ausgewählt. Das DNA-Transposon *Jordan* (Miller et al., 1993) und das größere, in weiten Bereichen sequenzhomologe Transposon *Jordan-2* (Köhl, 1997) gehören zur *En/Spm*-Familie. *Jordan* liegt in 30-40 Kopien im Genom vor, *Jordan-2* in deutlich geringerer Kopienzahl (3-5 Kopien). Die bisher bekannten Transposons der *Jordan*-Familie besitzen kein Transposase-Gen und sind somit nicht-autonom; ein „mobilisierendes Masterelement“ wurde bisher nicht gefunden. Die Retrotransposons *Osser* (Lindauer et al., 1993), *Lusen*

(Lindauer, 1993) und *Lückenbüßer* (Köhl, 1997) gehören zur *Copia/Ty1*-Klasse und treten mit 5-10, 20-25 bzw. 10-11 Kopien im Genom auf. Vor kurzem wurden zwei weitere Retrotransposons bei der Suche nach gonidienspezifisch exprimierten Genen anhand ihrer Transkripte als solche gefunden, ein *Lusen*-ähnliches (*RG3*) und ein *Osser*-ähnliches (*RG8*) (Amann, 2002). Von beiden liegt bisher nur ein ca. 500 bp großes Fragment als cDNA vor.

Die endogenen Transposons *Jordan-2*, *Osser*, *Lückenbüßer*, *RG3* und *RG8* wurden exemplarisch auf CpG-Methylierung mit den Restriktionsenzymen *HpaII* und *MspI* getestet. Beide Enzyme erkennen und schneiden das Sequenzmotiv CCGG. *HpaII* wird durch Methylierung des zweiten C blockiert, *MspI* kann unabhängig vom Methylierungszustand schneiden. In Abb. 27A sind *HpaII/MspI*-Restriktionskarten der Transposons *Jordan-2*, *Osser* und *Lückenbüßer* dargestellt, die auf den hinterlegten Sequenzen basieren (*GenBank Accession No.* U58741, X69552, U90320). Zur Detektion einzelner *HpaII*- bzw. *MspI*-Restriktionsfragmente wurde die verdaute DNA auf Agarosegelen aufgetrennt, auf Membranen übertragen und mit geeigneten radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die Lage der Sonden sowie die Größen der hybridisierenden Fragmente sind ebenfalls in Abb. 27A gezeigt. Die *Jordan-2*-Sonde besteht aus zwei Restriktionsfragmenten (*PstI* und *PstI/HindIII*) und hybridisiert in ihrem 3'-Bereich auch mit dem Transposon *Jordan* (grau markierter Bereich bis zum ersten 3' gelegenen *HindIII*-Schnitt, Abb. 28A). Die beiden *Osser*-Sonden wurden durch PCR gewonnen. Die durch Restriktionsverdau erhaltene *Lückenbüßer*-Sonde enthält (aus technischen Gründen) auch ein Stück angrenzender genomischer DNA. Für die Retrotransposons *RG3* und *RG8* wurden als Sonden die beiden vorhandenen cDNA-Fragmente verwendet.

In allen sechs *Southern*-Hybridisierungen (Abb. 27B) unterscheiden sich die Bandenmuster von *HpaII*- und *MspI*-Verdau. Die mit Größenangabe versehenen Fragmente (Abb. 27A) lassen sich in den *MspI*-Spuren eindeutig zuordnen (Banden kleiner als ca. 100 bp sind in der *Southern*-Analyse kaum sichtbar und wurden deshalb nicht signiert). In den *HpaII*-Spuren ergeben sie oft schwächere, manchmal kaum sichtbare Signale, wie z.B. in der Hybridisierung mit *Osser*3' (Pfeile). Dafür hybridisieren in den *HpaII*-Spuren zusätzliche, größere Fragmente, die in den *MspI*-Spuren nicht auftreten. Allerdings treten auch im *MspI*-Verdau zusätzliche Banden auf, die aus beschädigten Transposons oder aus Sequenzvariationen innerhalb einer Transposon-Familie resultieren könnten (4.3.2.3). Bei *Jordan-2* z.B. weisen ausschließlich solche Banden Unterschiede zwischen *HpaII*- und *MspI*-Verdau auf.

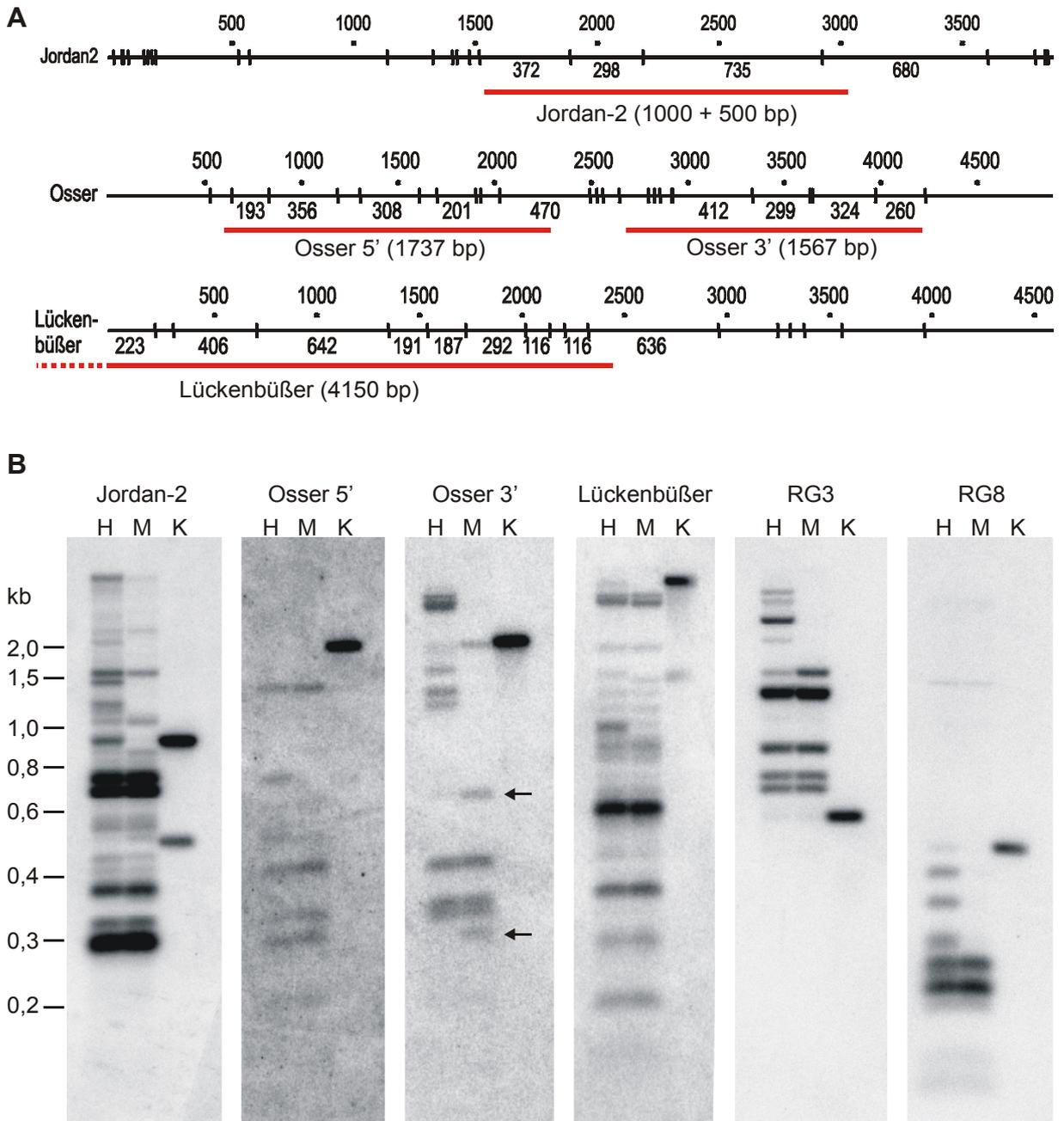


Abb. 27. Analyse und Nachweis der DNA-Methylierung von fünf *Volvox*-Transposons durch *Southern*-Hybridisierung mit methylierungsempfindlichen (*Hpa*II) bzw. -unempfindlichen (*Msp*I) Restriktionsenzymen. **A.** Restriktionskarten der Transposons *Jordan-2*, *Osseer* und *Lückenbüßer*. *Hpa*II- bzw. *Msp*I-Schnittstellen sind durch senkrechte Linien markiert. Die Größen hybridisierender *Msp*I-Fragmente sind angegeben. Die Lage der verwendeten Sonden (rote Balken) ist eingezeichnet. Über der Karte ist eine Größenskala (bp) angegeben. Für die Transposons RG3 und RG8 wurden die bekannten cDNA-Fragmente (Amann, 2002) als Sonden verwendet. **B.** Jeweils 3,5 µg genomischer HK10-DNA wurden für die *Southern*-Analysen mit *Hpa*II (H) und *Msp*I (M) verdaut. Zusätzlich wurde die nicht markierte Sonde als Hybridisierungskontrolle aufgetragen (K). Die zur Hybridisierung verwendeten Sonden sind über den Autoradiogrammen angegeben. Links: Größensstandard.

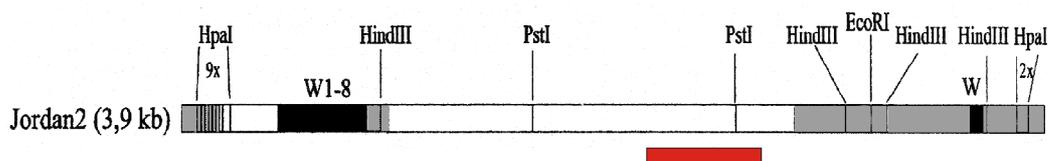
Offensichtlich ist also in allen untersuchten Transposons ein gewisser Anteil der CCGG-Motive CpG-methyliert. Eine CpG-Methylierung funktionell intakter Kopien der untersuchten Transposons lässt sich daraus jedoch nicht direkt schließen. Beobachtete Bandenunterschiede können auch aus der Methylierung von anderen Mitgliedern der jeweiligen Transposon-Familie oder von funktionell inaktiven, defekten Transposon-Kopien resultieren. Für konkrete Aussagen war daher eine quantitative und sequenzspezifische Untersuchung der C-Methylierung durch *bisulfite genomic sequencing* nötig (4.3.2.2).

4.3.2.2 Quantitative Analyse der CpG-Methylierungen von *Jordan-2* und *Osser*

Die Restriktion mit den methylierungs-Indikatoren *HpaII* und *MspI* gab Hinweise auf die CpG-Methylierung aller untersuchten Transposons. Durch *bisulfite genomic sequencing* (3.3.4) zweier ausgewählter Vertreter, nämlich *Jordan-2* und *Osser*, sollte dieser Befund durch Quantifizierung der CpG-Methylierung bestätigt und erweitert werden. In beiden Transposons wurde ein Bereich für das *bisulfite genomic sequencing* ausgewählt, der auch durch die Sonde in der *Southern*-Analyse erfasst worden war. In beiden Fällen wurde jeweils der *sense*-Strang durch Sequenzierung von zehn verschiedenen PCR-Klonen auf C-Methylierung untersucht. Für alle Untersuchungen wurde DNA des *Volvox*-Stammes HK10 verwendet.

Abb. 28A gibt die Lage des untersuchten Sequenzbereichs in *Jordan-2* wieder. In diesem Sequenzabschnitt wurde nahezu keine CpG-Methylierung gefunden (Abb. 28B). Lediglich einer der zehn untersuchten Klone wies vier methylierte CpG-Positionen auf, zwei davon in einer Insertion von 10 bp (YACGYACGYA), die in vier der zehn Klone gefunden wurde (vgl. 4.3.2.3). Dies steht auf den ersten Blick in Widerspruch zu den Ergebnissen der Restriktionsanalyse, die eine Methylierung des Transposons erwarten ließen (Abb. 28B). Jedoch erschienen die vier von der Sonde abgedeckten Restriktionsfragmente in *HpaII*- und *MspI*-Verdau in gleicher Stärke. Dies deutet auf eine nur geringe Methylierung dieses Bereichs hin, in dem auch der durch *bisulfite genomic sequencing* untersuchte Sequenzabschnitt liegt. Unterschiede zwischen *HpaII*- und *MspI*-Verdau betreffen, wie später diskutiert (5.4), nur die zahlreichen zusätzlichen Banden, die nicht aus originären, methylierten *Jordan-2*-Kopien stammen können.

A



B

```

                0           0
2167 ACATGCCAGAGATCGAGGTTGAGGC CGGAGGGTGTAGCCCTTAGCTTGTAACAGTCAACA 2226

                1   I           0           0
2227 AGGTGCTCCCAAATGTAACCCAAA CGTAGCAATCTGCA CGAAATGAG CGGCCATAATCAA 2286

2287 CTAATCAATTAAGTATCCCTGATTCATAGAAGTGTGCAGAGTGTGTCAAGTGTTCACA 2346

                0
2347 GACATACATGGAGTCATGCATCCACAACCTCTGTGGTATTCCGTGTACCTACCTCTCACAC 2406

                0 0 1
2407 ATGATGTTGTTGAA CGCGCT CGCAGCATGATTCGCCATTCTCCGAAAGCAAGGGTGGTAT 2666

                0           0           0           0
2467 CCTCGGGGATGGT CGAGAGGTCCACATCTGCAG CGCTCTT CGCAAAGGTGCTGCATGTGT 2526

                0           0           0
2527 ACAGATGGAAACA CGTCCAGGGA CGAGTTAATGACAATTCACAAGG CGGCAATACACTAA 2586

                0           0
2587 GAAAGCCACAGG CGTACCTT CGTGTAGAAGTGTGTTGATTTTCTAGTACTCTGTGGACAAA 2646

                0 0
2647 CTTTCGAGG CGGACCAGAGCAGCATGAAGT 2676
    
```

Abb. 28. CpG-Methylierung in 10 Klonen des Transposons *Jordan-2*. **A.** Schematische Darstellung des Transposons *Jordan-2* (Köhl, 1997). W1-8, W (schwarze Balken), Wj-Motiv; graue Balken, zu *Jordan* homologe Bereiche; roter Balken, durch *bisulfite genomic sequencing* untersuchter Bereich. **B.** Methylierung im *sense*-Strang der untersuchten Sequenzbereichs von *Jordan-2*. Die Sequenznummerierung entspricht der hinterlegten Sequenz (*GenBank Accession No.* U58741). Die Zahlen über der Sequenz geben die Anzahl methylierter CpG-Dinukleotide 10 analysierten Klonen an. Methylierungen außerhalb der CpG-Dinukleotide (rot) wurden nicht gefunden. An der mit „I“ gekennzeichneten Position tritt in 4 der 10 untersuchten Klone eine 10 bp-Insertion „YACGYACGYA“ auf.

Die Bisulfit-Analyse des Retrotransposons *Osser* wurde sowohl mit einer DNA-Präparation aus ganzen Sphäroiden als auch mit Gonidien-DNA durchgeführt. Auf diese Weise könnten Hinweise auf zellspezifisch unterschiedliche Transposon-Aktivitäten erhalten werden. Allerdings ist die Zahl der sequenzierten Bisulfit-Klone zu gering, um mehr als eine Tendenz feststellen zu können.

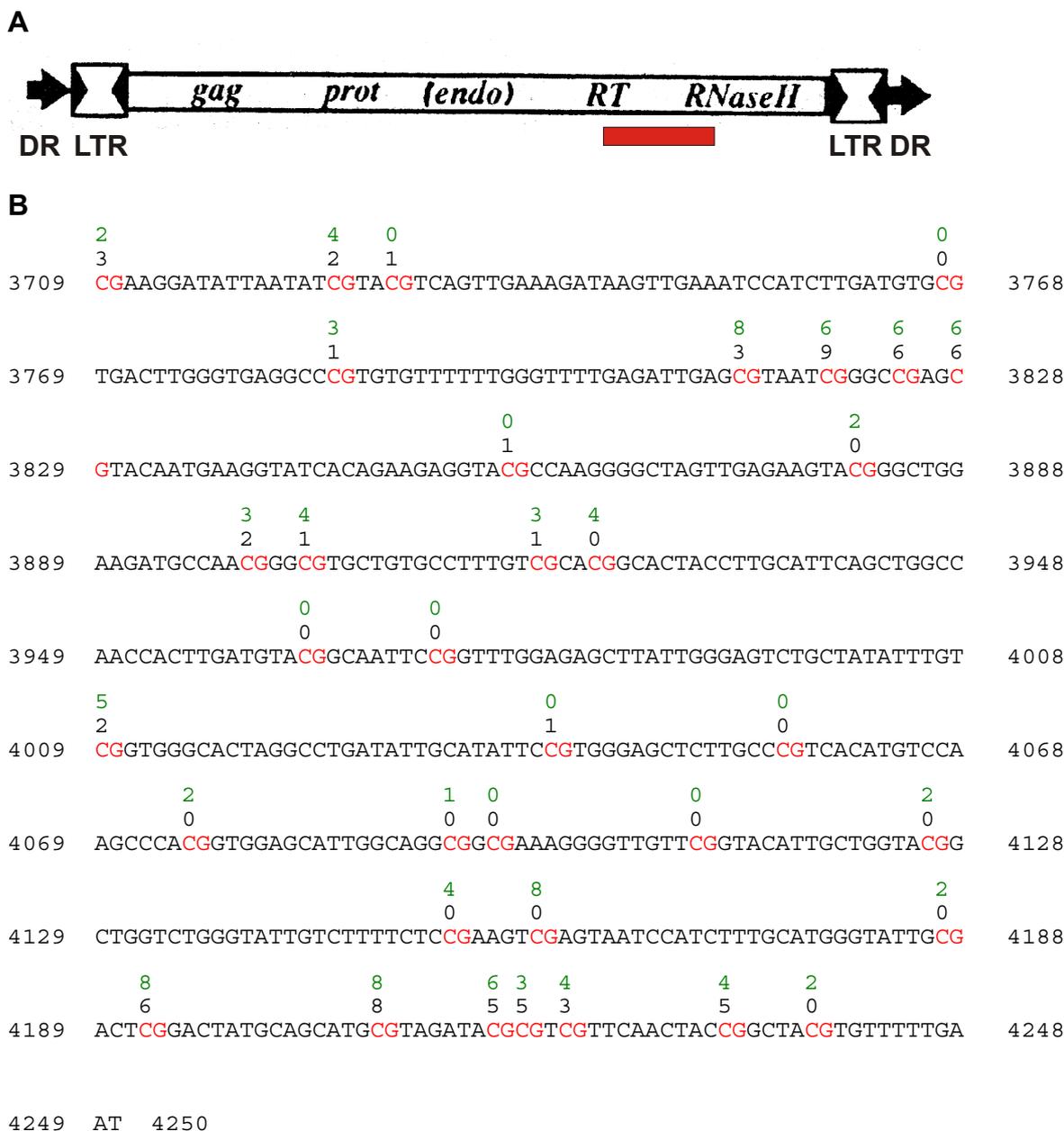


Abb. 29. CpG-Methylierung des Retrotransposons Osse. **A.** Schema der genetischen Karte des Retrotransposons Osse (Lindauer et al., 1993). Die Abkürzungen *gag* (*group-specific antigen*), *prot* (Protease), *endo* (Endonuklease), *RT* (Reverse Transkriptase) und *RnaseH* (Ribonuklease H) geben die Lage der Enzymfunktionen im Polyprotein an. DR, *direct repeat*; LTR, *long terminal repeat*; roter Balken, durch *bisulfite genomic sequencing* untersuchter Bereich. **B.** CpG-Methylierung im *sense*-Strang des untersuchten Sequenzbereichs von Osse. Die Sequenznummerierung entspricht der hinterlegten Sequenz (*GenBank Accession No.* X69552). Die Zahlen über der Sequenz geben die Anzahl methylierter CpG-Dinukleotide in jeweils 10 untersuchten Klonen aus ganzen Sphäroiden (schwarz) und Gonidien (grün) an. Es wurde keine Methylierung außerhalb von CpG-Dinukleotiden (rot markiert) gefunden.

Der untersuchte Sequenzbereich überlappt mit dem Ende der Reversen Transkriptase und dem Start der RNaseH (Abb. 29A). In diesem Sequenzabschnitt von *Osser* wurde deutliche CpG-Methylierung gefunden, und zwar sowohl in Gesamt- wie in Gonidien-DNA (Abb. 29B). Die Methylierung ist nicht gleichmäßig verteilt, es scheint bevorzugt methylierte Bereiche zu geben (z.B. Pos. 3814-3828 und 4193-4424). Die beobachtete Methylierung steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *Southern*-Analyse. So ist die 260 bp-Bande (Abb. 27, unterer Pfeil) im *HpaII*-Verdau fast nicht mehr sichtbar. Die dieses Fragment 3' begrenzende Schnittstelle (Pos. 4131-4134, Abb. 29) ist in 9 von 20 untersuchten Bisulfit-Klonen methyliert. Der durchschnittliche CpG-Methylierungsgrad in Gesamt-DNA beträgt 20 %, in Gonidien-DNA 31 %. *Osser* ist in Gonidien also stärker methyliert als in somatischen Zellen.

Die Ergebnisse des *bisulfite genomic sequencing* zeigen, dass das Transposon *Jordan-2* keine nennenswerte Methylierung aufweist. Die Mitglieder der *Jordan*-Familie gehören zu den mobilsten Transposons in *Volvox* (Miller et al., 1993), somit erscheint ein *silencing* durch DNA-Methylierung fraglich. Aus dem Methylierungsgrad (20-30 %) des Retrotransposons *Osser*, dessen Transposition im Labor noch nie beobachtet wurde, kann man hingegen seine Stilllegung durch CpG-Methylierung folgern.

4.3.2.3 Sequenzvariationen bei den Transposons *Jordan-2* und *Osser*

Bei der Bisulfit-Analyse der Transposons *Jordan-2* und *Osser* wurden 10 bzw. 20 unabhängige PCR-Klone sequenziert. *Jordan-2* kommt in 3-5 Kopien im Genom von *V. carteri* vor (Miller et al., 1993), *Osser* wurde in 5-10 Kopien beobachtet (Lindauer et al., 1993). Mit einiger Wahrscheinlichkeit dürften danach die sequenzierten PCR-Klone die verschiedenen Kopien des jeweiligen Transposons betreffen.

Im sequenzierten Abschnitt des Transposons *Jordan-2* wurden drei verschiedene Sequenzvarianten beobachtet (Anhang A2). Die der in *GenBank* hinterlegten Sequenz entsprechende Variante trat fünfmal auf (J_01). In vier ansonsten identischen Sequenzen fand sich eine Insertion von 10 bp (J_02). Eine weitere Sequenz unterscheidet sich in den ersten 83 Basen komplett (J_03). Allen 10 Sequenzen fehlt an Pos. 503 im Vergleich zur publizierten Sequenz eine Base. Mit großer Sicherheit liegt deshalb hier ein Sequenzierfehler in der publizierten Sequenz vor.

Beim Retrotransposon *Osser* sind die Sequenzvariationen mit 18 Varianten bei 21 Sequenzen (incl. der publizierten Sequenz) vielfältiger (Anhang A3). Auch hier liegen in der in *GenBank* hinterlegten Sequenz sehr wahrscheinlich zwei Fehler vor. An Pos. 53 fehlt in der publizierten Sequenz eine Base im Vergleich allen 20 untersuchten Sequenzen. Die so eingeführte Leserasterverschiebung wird jedoch durch eine überzählige Base an Pos. 99 wieder ausgeglichen.

Auch abgesehen von diesen Fehlern entspricht keine einzige der 17 Variationen vollständig der publizierten Sequenz. Eine Variation (O_01) wurde viermal beobachtet und ist somit im Genom wohl am häufigsten vertreten, alle anderen treten nur einfach auf. Drei Variationen weisen im Vergleich zur publizierten Sequenz Lücken oder Insertionen auf (O_14, O_16, O_17), ansonsten wurden ausschließlich Einzelaustausche beobachtet. Auffällig ist, dass 16 (42 %) der 38 CpG-Motive (rot markiert) in dem Sequenzabschnitt betroffen sind. In einem Klon sind allein 11 CpG-Positionen (29 %) verändert (O_17). Fast die Hälfte der beobachteten Sequenzvariationen in *Osser* liegt damit in CpG-Motiven. Es treten dabei fast ausschließlich G → A Austausch auf, die C → T Austausche im *antisense*-Strang entsprechen. C → T Austausche im *sense*-Strang können aus technischen Gründen beim *bisulfite genomic sequencing* nur eines Strangs nicht aufgedeckt werden (alle nicht-methylierten C werden zu T umgewandelt). Die tatsächliche Anzahl der Austausche in CpG-Dinukleotiden ist also vermutlich annähernd doppelt so hoch als hier beobachtet.

Warum treten gerade C → T Austausche so zahlreich auf? Aus ^{5m}C kann durch spontane Desaminierung T entstehen, das nach einer nachfolgenden DNA-Replikation nicht mehr als „falsch“ in der DNA erkannt werden kann (Adams, 1990). Wie in 4.3.2.2 gezeigt, sind im Transposon *Osser* zahlreiche CpG-Motive methyliert. Im Lauf der Zeit mutieren diese dadurch mehr und mehr zu CpA oder TpG.

Während bei *Jordan-2* nur drei auf Insertionen oder Deletionen beruhende Sequenzvarianten beobachtet wurden, weisen die verschiedenen *Osser*-Sequenzen zahlreiche Austausche an Einzelpositionen auf. Von *Osser* gibt es mindestens 18, statt bisher angenommen, 5-10 Kopien im Genom. Die CpG-Methylierung in *Osser*, zusammen mit spontaner Desaminierung des ^{5m}C zu T, trägt maßgeblich zur beobachteten Sequenzvariabilität bei. Neben dem unmittelbaren *silencing*-Effekt führt CpG-Methylierung auf diese Weise langfristig wohl auch zu einer dauerhaften Inaktivierung von Transposons durch die Einführung von Mutationen.

5. Diskussion

DNA-Methylierung hat bei höheren Eukaryonten zwei Hauptfunktionen. Sie schützt die Integrität des Genoms, indem sie die Transkription mobiler Elemente und eingedrungener Fremd-DNA unterdrückt und somit Mutationen durch Transposition und physiologische Schäden durch Expression des Fremdgens unterdrückt. Darüber hinaus spielt sie vor allem bei Vertebraten eine bedeutende Rolle bei der Regulation bestimmter Gene, besonders während der Entwicklung (Ehrlich, 2003). Auch bei der grünen Kugelalge *Volvox carteri* wurde ^5mC und ein geringer Anteil von ^6mA in der Kern-DNA nachgewiesen und experimentell deutliche Hinweise auf einen Zusammenhang von CpG-Methylierung und der Stilllegung eines Transgens geliefert (Babinger, 1999). In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Methylierung und *silencing* von Fremdgenen eindeutig belegt. Darüber hinaus wurde anhand Vertretern klassischer Transposons und Retrotransposons nachgewiesen, dass erstere nicht methyliert werden, solange sie aktiv sind, Retrotransposons dagegen in der Regel stark methyliert und inaktiv sind. Zusätzlich weisen Retrotransposons zahlreiche Mutationen auf, v.a. durch erhöhte Mutabilität von ^5mC zu T. Es wurde geklärt, dass Chloroplasten-DNA in vegetativ wachsenden *V. carteri*-Sphäroiden minimal oder gar nicht methyliert ist. Die Klonierung und Charakterisierung des Methyltransferase-Gens *met1*, dessen Genprodukt für die Aufrechterhaltung des methylierten Zustandes bei der DNA-Replikation zuständig ist, ist Anlass und experimenteller Aufhänger für Studien der Funktion der DNA-Methylierung in *Volvox*-Zellen und ihrer Entwicklung.

5.1 ^5mC und ^6mA in Kern-, Chloroplasten- und Gonidien-DNA von *V. carteri*

Mit der Methode des ^{32}P -postlabeling (3.3.3) wurden 1,1 % ^5mC und 0,3 % ^5mA , jeweils bezogen auf die Gesamtmenge an C bzw. A, in genomischer *V. carteri* HK10 - DNA nachgewiesen. Wie ist der Grad der C-Methylierung der Kern-DNA zu beurteilen? Im Vergleich zu Vertebraten, bei denen 3-6 % des Cytosins methyliert sind (Adams, 1990), erscheinen diese Werte eher gering. Bei Pflanzen werden sogar Werte zwischen 6 % (*A. thaliana*) und 33 % (Roggen) berichtet (Finnegan & Kovac, 2000). Allerdings beobachtet man, dass im

Allgemein ist die DNA von niederen Eukaryonten schwächer methyliert. Die DNA von vielen einzelligen Eukaryonten wie z.B. *S. cerevisiae* enthält kein nachweisbares ^5mC (Adams, 1990), auch bei *C. reinhardtii* ist der Gehalt an ^5mC mit 0,7 % niedriger als bei *V. carteri* (Babinger, 1999; Hattman et al., 1978). Der höhere Gehalt der DNA an ^5mC in höheren Eukaryonten könnte seine Ursache in der zunehmenden Differenzierung und der Bedeutung der C-Methylierung bei der differentiellen Genregulation (Ehrlich, 2003) haben. Der hohe Methylierungsgrad der DNA bei höheren Pflanzen hat aber vermutlich andere Gründe. Oft machen Transposons und Retroelemente einen beträchtlichen Teil ihrer Genome aus, beim Mais beispielsweise über 50 % (Finnegan et al., 1998), und es gibt experimentelle Hinweise dafür, dass ein wesentlicher Teil der $^5\text{mCpGs}$ für eine effiziente Stilllegung dieser „intra-genomischen Parasiten“ gebraucht wird (vgl. 5.4). Darüber hinaus besitzen höhere Pflanzen Methyltransferasen der Chromomethylase- und DRM-Familie, die nicht nur CpG-Motive wie bei *V. carteri* (vgl. 5.3) oder Tieren (Bestor, 2000) erkennen und modifizieren, sondern in hohem Maße auch CpNpG- oder gar asymmetrische Motive methylieren (Cao & Jacobsen, 2002a). Deshalb dürfte allein die weit größere Auswahl an Zielsequenz-Motiven einen höheren Grad an Methylierung ausmachen.

In Gameten und Zygoten von *C. reinhardtii* wurden C-Methylierungsgrade der ctDNA von über 50 % beobachtet, während sie in vegetativ wachsenden Zellen kaum methyliert ist. Nur die stark methylierte ctDNA aus Gameten des Paarungstyps mt⁺ wird an die Nachkommen weitergegeben, während die kaum methylierte ctDNA des Paarungstyps mt⁻ abgebaut wird. Die Funktion der Methylierung ist dabei nicht der Schutz der mt⁺-ctDNA vor Abbau, sondern die Förderung der Replikation der mt⁺-ctDNA in der Zygote (Umen & Goodenough, 2001). Angeregt durch diese Beobachtungen wurde auch ctDNA aus *V. carteri* auf das Vorkommen von ^5mC untersucht. Die ctDNA aus vegetativen *Volvox*-Sphäroiden enthält jedoch keine nennenswerten Mengen an ^5mC und ^6mA (4.1.2). Unbekannt ist bisher, ob in *Volvox*-Gameten oder -Zygoten die ctDNA methyliert ist. Diese Experimente wurden vor allem wegen des technischen Problems der Isolierung größerer Zellmassen zurückgestellt. Sexuelle Kreuzungen bei *V. carteri* sind so ineffektiv, dass die Gewinnung größerer Mengen an Zygoten nicht praktikabel ist.

Coleman und Maguire (1982) beobachteten in Gonidien spektroskopisch einen enormen Anstieg des ctDNA-Gehalts auf über 99 % der Gesamt-DNA-Menge, was die potentielle Möglichkeit eröffnen würde, sehr reine ctDNA aus Gonidienzellen für Untersuchungen zu gewinnen. Demgegenüber standen jedoch Experimente von Kochert (1975), nach denen der

ctDNA-Gehalt in Gonidien nur auf 30 % ansteigt. Tatsächlich wurden die Werte von Kochert im Rahmen dieser Arbeit exakt bestätigt (4.1.3). In der gewonnenen Gonidien-DNA wurden 0,5 % ^{5m}C und <0,1 % ^{6m}A nachgewiesen. Der Rückgang des Gehalts an methylierten Basen im Vergleich zu Gesamt-DNA kann nur teilweise durch den höheren ctDNA-Gehalt erklärt werden. Eine biologische Bedeutung des geringeren C-Methylierungsgrades in Gonidien ist nicht auszuschließen (5.5).

Die *V. carteri*-Stämme HK10 und Poona unterscheiden sich trotz fast gleicher Gensequenzen bei Restriktionsanalysen im Fragmentierungsmuster. Enzyme, die in HK10-DNA einzelne Schnittstellen nicht erkannten, konnten Poona-DNA im identischen Sequenzkontext schneiden. Als Ursache hierfür wurde DNA-Methylierung angenommen, jedoch konnte ein zugrunde liegende Methylierungsmuster nie definiert werden (Kirk, 1998). Aus den Beobachtungen ließ sich vermuten, dass Poona-DNA einen geringeren Methylierungsgrad aufweisen sollte als HK10-DNA. Diese Annahme wurde bestätigt (4.1.1). Im Stamm Poona beträgt der ^{5m}C-Anteil 0,8 % (HK10: 1,1 %), der ^{6m}A-Gehalt ist mit 0,3 % vergleichbar mit HK10. Eine C-Methylierung konnte jedoch als Ursache für die Blockierung von Schnitten im *nitA*-Gen von *V. carteri* HK10 bereits ausgeschlossen werden (Babinger, 1999). Ob DNA-Methylierung wirklich ursächlich für das unterschiedliche Restriktionsverhalten ist, bleibt daher offen.

Adenin-Methylierung von Genom-DNA wurde bereits mehrfach bei Eukaryonten, vor allem in Einzellern wie *C. reinhardtii*, *Paramecium aurelia* und *Peridinium triquetrum* beobachtet (Hattman et al., 1978), Erkenntnisse aus höheren Eukaryonten liegen erst aus neuester Zeit vor. Fedoreyeva und Vanyushin (2002) isolierten eine N⁶-Adenin-DNA-Methyltransferase aus Weizenkeimlingen, die spezifisch das Adenin in der Sequenz TG^{*}ATCA methyliert. Dieser Arbeitsgruppe gelang auch der Nachweis von Adenin-Methylierung im Gen der DRM2-Methyltransferase von *Arabidopsis thaliana* (Ashapkin et al., 2002). In der DNA von *V. carteri* tritt ^{6m}A im Genom in einer Häufigkeit von 0,3 % auf. Basierend auf im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Restriktionsanalysen (nicht gezeigt) wird ^{6m}A bei *Volvox* im GATC-Motiv vermutet, das Bestandteil des aus Weizen bekannten TGATCA-Kontextes ist. In weitergehenden Untersuchungen soll deshalb durch *Southern*-Analysen mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen getestet werden, ob in eingeschleuster, transgener GATC-methylierter DNA die A-Methylierung erhalten bleibt. Das würde bedeuten, dass es in *Volvox* eine GATC-spezifische Adenin-Methyltransferase geben muss. Des Weiteren soll in diesen Experimenten durch Variation der an GATC-Motive benachbarten

Basen versucht werden, das Methylierungsmotiv auf den umgebenden Sequenzkontext zu erweitern.

Die biologische Funktion von ^{6m}A in der DNA von Eukaryonten ist noch völlig ungeklärt. Rogers et al. (1986) vermuten eine Beteiligung an DNA-Reparaturmechanismen. Neuere Arbeiten, die auf Untersuchungen *in vitro* GATC-methylierter Transgene sowie Expression des bakteriellen *dam*-Gens in Eukaryonten beruhen, zeigen, dass die Expression A-methylierter Gene gesteigert ist (Graham & Larkin, 1995; van Blokland et al., 1998). Ein Einfluss von Methylierung im GATC-Kontext auf die Transformationsrate bei *V. carteri* wurde bereits ausgeschlossen (Köppl, 2003), Untersuchungen zur Expressionsrate von so modifizierten (Trans-)genen wurden jedoch noch nicht durchgeführt.

5.2 Das *met1*-Gen codiert für eine Erhaltungs-Methyltransferase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Stilllegen von Transgenen und Transposons bei *Volvox* mit CpG-Methylierung korreliert. Um auch über mögliche Funktionen der DNA-Methylierung bei der Regulation z.B. von Entwicklungsgenen zu erlangen, sollten die enzymatischen Grundlagen dieses Vorgangs näher untersucht werden. Deshalb wurde das Gen einer DNA-Cytosin-Methyltransferase (*met1*) isoliert und sequenziert. Von bisher bekannten 5,6 kb der cDNA codieren 4,4 kb für 1.468 AS, der 5'-Bereich der *met1*-cDNA steht noch aus. Genomisch ist das gesamte Gen bis auf zwei in Introns liegende hochrepetitive Elemente vollständig sequenziert, es umfasst ca. 25 kb und besteht aus mindestens 29 Exons. Aus Größenvergleichen mit homologen, bekannten Methyltransferasen (ca. 1.500-2.000 AS) sowie durch Anwendung von *gene finding*-Programmen wurden im 5'-Bereich weitere fünf bis sechs Exons vorausgesagt, die 1,3-2,0 kb umfassen.

Um *met1* aus *V. carteri* funktionell und verwandtschaftlich einzuordnen, wurden mit der abgeleiteten, bisher bekannten Proteinsequenz *multiple alignments* mit bereits bekannten, gut charakterisierten Methyltransferasen anderer Spezies erstellt. Dazu wurden repräsentative Vertreter der vier wichtigsten, gut charakterisierten Methyltransferase-Klassen gewählt. Dnmt1 von Maus und Mensch sowie Met1 aus Tomate und *Arabidopsis* gehören zur Dnmt1/Met1-Klasse, der die Funktion der Erhaltungsmethylierung in CpG-Motiven zugesprochen wird (Finnegan & Kovac, 2000). Dnmt3a und Dnmt3b (Mensch) besitzen *de novo*-Methylase-Funktion (Kim et al., 2002). *De novo*-Aktivität wurde auch für DRM2 aus

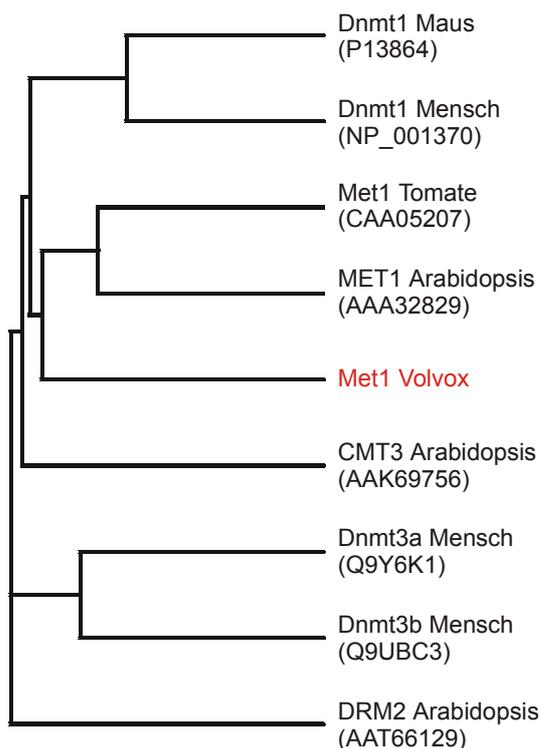


Abb. 30. Vergleich von DNA-Cytosin-Methyltransferasen verschiedener Spezies. Das Dendrogramm wurde mit PileUp (GCG-Paket) erstellt. In Klammern die *GenBank Accession No.* der Proteinsequenzen.

A. thaliana gezeigt (Cao & Jacobsen, 2002b). CMT3 repräsentiert mit den Chromomethylasen eine weitere, ausschließlich in Pflanzen vorkommende Gruppe von Methyltransferasen, die wie die DRM-Methylasen im CpNpG-Kontext methyliert (Cao & Jacobsen, 2002a). Das vom *alignment*-Programm PileUp (GCG-Paket) erstellte Dendrogramm zeigt Abb. 30. Met1 aus *Volvox* zeigt demnach die höchste Verwandtschaft mit den Enzymen der Met1/Dnmt1-Klasse, und hier speziell mit den pflanzlichen Vertretern. Die Chromomethylase und *de novo* Methylasen sitzen dagegen auf anderen Ästen des Dendrogramms.

Um die Einordnung von *Volvox* Met1 als Erhaltungsmethylase zu unterstreichen, wurde ein *multiple alignment* der Met1-Peptidsequenz mit sieben pflanzlichen und tierischen Vertretern der Dnmt1/Met1-Klasse erstellt (Anhang A4). Mit eingefügt ist auch die bei *C. reinhardtii* partiell charakterisierte Methyltransferase Cmt2, mit der *Volvox* Met1 mit 56 % Identität und 62 % Ähnlichkeit die größte Übereinstimmung zeigt (bei Beschränkung des Vergleichs auf die Methyltransferase-Domäne belaufen sich die Werte auf 78 % bzw. 81 %). Die hochkonservierten Motive (M I – M X, Anhang A4) der Methyltransferase-Domäne sind allen verglichenen Proteinen gemeinsam. Die bei den pflanzlichen Vertretern weniger deutlich als bei tierischen Vertretern vorhandene Lysin-Glycin-Wiederholung, welche die

Methyltransferase-Domäne von der N-terminalen Domäne trennt, fehlt bei den *V. carteri*- und *C. reinhardtii*-Sequenzen ganz. Die N-terminale Domäne ist zwischen den verschiedenen Proteinen weit weniger konserviert, es treten zahlreiche Lücken bzw. Insertionen auf, v.a. bei den *Volvox* und *Chlamydomonas*-Methyltransferasen. Ein höher konservierter Bereich ist jedoch allen gemeinsam, der sich (bezogen auf die Nummerierung des *alignments*) von Pos. 612 bis Pos. 877 erstreckt. Dieser Bereich lenkt das Enzym zu den Punkten der DNA-Replikation, wo hemimethylierte DNA, das bevorzugte Substrat der Erhaltungs-Methyltransferasen, entsteht (Leonhardt et al., 1992; Liu et al., 1998). Das Vorhandensein dieses Bereichs ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei *V. carteri* Met1 tatsächlich um eine Erhaltungs-Methyltransferase handelt.

Die Methylierung ist bei *V. carteri* wie bei Vertebraten ausschließlich auf CpG-Dinukleotide begrenzt, eine Methylierung im CpNpG- oder asymmetrischen Kontext wurde nicht gefunden (4.3.1.3). Diese in Pflanzen zusätzlich vorhandenen Motive werden hauptsächlich von Methyltransferasen der für Pflanzen eigentümlichen Chromomethylase- und DRM-Familien methyliert (Cao & Jacobsen, 2002a). Ein Fehlen der Methylierung in diesen Motiven lässt vermuten, dass Enzyme dieser Familien in *V. carteri* nicht existieren oder ebenfalls nur CpG-Spezifität zeigen. Für *Volvox* stellt sich die Frage, welche Methyltransferase die Funktion einer *de novo* CpG-Methylierung übernimmt, einer Funktion, die in *A. thaliana* die DRM-Methyltransferasen ausüben (Cao & Jacobsen, 2002b).

BLAST-Recherchen in der kürzlich veröffentlichten Erstfassung des *C. reinhardtii*-Genomprojektes (US Department of Energy, Joint Genome Institute, <http://www.jgi.doe.gov/>) zeigen, dass es in *Chlamydomonas* mindestens drei v.a. in den N-terminalen Bereichen voneinander abweichende Methyltransferasen gibt. Das Vorhandensein weiterer Methyltransferasen neben Met1, die *de novo* – Funktion tragen können, ist daher auch bei *Volvox* sehr wahrscheinlich. Eine Suche nach entsprechenden Genen, ausgehend von den *Chlamydomonas*-Sequenzdaten, ist jetzt naheliegend.

Die stärkste Expression eines Gens einer Erhaltungs-Methyltransferase erwartet man zur Zeit der stärksten DNA-Replikation, in *V. carteri* also vor und während der Teilungen in der Embryogenese. Untersuchungen der Expression des *V. carteri met1*-Gens waren bisher jedoch nicht erfolgreich. In *Northern*-Analysen konnte weder mit Gesamt-RNA noch mit isolierter mRNA ein Signal erhalten werden (Cakstina, 2001). Daraus wurde auf eine sehr schwache Expression des Gens geschlossen. Dieser Befund erklärt auch die Schwierigkeiten bei der Komplettierung der cDNA mittels RT-PCR. Entsprechende Probleme bei der Analyse des

Cmt2-Gens von *C. reinhardtii* (J. Umen, pers. Mitteilung) haben die selbe Ursache: Extrem schwache Genexpression und vermutlich eine kurze Halbwertszeit der mRNA.

Eine biologische Funktion des Met1-Enzyms zusätzlich zum *silencing* von Fremd-DNA könnte über *knock-out* Mutanten (falls nicht letal) eruiert werden. Bei den einfachen Grünalgen *C. reinhardtii* und *V. carteri* funktioniert diese Methode allerdings wegen sehr seltener homologer Rekombinationsereignisse nicht effizient (Hallmann et al., 1997). Deshalb versuchten wir zusammen mit I. Cakstina (2001), die *met1*-Expression über ein *antisense*-Konstrukt zu reduzieren. Die *Antisense*-Technologie ist bereits mehrmals erfolgreich bei *Volvox* und *Chlamydomonas* eingesetzt worden (Ebnet et al., 1999; Kröckel, 2002; Pfannenschmid et al., 2003). Im vorliegenden Fall wurden jedoch keine eindeutigen Phänotypen erhalten. Wiederholt wurden zwar Mutanten mit Defekten in der Gonidienentwicklung und Inversion beobachtet, gelegentlich traten diese aber auch bei Kontrollansätzen auf. Das kann mehrere Ursachen haben: (1) Die *Antisense*-Methode führt meist nur zu einer Reduktion der Aktivität statt zur vollständigen Abschaltung des Zielgens (I. Kobl, pers. Mitteilung). Eine nur geringfügige Reduzierung der Met1-Aktivität würde vermutlich den Methylierungsgrad der DNA nicht weit genug senken, um Effekte sichtbar werden zu lassen. (2) In *Arabidopsis* gibt es sechs verschiedene Methyltransferasen der Met1-Familie. (Genger et al., 1999). Selbst Vertreter verschiedener Methyltransferase-Klassen können sich in ihrer Funktion zumindest teilweise ersetzen (Bestor, 2000). Auch bei *Volvox* könnten mehrere isofunktionelle Methyltransferasen den Ausfall eines Vertreters kompensieren.

Vergleiche mit bereits bekannten Methyltransferasen legen für Met1 von *V. carteri* eine Funktion als CpG-spezifische Erhaltungs-Methyltransferase nahe. Eine deutliche Reduktion der Expression von *met1* sollte somit zu einer genomweiten Hypomethylierung mit Konsequenzen für das *silencing* von Fremd-Genen und Transposons, vielleicht auch für die Regulation von Differenzierungsgenen führen. Abschaltungsexperimente mit siRNA gelten zur Zeit als effizientester Weg, um Gene gezielt stillzulegen (Myers et al., 2003) und sind geplant. Des Weiteren sind bereits *met1*-Überexpressions-Konstrukte vorhanden, mit denen in zukünftigen Experimenten eine Aktivitätssteigerung von Met1 und somit möglicherweise eine Hypermethylierung des Genoms erreicht werden kann.

5.3 Korrelation von CpG-Methylierung mit dem *silencing* eines Transgens

Ein regelmäßig beobachtetes Phänomen bei der Transformation von *V. carteri* ist die häufig nur schwache oder gar nicht vorhandene Expression des Fremdgens. Immer wieder verlieren unmittelbar nach der Transformation normal exprimierte Fremdgene nach einigen Generationen an Aktivität. Besonders auffällig ist das Ausfallen des bei der Transformation verwendeten Selektionsmarkers, das zum Absterben der zunächst als „positiv“ identifizierten Transformanten im Selektionsmedium führt (Schiedlmeier et al., 1994). Die Inaktivierung von Transgenen wurde ebenfalls bei *Chlamydomonas* (Blankenship & Kindle, 1992) und vielen Pflanzen (Matzke & Matzke, 1995) beobachtet. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Aktivitätsverlust eines funktionell intakten heterologen Transgens in einer *Volvox*-Transformante mit CpG-Methylierung korreliert.

Zwei *Volvox*-Transformanten, Hill 181 und Hill 183, waren 1993 durch biolistische Transformation mit einem Konstrukt aus dem *C-ars*-Gen und dem *Volvox* β 2-Tubulin-Promotor erzeugt worden und hatten Aktivität der codierten heterologen Arylsulfatase gezeigt. Sechs Jahre später, nach ca. 1000 Generationen, zeigte Hill 181 immer noch starke Ars-Aktivität, Hill 183 jedoch nicht. Mittels *Southern*-Analysen wurde ausgeschlossen, dass ein Verlust des Transgens Ursache für den Funktionsausfall bei Hill 183 war.

Die immer noch intakte Integration von *C-ars* in Hill 183 ließ vermuten, dass das Transgen auf epigenetischem Wege stillgelegt sein könnte. Verstärkt wurde diese Annahme durch Reaktivierungsexperimente mit 5-Aza-Cytidin (AzaC) und Trichostatin A (TSA) (Abb. 23, Tab. 15). Dies gab Anlass zu einer detaillierten Untersuchung des Transgens in Hill 183 und Hill 181 auf Cytosin-Methylierung mittels *bisulfite genomic sequencing*. In den beiden ausgewählten Sequenzabschnitten zeigte sich ein deutlicher Unterschied im CpG-Methylierungsgrad zwischen Hill 183 (im Mittel 40 %) und Hill 181 (im Mittel 7 %). Dabei sind in Hill 183 nahezu alle untersuchten Klone methyliert, in Hill 181 dagegen wenige relativ stark, die Mehrzahl jedoch gar nicht (Abb. 24, Tab. 17). Dies deutet darauf hin, dass in Hill 181 die 24 Kopien des *C-ars*-Transgens auf mindestens zwei unabhängige Integrationsstellen verteilt sind, von denen eine methyliert und stillgelegt ist, die andere jedoch nicht.

Bei Säugern findet man häufig CpG-Inseln in 5' oder 3' gelegenen regulatorischen Bereichen, z.B. bei den Globin-Genen, und CpG-Methylierung ist eng verknüpft mit deren transkriptioneller Regulation (Busslinger et al., 1983; Gardiner-Garden & Frommer, 1987).

CpG-Motive treten in codierenden Genbereichen eher unterrepräsentiert auf. Im Gegensatz dazu zeigt das *C-ars*-Gen die größte CpG-Dichte in Exons (14-17 %), wo sich ca. doppelt so viele davon finden als in Introns und *upstream*-Bereichen (7-8 %) (Tab. 16). Dies dürfte eine Folge des hohen *GC-bias* bei Algen der *Volvocaceae* sein (Schmitt et al., 1992). Auch die CpG-Methylierung ist über das gesamte *C-ars*-Gen verbreitet, während bei Säuger-Genen die Methylierung auf die außerhalb der codierenden Sequenz liegenden CpG-Inseln begrenzt ist. Dieser Unterschied lässt sich aus der unterschiedlichen Funktion der DNA-Methylierung in beiden Fällen erklären: Säugergene, die durch DNA-Methylierung nur zeitweise abgeschaltet werden, müssen ihre Integrität behalten. Methylierte C können jedoch spontan zu T desaminieren und werden von Reparaturmechanismen nur schlecht erkannt. Eine Methylierung solcher Gene in der codierenden Sequenz würde also ihre Funktion bei späterer Reaktivierung gefährden. Das Ziel der Methylierung von Fremd-Genen hingegen ist deren dauerhafte Abschaltung. Eine erhöhte Mutationsrate im Fremd-Gen und somit die Möglichkeit, es dauerhaft funktionell zu schädigen, kann dieses Ziel nur unterstützen. Bei dem *Volvox*-Retrotransposon *Osser* konnte dieser Effekt direkt beobachtet werden (5.4).

Wenn *V. carteri* ein Transgen methylieren und damit stilllegen kann, dann sollte bereits *in vitro* CpG-methylierte Fremd-DNA nach der Transformation von Anfang an nicht zur Expression kommen. Entsprechende Experimente bestätigten diese Vermutung (4.3.1.4). Zahlreiche Arbeiten belegen eine enge Vernetzung von DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen zur Etablierung eines heterochromatischen Zustandes, der zur Inaktivierung von Genen führt (Robertson, 2002). Unklar ist noch, ob CpG-Methylierung der erste Schritt zur Inaktivierung von Genombereichen ist, oder nur eine Folgeerscheinung, die vor allem der stabilen Aufrechterhaltung dieses Zustandes dient. Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei *Volvox*, wie auch bei anderen Organismen (Qu & Ehrlich, 1999) die Methylierung von CpG-Dinukleotiden ausreicht, um ein *silencing* einzuleiten. Zusammen mit Experimenten, die Histon-Modifikationen als erste Stufe des *silencing*-Prozesses belegen (Robertson, 2002), führt dies zum Schluss, dass eine Einleitung des Inaktivierungsprozesses durch DNA-Methylierung und Chromatin-Kondensation an verschiedenen Stellen dieses „Netzwerks“ erfolgen kann.

CpG-methylierte Transgene werden also in *V. carteri* nicht exprimiert. Die Methylierung kann dabei künstlich eingeführt werden, *V. carteri* kann aber auch selbständig transgene DNA methylieren und stilllegen. Wie kommt es zu dieser Methylierung im Organismus? Zwei verschiedene Möglichkeiten kommen dazu in Betracht. Zum einen kann der Organismus aktiv

das Transgen als fremd „erkennen“ und es deaktivieren. Dieser Prozess erfordert das Vorhandensein eines Erkennungsmechanismus und einer effizienten *de novo* Methylierungsmaschinerie. Widersprüchlich ist aber, warum dann nicht jede Transformante eines Transformationsansatzes vom *silencing* betroffen ist. Bei ihrer Herstellung 1993 wurden sechs Ars-positive Transformanten gewonnen (Kobl, 1993), nur eine davon (Hill 183) zeigt heute keine Ars-Aktivität mehr. Auch in anderen Fällen trifft ein mögliches *silencing* in *Volvox* nur einen geringen Teil der zunächst positiven Transformanten (Schiedlmeier et al., 1994).

Eine weitere mögliche Ursache für die Methylierung von Transgenen ist ein Ausbreiten der Methylierung aus dem Genom, wenn es in einen bereits stillgelegten und methylierten Heterochromatinbereich integriert. Es wird angenommen, dass die Methylierung in diesem Fall von DNA-Replikation zu DNA-Replikation weiter ins Fremd-Gen eindringt (Vaucheret et al., 1998). Umgekehrt müsste demnach auch beobachtet werden können, dass sich nach der Transformation von *in vitro* methylierter DNA die Methylierung des Transgens auf das umgebende Genom ausbreitet. Erste Hinweise hierfür wurden in dieser Arbeit gefunden (Daten nicht gezeigt) und in weiterführenden Arbeiten bekräftigt (Köppl, 2003). Eine Untersuchung durch *bisulfite genomic sequencing* von Bereichen, die an ein methyliertes Transgen angrenzen, ist derzeit im Gange (R. Köppl, pers. Mitteilung).

Die Tatsache, dass nur einige Transformanten vom *silencing* durch DNA-Methylierung betroffen sind, macht es unwahrscheinlich, dass es einen effizienten Mechanismus zur Erkennung von Fremd-DNA bei *V. carteri* gibt. Wahrscheinlicher ist das langsame Ausbreiten der DNA-Methylierung nach Integration des Transgens in heterochromatische Bereiche. Auch die Beobachtung, dass Transgene erst nach einigen Generationen an Aktivität verlieren, unterstützt diese These.

Die *Southern*- und *plasmid rescue*-Analysen der Transformanten Hill 181 und Hill 183 enthüllten einen interessanten Sachverhalt: Die meisten Transgen-Kopien waren in Tandem-Anordnung hintereinander ins Genom integriert. Darüber hinaus wurde eine direkte Nachbarschaft des *C-ars*-Konstrukts zum Selektionsmarker *nitA* beobachtet. Als Ursache dafür wird eine Rekombination von Selektionsmarker und Fremdgen tragenden Plasmiden zu einem circulären Concatemer vor der Integration ins Genom vermutet. Als Basis für das Rekombinationsereignis dienten die homologen Sequenzen des Vektors. Homologe Rekombinationsereignisse zwischen Plasmiden waren auch schon von Hallmann et al. (1997)

beobachtet worden, eine Ausbildung von langen Concatemeren aus mehreren Plasmiden wird jedoch hier erstmals beschrieben.

Die homologe Rekombination im Genom von *Volvox* ist, wie bei anderen Grünalgen, ein sehr seltenes Ereignis und kann daher nicht effizient zum experimentellen Austausch oder *knock-out* von Genen genutzt werden (Hallmann et al., 1997). Hingegen scheint bei der Transformation von *Volvox* eine Rekombination von Plasmiden relativ häufig aufzutreten. Während die Rekombination von Plasmiden zu einem Concatemer wahrscheinlich durch Topoisomerasen oder Transposon-Resolvase-ähnliche Enzyme erfolgen kann und nur ein Einzel-*crossover* nötig ist, ist für den homologen Genaustausch ein Doppel-*crossover* und ein effizientes homologes Rekombinationssystem erforderlich, welches in *Volvox* aber offensichtlich nicht vorhanden ist. Fraglich bleibt, warum eine homologe Rekombination zwischen Plasmiden bei *Volvox* möglich ist, jedoch die Integration ins Genom, die genauso über ein einzelnes *crossover*-Ereignis erfolgt, fast nie in homologen Sequenzbereichen des Genoms stattfindet (Schiedlmeier et al., 1994). Eine Analyse der zugrundeliegenden Rekombinationsprozesse könnte helfen, die Integration eines Transgens an homologen Sequenzen ins Genom zu etablieren und so Gene gezielt zu zerstören. Ebenso könnte die Expression artfremder Rekombinasen, wie dem vielseitig verwendbaren *cre/lox*-System (Hoa et al., 2002), neue gentechnische Zugangsmöglichkeiten zum Genom von *Volvox* eröffnen.

5.4 *Volvox*-Transposons und CpG-Methylierung

Künstlich eingeschleuste Fremd-DNA wird von *V. carteri* durch CpG-Methylierung stillgelegt. Was sind aber die natürlichen Ziele eines auf DNA-Methylierung basierenden *silencing*-Mechanismus? Yoder et al. (1997) postulierten, dass die Hauptfunktion von DNA-Methylierung bei Eukaryonten nicht die Regulation von Genen, sondern die Abwehr „intragenomischer Parasiten“ sei. Dazu zählen Transposons und Retroelemente, die einen beträchtlichen Teil des Genoms vieler Eukaryonten ausmachen. So bestehen ca. 40 % des Säugergenoms und 50 % des Mais-Genoms aus Retroelementen (SanMiguel et al., 1996; Smit, 1999). Mehrere Arbeiten belegen ein *silencing* von Transposons durch DNA-Methylierung (Miura et al., 2001; Singer et al., 2001). Bei *V. carteri* sind mehr als zehn verschiedene Transposons und Retroelemente bekannt. Werden sie durch DNA-Methylierung in Schach gehalten?

Das Transposon *Jordan-2* (Köhl, 1997), die Retrotransposons *Osser* (Lindauer et al., 1993) und *Lückenbüßer* (Köhl, 1997), sowie zwei neu identifizierte *Osser*- und *Lusen*-ähnliche Retrotransposons, RG3 und RG8 (Amann, 2002), wurden durch *Southern*-Analysen mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen auf CpG-Methylierung untersucht. Alle fünf Transposons zeigten mehr oder weniger starke Methylierung (Abb. 27). Das Transposon *Jordan-2* und das Retrotransposon *Osser* wurden für detaillierte Untersuchungen mit *bisulfite genomic sequencing* ausgewählt.

Jordan-2 zeigte als Vertreter der aktiven *Jordan*-Familie im ausgewählten Sequenzbereich nur eine sehr geringe CpG-Methylierung und ist somit offensichtlich nicht durch DNA-Methylierung stillgelegt. Entsprechend erscheinen auch in der *Southern*-Analyse die vier von der Sonde abgedeckten erwarteten Restriktionsfragmente im *HpaII*- und *MspI*-Verdau in gleicher Stärke. Nur bei einigen der zahlreichen zusätzlich beobachteten Banden treten Unterschiede auf. Die *Jordan*-Familie besteht aus mindestens fünf verschiedenen Mitgliedern (Miller et al., 1993). Die in der *Southern*-Analyse gewählte Sonde kann in den 3'-gelegenen ca. 200 bp wahrscheinlich mit allen Mitgliedern der *Jordan*-Familie hybridisieren, was die Vielfalt der beobachteten Banden erklärt. Einige *Jordan-2*-Verwandte sind offensichtlich in gewissem Maße CpG-methyliert, für *Jordan-2* selbst trifft dies aber vermutlich eher nicht zu. Bei den methylierten Vertretern könnte es sich z.B. um defekte, oder in heterochromatische Bereiche gesprungene und durch Methylierungsausbreitung deaktivierte Transposons handeln.

Im Gegensatz zu *Jordan* ist eine Mobilisierung des Retrotransposon *Osser* im Labor noch nicht beobachtet worden. Ein Abschnitt des für die Reverse Transkriptase und RNaseH codierenden Bereichs des offenen Leserahmens von *Osser* wurde durch *bisulfite genomic sequencing* untersucht. In einer Gesamt-DNA-Probe erwiesen sich 20 % der CpG-Motive als methyliert, in Gonidien sogar 31 %. Dies steht in Korrelation zu den Ergebnissen der *Southern*-Analyse, in der *Osser* die am eindeutigsten interpretierbaren Unterschiede zwischen *HpaII*- und *MspI*-Verdau zeigt. Eine geringere Methylierung von *Osser* in Gonidien, die aufgrund einer gonidienspezifischen Expression des *Osser*-ähnlichen Retrotransposons RG8 vermutet worden war (Amann, 2002), konnte hingegen nicht bestätigt werden. Vielmehr scheint der Methylierungsgrad von *Osser* in Gonidien sogar etwas höher als in Somazellen zu sein, eine Beobachtung, die mit dem Schutz der Keimbahn vor Mutationen im Einklang steht. Sowohl bei *Jordan-2* als auch bei *Osser* wurden Sequenzvariationen beim *bisulfite genomic sequencing* festgestellt. Bei *Jordan-2* wurden drei verschiedene Varianten beobachtet, die sich

durch Insertionen bzw. in längeren Sequenzabschnitten unterscheiden. Hingegen wurden bei *Osser* in 20 untersuchten Klonen 17 verschiedene Varianten gefunden, die sich meist nur in einzelnen Basen unterscheiden. Überproportional viele Einzelaustausche betreffen CpG-Motive. C kann durch spontane Desaminierung leicht mutieren. Während normales C zu U mutiert, das als nicht in DNA vorkommende Base von Reparaturenzymen erkannt und entfernt werden kann, wird aus ^5mC durch Desaminierung T, das nach Replikation in der DNA manifest bleibt. In der Tat lassen sich fast alle beobachteten Mutationen in CpG-Motiven auf C-zu-T-Austausche zurückführen.

Die beobachteten zahlreichen Sequenzvariationen deuten darauf hin, dass auf den meisten *Osser*-Kopien kein Selektionsdruck mehr liegt, weil sie inaktiv als „*junk*-DNA“ im Genom vorliegen. Durch CpG-Methylierung verursachte C-zu-T-Mutationen könnten zum Funktionsverlust des *Osser*-Polyproteins und somit zur entgültigen Stilllegung der betroffenen Transposon-Kopie geführt haben. *Jordan-2* hingegen weist praktisch keine CpG-Methylierung auf. Mitglieder der *Jordan*-Familie sind mit einer Transpositionsrate von 10^{-4} als hochbewegliche Elemente bekannt (Miller et al., 1993). Fraglich bleibt, warum *V. carteri* *Jordan* nicht so effizient stilllegen kann.

Vor kurzem wurde mit *Kangaroo* ein neues Retrotransposon bei *V. carteri* identifiziert (Duncan et al., 2002). Es gehört zu einer neu entdeckten Klasse von Retrotransposons und ist hochmobil. *Kangaroo* wäre demnach ein interessanter Kandidat für Methylierungs-Analysen. Kann *V. carteri* manche Transposons wie *Kangaroo* oder das unbekanntes *Jordan*-Masterelement weniger effizient methylieren und damit stilllegen? Liegen Kopien dieser aktiven Elemente in Genombereichen, die aus funktionellen Gründen (z.B. ein eng benachbartes essentielles Gen) nicht methyliert werden können? Wie bei der Inaktivierung von Transgenen stellt sich auch bei Transposons die Frage, ob ein gezieltes *silencing* vorliegt oder ob sie nur dann durch Methylierungsausbreitung stillgelegt werden, wenn sie zufällig in heterochromatische Bereiche springen. Untersuchungen beim Menschen zeigen, dass sogar Retroelemente, die in Introns sitzen, gezielt CpG-methyliert sind, während Exons und Promotoren der betroffenen Gene nicht methyliert sind (Yoder et al., 1997). Die Beantwortung der Frage, ob die *silencing*-Mechanismen bei *Volvox* ähnlich hoch evolviert sind wie beim Menschen, um eine derart gezielte Inaktivierung von „parasitärer DNA“ zu erlauben, wird eines der interessantesten Ziele in der weiteren Forschung sein.

5.5 Hat CpG-Methylierung eine genregulatorische Funktion bei *V. carteri*?

Neben dem *silencing* von Fremdgenen und Transposons wird als zweite wichtige Funktion der DNA-Methylierung bei Eukaryonten eine Beteiligung an der Genregulation beobachtet. Eine essentielle Aufgabe bei der Inaktivierung des X-Chromosoms und beim *genomic imprinting* ist durch zahlreiche Arbeiten belegt (Attwood et al., 2002), auch bei Pflanzen gibt es Hinweise auf ein *imprinting* z.B. bei der Samenentwicklung (Baroux et al., 2002). Die unmittelbare Beteiligung der C-Methylierung bei der Genregulation im Rahmen der Differenzierung und Embryonalentwicklung war jedoch bis vor kurzem noch umstritten (Bestor, 2000; Walsh & Bestor, 1999). Zahlreiche neue Arbeiten untermauern jedoch Befunde von Gewebe- oder Entwicklungsspezifischen Änderungen des Methylierungszustands in Genen, die in direktem Zusammenhang mit deren Expression stehen (Ehrlich, 2003). Auch in Pflanzen gibt es mehrere Hinweise auf eine Beteiligung bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen, z.B. bei der Blütenbildung (Finnegan et al., 1998; Sherman & Talbert, 2002).

Ist auch bei *V. carteri* CpG-Methylierung an einer direkten Genregulation z.B. im Rahmen der Zelldifferenzierung beteiligt? Hinweise auf eine Beteiligung von CpG-Methylierung an der Regulation von *regA* gibt es bisher trotz gezielter Suche nicht (Pickl, 2001). Eine Demethylierung von *in vitro* methyliertem *regA* wurde hingegen bereits beobachtet. Schleust man *in vitro* methyliertes *regA* in *V. carteri* 153-68 (*regA*⁻) ein, so wird *regA* zunächst nicht exprimiert und die Transformanten zeigen einen RegA-Phänotyp. Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Transformanten mit *in vitro* methyliertem *C-ars* (4.3.1.4) geht in den Transformanten aber bereits nach einigen Generationen die CpG-Methylierung offensichtlich langsam verloren und die Transformanten zeigen mehr und mehr WT-Morphologie (Köppl, 2003). Ist also hier ein aktiver Demethylierungsprozess im Rahmen einer methylierungsabhängigen Regulation von *regA* beteiligt? Oder stellt ein funktionelles, nicht methyliertes *regA*-Gen lediglich einen Selektionsvorteil für solche Sphäroide dar, in denen das Gen nach DNA-Replikation nicht vollständig remethyliert wurde, während hingegen im Falle des *C-ars*-Transgens ein dauerhaftes *silencing* von Vorteil ist?

Das *regA*-Gen wird in somatischen Zellen des „reifen“ Sphäroids exprimiert und unterdrückt dort Gonidien-typische Gene, in Gonidien ist es inaktiv. Eine direkte Beteiligung der DNA-Methylierung an der Regulation von *regA* würde also seine Methylierung in Gonidien, und

eine aktive Demethylierung in somatischen Zellen erfordern. Derartig schnelle, zelltypspezifische Demethylierungsvorgänge sind bisher nicht bekannt.

Viele durch DNA-Methylierung regulierte Gene sind gerade entgegengesetzt während der Embryogenese aktiv, um dann während des weiteren Lebens des Organismus stillgelegt zu sein. Auch bei *Volvox* ist es deshalb wahrscheinlicher, eine Inaktivierung von Genen in somatischen Zellen anzunehmen. In der Tat sind zahlreiche Gene in somatischen Zellen abgeschaltet, während sie in Gonidien aktiv sind, darunter vor allem Photosynthesegene. RegA wird als molekularer Schalter vermutet, der die Expression dieser Gene direkt oder (wahrscheinlicher) indirekt in somatischen Zellen unterdrückt (Stark & Schmitt, 2002). Auch wenn diese Gene vermutlich nicht primär durch CpG-Methylierung abgeschaltet werden, so könnte ihre Methylierung dennoch dazu beitragen, sie dauerhaft stillzulegen. Befunde aus dieser Arbeit zeigen, dass der C-Methylierungsgrad in somatischen Zellen etwas höher ist als in Gonidien (4.1.3) und unterstützen damit diese Vermutung. Eine Untersuchung der in somatischen Zellen inaktiven Gene auf DNA-Methylierung wird deshalb Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

5.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurden Erkenntnisse über die biologische Bedeutung und die enzymatischen Grundlagen der DNA-Methylierung bei *V. carteri* gewonnen. Die Resultate werfen neue Fragestellungen als Anregung und Route für zukünftiger Forschung auf:

- Wie entstehen „circuläre Concatenate“ aus einer Mischung von Plasmiden, die durch biolistische Transformation in ein *Volvox*-Gonidium eingeschleust werden? Sind Topoisomerasen im Spiel?
- Welches ist die biologische Funktion der Adenin-Methylierung bei *Volvox*? In welchem Sequenzkontext tritt sie auf?
- Kann die aus Sequenz-Homologien abgeleitete Funktion von *met1* als Erhaltungs-Methyltransferase durch funktionelle Analysen (z.B. Abschaltung mit siRNA-Strategien/Überexpression) bestätigt werden?

- Wie viele Cytosin-Methyltransferasen gibt es in *V. carteri*? Handelt es sich um Funktionsanaloge oder um Paraloge mit spezifischen Aufgaben?
- Hat die Cytosin-Methylierung neben dem *Silencing* von Transgenen und Transposons bei *Volvox* auch Aufgaben in der Genregulation? Gibt es bei *V. carteri* die dafür benötigten effizienten Demethylierungs- und *de novo* Methylierungs-Enzyme?
- Werden Transgene bei *V. carteri* vorwiegend nach Integration in Heterochromatinbereiche durch Ausbreitung der Methylierung stillgelegt, oder gibt es einen aktiven Erkennungs- und *de novo* Methylierungsmechanismus für Fremd-DNA?
- Kann man die Aussage, dass aktive (mobile) Transposons nicht CpG-methyliert, die inaktiven, nicht mobilen Vertreter dagegen methyliert sind, verallgemeinern? Welchen Methylierungsstatus hat das mobile Retrotransposon *Kangaroo*?
- Kann die Transpositionsrate durch Demethylierung des Genoms mittels 5-Azacytidin oder Abschalten der Erhaltungs-Methyltransferase *met1* (siRNA-Strategien) erhöht werden?

Alle bisherigen Ergebnisse indizieren, dass die DNA-Methylierung bei Pflanzen vor allem dem *silencing* von Fremd- und Parasiten-DNA dient, während bei Vertebraten die Genregulation eine zweite wichtige Funktion darstellt, die bei Differenzierung und Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt. *Volvox* steht in mancher Hinsicht zwischen Pflanzen und Tieren (Schmitt et al., 1998) und ist daher ein geeignetes Modell zur Klärung der Frage, ob bei „grünen Organismen“ außer der Fremdgen-Ausschaltung auch ein positiver, regulatorischer Aspekt der CpG-Methylierung im Spiel ist.

6. Zusammenfassung

Die vielzellige Kugelalge *Volvox carteri* ist mit einer vollständigen Arbeitsteilung zwischen nur zwei Zelltypen - somatischen und reproduktiven - ein idealer Modellorganismus für die Analyse grundlegender Mechanismen von Entwicklung und Zelldifferenzierung. Darüber hinaus bietet die Ordnung der *Volvocales* mit rezenten Formen vom Einzeller über koloniale Stadien bis hin zum differenzierten Vielzeller die einmalige Chance, die Evolution von molekularen Regulationsmechanismen nachzuvollziehen. Schließlich sind diese einfachen Grünalgen auch experimentell gut zugängliche Modelle für höhere Pflanzen. Molekulare Analysen von *Volvox* wurden vor allem durch Etablierung der genetischen Transformation und des *transposon tagging* ermöglicht. Die hier untersuchte DNA-Methylierung beeinflusst diese beiden methodischen Prozesse: Sie beeinträchtigt die Transformation, weil Transgene regelmäßig durch CpG-Methylierung abgeschaltet werden, und hemmt die Transposition, weil „intragenomische Parasiten“ durch sie in Schach gehalten werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Art, den Vorgang und die Funktion der DNA-Methylierung bei *Volvox* aufzuklären, um einerseits Methodisches zu verbessern, andererseits und vor allem aber den Stellenwert dieses „epigenetischen Phänomens“ bei grünen Organismen besser zu verstehen. Folgende Ergebnisse wurden im einzelnen erzielt:

1. Mit dünnenschichtchromatographischen Methoden wurde der Gehalt an modifizierten Basen in Kern-, Chloroplasten- und Gonidien-DNA von *V. carteri* HK10 bestimmt. Nukleäre DNA enthält 1,1 % ^{5m}C und 0,3 % ^{6m}A. In ctDNA dagegen sind diese modifizierten Basen nicht nachweisbar. In Gonidien liegt der Methylierungsgrad der Kern-DNA mit 0,5 % ^{5m}C und < 0,1 % ^{6m}A niedriger als in somatischen Zellen, angesichts experimenteller Fehlergrenzen bleibt aber offen, ob dieser Unterschied signifikant ist. *V. carteri* Poona zeigt mit 0,8 % ^{5m}C ebenfalls weniger C-Methylierung als der Stamm HK10, der Gehalt an ^{6m}A ist in beiden Formen gleich.
2. Das Gen einer DNA-Cytosin-Methyltransferase, *met1*, wurde kloniert und sequenziert. Die cDNA-Sequenz wurde wegen extrem geringer Transkription bisher nur zu ~80 % sequenziert. Das Gen erstreckt sich über ca. 25 kb, enthält mindestens 29 Introns und codiert für ein schwach exprimiertes Protein von 1500-1900 AS. Vergleiche der abgeleiteten Proteinsequenz mit Sequenzen bekannter Methyltransferasen identifizierten Met1 als CpG-spezifische Erhaltungs-Methyltransferase.

3. Die Cytosin-Methylierung ist bei *V. carteri* - wie bei Tieren - auf CpG-Dinukleotide beschränkt. Anders als bei höheren Pflanzen wurde keine Methylierung von CpNpG- oder asymmetrischen Sequenzmotiven beobachtet. Für *Volvox* impliziert dies das Fehlen oder eine andere Funktion von (bei höheren Pflanzen auftretenden) Methyltransferasen der Chromomethylase- und DRM-Familien. Diese Deutung wird durch aktuelle Daten des Genomsequenzprojekts von *C. reinhardtii* in Frage gestellt, die auf mehrere potentielle Methyltransferase-Gene im Grünalgen genom hinweisen.
4. Transgene integrieren häufig in multipler Tandem-Anordnung ins Genom. Als plausible Interpretation werden circulaire Concatemere postuliert, die durch homologe Rekombination der eingeschleusten Plasmide vor der Integration in *Volvox*-Genom entstehen.
5. Das *silencing* des funktionell intakten *C-ars*-Transgens korreliert mit CpG-Methylierung. Die Methylierung erstreckt sich über das gesamte Transgen, wobei der Methylierungsgrad in den Exons am höchsten ist. *In vitro* CpG-methylierte Gene werden nach Transformation von *V. carteri* nicht exprimiert. Sie bleiben auch nach vielen Generationszyklen methyliert.
6. Das mobile Transposon *Jordan-2* weist (fast) keine CpG-Methylierung auf, das nicht-mobile Retrotransposon *Osser* ist dagegen zu 20-30 % CpG-methyliert. Während die zehn sequenzierten Vertreter von *Jordan-2* praktisch homologe Sequenzen aufwiesen (nur drei Insertionen/Deletionen), unterschieden sich 17 von 20 Kopien von *Osser* durch Substitutionen, kleine Deletionen und Insertionen voneinander. Auffallend waren häufige C nach T – Austausche im CpG-Kontext, die auf Desaminierung von ^{5m}C zurückgeführt wurden. Daraus ist zu folgern, dass die Inaktivität nicht-mobiler Retrotransposons wie *Osser* primär aus CpG-Methylierungen resultiert; die Integrität der inaktiven Kopien dieser Elemente geht dann sekundär durch Mutationen verloren.

Die bisher wichtigste biologische Funktion der Cytosin-Methylierung von *Volvox*-DNA ist das *silencing* von Fremdgenen sowie von mobilen genetischen Elementen (Transposons). Offen bleibt, ob Fremdgene direkt erkannt und stillgelegt werden, oder nur deshalb methyliert werden, weil sie in heterochromatische Genombereiche integriert wurden.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, C. R., Stamer, K. A., Miller, J. K., McNally, J. G., Kirk, M. M. & Kirk, D. L.** (1990). Patterns of organellar and nuclear inheritance among progeny of two geographically isolated strains of *Volvox carteri*. *Curr. Genet.* **18**: 141-153
- Adams, R. L.** (1990). DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions. *Biochem. J.* **265**: 309-320
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402
- Amann, K.** (2002). Identifizierung neuer *regA*-kontrollierter Gene bei der grünen Kugelalge *Volvox carteri*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Arber, W. & Dussoix, D.** (1962). Host Specificity of DNA produced by *E. coli* I. Host controlled modification of phage lambda. *J. Mol. Biol.* **5**: 18-36
- Ashapkin, V. V., Kutueva, L. I. & Vanyushin, B. F.** (2002). The gene for domains rearranged methyltransferase (DRM2) in *Arabidopsis thaliana* plants is methylated at both cytosine and adenine residues. *FEBS Lett.* **532**: 367-372.
- Attwood, J. T., Yung, R. L. & Richardson, B. C.** (2002). DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 241-257.
- Babinger, P.** (1999). Identifizierung und biologische Funktion von 5-Methylcytosin und N6-Methyladenin in *Volvox*-DNA. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Babinger, P., Kobl, I., Mages, W. & Schmitt, R.** (2001). A link between DNA methylation and epigenetic silencing in transgenic *Volvox carteri*. *Nucleic Acids Res.* **29**: 1261-1271.
- Bachmann, B. J.** (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**: 130-197.
- Baroux, C., Spillane, C. & Grossniklaus, U.** (2002). Genomic imprinting during seed development. *Adv. Genet.* **46**: 165-214
- Bestor, T. H.** (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 2395-2402.
- Bhattacharya, S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N. & Szyf, M.** (1999). A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* **397**: 579-583.
- Birnie, G. D. & Rickwood, D.** (1978). Centrifugal separations in molecular and cellular biology. Butterworths, London-Boston
- Blankenship, J. E. & Kindle, K. L.** (1992). Expression of chimeric genes by the light-regulated *cabII-1* promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*: a *cabII-1/nit1* gene functions as a dominant selectable marker in a *nit1- nit2-* strain. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5268-5279
- Burton, W. G., Grabowy, C. T. & Sager, R.** (1979). Role of methylation in the modification and restriction of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1390-1394
- Busslinger, M., Hurst, J. & Flavell, R. A.** (1983). DNA methylation and the regulation of globin gene expression. *Cell* **34**: 197-206

- Cakstina, I.** (2001). Analysis of a DNA-Methyltransferase Gene from *Volvox carteri*. Master Thesis. University of Latvia, Riga.
- Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G. & Baylin, S. B.** (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat. Genet.* **21**: 103-107.
- Campbell, A.** (1962). Episomes. *Adv. Genet.* **11**: 101-145
- Cao, X. & Jacobsen, S. E.** (2002a). Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** Suppl. **4**: 16491-16498.
- Cao, X. & Jacobsen, S. E.** (2002b). Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.* **12**: 1138-1144.
- Cao, X., Springer, N. M., Muszynski, M. G., Phillips, R. L., Kaeppler, S. & Jacobsen, S. E.** (2000). Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 4979-4984.
- Cerutti, H., Johnson, A. M., Gillham, N. W. & Boynton, J. E.** (1997). Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **9**: 925-945
- Cervoni, N. & Szyf, M.** (2001). Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J. Biol. Chem.* **276**: 40778-40787.
- Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L. & Frommer, M.** (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* **22**: 2990-2997
- Coleman, A. W. & Maguire, M. J.** (1982). A microspectrofluorometric analysis of nuclear and chloroplast DNA in *Volvox*. *Dev. Biol.* **94**: 441-450
- Doerfler, W.** (1992). DNA methylation: eukaryotic defense against the transcription of foreign genes? *Microb. Pathog.* **12**: 1-8
- Duncan, L., Bouckaert, K., Yeh, F. & Kirk, D. L.** (2002). kangaroo, a Mobile Element From *Volvox carteri*, Is a Member of a Newly Recognized Third Class of Retrotransposons. *Genetics* **162**: 1617-1630.
- Ebnet, E., Fischer, M., Deininger, W. & Hegemann, P.** (1999). Volvoxrhodopsin, a light-regulated sensory photoreceptor of the spheroidal green alga *Volvox carteri*. *Plant Cell* **11**: 1473-1484.
- Ehrlich, M.** (2003). Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J. Cell. Biochem.* **88**: 899-910.
- Fedoreyeva, L. I. & Vanyushin, B. F.** (2002). N(6)-Adenine DNA-methyltransferase in wheat seedlings. *FEBS Lett.* **514**: 305-308.
- Feng, T. Y. & Chiang, K. S.** (1984). The persistence of maternal inheritance in *Chlamydomonas* despite hypomethylation of chloroplast DNA induced by inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3438-3442
- Fickett, J. W.** (1982). Recognition of protein coding regions in DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **10**: 5303-5318.
- Finnegan, E. J., Genger, R. K., Peacock, W. J. & Dennis, E. S.** (1998). DNA methylation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 223-247

- Finnegan, E. J. & Kovac, K. A.** (2000). Plant DNA methyltransferases. *Plant. Mol. Biol.* **43**: 189-201.
- Finnegan, E. J., Peacock, W. J. & Dennis, E. S.** (2000). DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**: 217-223.
- Flavell, A. J., Pearce, S. R., Heslop-Harrison, P. & Kumar, A.** (1997). The evolution of Ty1-copia group retrotransposons in eukaryote genomes. *Genetica* **100**: 185-195
- Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poustka, A. & Murray, N.** (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**: 827-842
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L. & Paul, C. L.** (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5- methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1827-1831
- Gardiner-Garden, M. & Frommer, M.** (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196**: 261-282
- Genger, R. K., Kovac, K. A., Dennis, E. S., Peacock, W. J. & Finnegan, E. J.** (1999). Multiple DNA methyltransferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **41**: 269-278
- Gierl, A.** (1996). The *En/Spm* transposable element of maize. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **204**: 145-159
- Godl, K., Hallmann, A., Rappel, A. & Sumper, M.** (1995). Pherophorins: a family of extracellular matrix glycoproteins from *Volvox* structurally related to the sex-inducing pheromone. *Planta* **196**: 781-787
- Gommers-Ampt, J., Lutgerink, J. & Borst, P.** (1991). A novel DNA nucleotide in *Trypanosoma brucei* only present in the mammalian phase of the life-cycle. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1745-1751
- Graham, M. W. & Larkin, P. J.** (1995). Adenine methylation at *dam* sites increases transient gene expression in plant cells. *Transgenic Res.* **4**: 324-331.
- Gruber, H., Goetinck, S. D., Kirk, D. L. & Schmitt, R.** (1992). The nitrate reductase-encoding gene of *Volvox carteri*: map location, sequence and induction kinetics. *Gene* **120**: 75-83
- Gruber, H., Kirzinger, S. H. & Schmitt, R.** (1996). Expression of the *Volvox* gene encoding nitrate reductase: mutation-dependent activation of cryptic splice sites and intron-enhanced gene expression from a cDNA. *Plant Mol. Biol.* **31**: 1-12
- Hallmann, A., Rappel, A. & Sumper, M.** (1997). Gene replacement by homologous recombination in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 7469-7474
- Hattman, S., Kenny, C., Berger, L. & Pratt, K.** (1978). Comparative study of DNA methylation in three unicellular eucaryotes. *J. Bacteriol.* **135**: 1156-1157
- Hayatsu, H.** (1976). Bisulfite modification of nucleic acids and their constituents. *Progr. Nucleic Acids res. Mol. Biol.* **16**: 75-124
- Hoang, T. T., Bong, B. B., Huq, E. & Hodges, T. K.** (2002). Cre/ lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. *Theor. Appl. Genet.* **104**: 518-525.

- Ish-Horowicz, D. & Burke, J. F.** (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989-2998.
- Jenuwein, T.** (2001). Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell. Biol.* **11**: 266-273.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. & Wolffe, A. P.** (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* **19**: 187-191
- Kim, G. D., Ni, J., Kelesoglu, N., Roberts, R. J. & Pradhan, S.** (2002). Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J.* **21**: 4183-4195.
- Kirk, D. L.** (1990). Genetic control of reproductive cell differentiation in *Volvox*, p. 81-94. In W. Wiesner, D. G. Robinson & R. C. Starr (ed.), *Experimental Phycology, Volume 1: Cell Walls and Surfaces, Reproduction and Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin.
- Kirk, D. L.** (1998). *Volvox: Molecular Genetic Origins of Multicellularity and Cellular Differentiation*. Cambridge University Press, Cambridge
- Kirk, D. L. & Harper, J. F.** (1986). Genetic, biochemical, and molecular approaches to *Volvox* development and evolution. *Int. Rev. Cytol.* **99**: 217-293
- Kirk, M. M. & Kirk, D. L.** (1985). Translational regulation of protein synthesis, in response to light, at a critical stage of *Volvox* development. *Cell* **41**: 419-428
- Kirk, M. M., Stark, K., Miller, S. M., Müller, W., Taillon, B. E., Gruber, H., Schmitt, R. & Kirk, D. L.** (1999). *regA*, a *Volvox* gene that plays a central role in germ-soma differentiation, encodes a novel regulatory protein. *Development* **126**: 639-647
- Klaas, M., John, M. C., Crowell, D. N. & Amasino, R. M.** (1989). Rapid induction of genomic demethylation and T-DNA gene expression in plant cells by 5-azacytosine derivatives. *Plant Mol. Biol.* **12**: 413-423
- Kobl, I.** (1993). Eignung von *ars* als Reporter gen für *Chlamydomonas* und *Volvox*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Kobl, I.** (1998). Einsatz optimierter Reporter gen-, Antisense- und kompetitiver PCR-Verfahren für die molekulargenetische Analyse von *Volvox carteri*. Dissertation. Universität Regensburg.
- Kochert, G.** (1975). Developmental mechanisms in *Volvox* reproduction. *Symp. Soc. Dev. Biol.* **33**: 55-90
- Köhl, G.** (1997). Eigenschaften und Verbreitung typischer Transposons der Grünalge *Volvox carteri* f. *nagariensis*: Lückenbüßer und Jordan-2. Dissertation. Universität Regensburg.
- Köppl, R.** (2003). Epigenetische Kontrolle der Genaktivität durch Methylierung bei *Volvox carteri*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Kröckel, U.** (2002). Lokalisierung und mögliche Funktion des DIP13-Proteins in Zellen von *Volvox carteri*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Laird, P. W. & Jaenisch, R.** (1996). The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 441-464
- Leonard, S. A., Wong, S. C. & Nyce, J. W.** (1993). Quantitation of 5-methylcytosine by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *J. Chromat.* **645**: 189-192

- Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H. U. & Bestor, T. H.** (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**: 865-873.
- Lindauer, A.** (1993). Hinstongene und Transposons: Identifizierung stadienspezifischer Transkriptionssignale und Markierung entwicklungssteuernder Gene bei *Volvox carteri*. Dissertation. Universität Regensburg.
- Lindauer, A., Fraser, D., Brüderlein, M. & Schmitt, R.** (1993). Reverse transcriptase families and a copia-like retrotransposon, Osseer, in the green alga *Volvox carteri*. *FEBS Lett.* **319**: 261-266
- Liu, Y., Oakeley, E. J., Sun, L. & Jost, J. P.** (1998). Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Res.* **26**: 1038-1045.
- Mages, W., Salbaum, J. M., Harper, J. F. & Schmitt, R.** (1988). Organization and structure of *Volvox* alpha-tubulin genes. *Mol. Gen. Genet.* **213**: 449-458
- Matzke, M. A. & Matzke, J. M.** (1995). How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol.* **107**: 679-685
- Miller, S. M. & Kirk, D. L.** (1999). *glsA*, a *Volvox* gene required for asymmetric division and germ cell specification, encodes a chaperone-like protein. *Development* **126**: 649-658
- Miller, S. M., Schmitt, R. & Kirk, D. L.** (1993). *Jordan*, an active *Volvox* transposable element similar to higher plant transposons. *Plant Cell* **5**: 1125-1138
- Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. & Kakutani, T.** (2001). Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* **411**: 212-214.
- Myers, J. W., Jones, J. T., Meyer, T. & Ferrell, J. E.** (2003). Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nat. Biotechnol.* **21**: 324-328.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. & Bird, A.** (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389
- Novick, R. P., Clowes, R. C., Cohen, S. N., Curtiss, R., 3rd, Datta, N. & Falkow, S.** (1976). Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.* **40**: 168-189.
- Nozaki, H., Itoh, M., Ryosuke, S., Uchida, H., Watanabe, M. & Kuroiwa, T.** (1995). Phylogenetic relationships within the colonial volvocales (chlorophyta) inferred from *rbcL* gene sequence data. *J. Phycol.* **31**: 970-979
- Ohresser, M., Matagne, R. F. & Loppes, R.** (1997). Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the *nit1* promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* **31**: 264-271
- Pfannenschmid, F., Wimmer, V. C., Rios, R. M., Geimer, S., Krockel, U., Leiherer, A., Haller, K., Nemcova, Y. & 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.
- Pickl, P.** (2001). Untersuchung zweier Kontrollmechanismen der *regA*-Genexpression bei *Volvox carteri*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.

- Pintor-Toro, J. A.** (1987). Adenine methylation in zein genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**: 1082-1087.
- Provasoli, L. & Pintner, I. J.** (1959). Artificial media for freshwater algae; problems and suggestions., p. 84-96. *In* C. A. Tyron & R. T. Hartman (ed.), *Ecology of Algae*. Special Publication No. 2, Pymatuning Laboratory of Field Biology, University of Pittsburgh.
- Qu, G. Z. & Ehrlich, M.** (1999). Demethylation and expression of methylated plasmid DNA stably transfected into HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2332-2338.
- Randerath, K., Reddy, M. V. & Gupta, R. C.** (1981). 32P-labeling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6126-6129
- Razin, A.** (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J.* **17**: 4905-4908
- Robertson, K. D.** (2002). DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* **21**: 5361-5379.
- Rogers, S. D., Rogers, M. E., Saunders, G. & Holt, G.** (1986). Isolation of mutants sensitive to 2-aminopurine and alkylating agents and evidence for the role of DNA methylation in *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **10**: 557-560
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y. K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P. S., Edwards, K. J., Lee, M., Avramova, Z. & Bennetzen, J. L.** (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* **274**: 765-768
- Schiedlmeier, B., Schmitt, R., Müller, W., Kirk, M. M., Gruber, H., Mages, W. & Kirk, D. L.** (1994). Nuclear transformation of *Volvox carteri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5080-5084
- Schmitt, R., Fabry, S. & Kirk, D. L.** (1992). In search of molecular origins of cellular differentiation in *Volvox* and its relatives. *Int. Rev. Cytol.* **139**: 189-265
- Schmitt, R., Stark, K., Fabry, S. & Kirk, D. L.** (1998). *Phylogenetic relationship of volvocine algae to plants and animals*. Chapman & Hall, London
- Shahbazian, M. D. & Zoghbi, H. Y.** (2002). Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. *Am. J. Hum. Genet.* **71**: 1259-1272.
- Sherman, J. D. & Talbert, L. E.** (2002). Vernalization-induced changes of the DNA methylation pattern in winter wheat. *Genome* **45**: 253-260.
- Singer, T., Yordan, C. & Martienssen, R. A.** (2001). Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene Decrease in DNA Methylation (DDM1). *Genes Dev.* **15**: 591-602.
- Smit, A. F.** (1999). Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 657-663.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Stark, K.** (1999). *Das regA-Gen von Volvox carteri: Elemente der Genregulation und Zielgene der RegA-kontrollierten Differenzierung*. Dissertation. Universität Regensburg.

- Stark, K., Kirk, D. L. & Schmitt, R.** (2001). Two enhancers and one silencer located in the introns of *regA* control somatic cell differentiation in *Volvox carteri*. *Genes Dev.* **15**: 1449-1460.
- Stark, K. & Schmitt, R.** (2002). Genetic control of germ-soma differentiation in *Volvox carteri*. *Protist* **153**: 99-107.
- Starr, R. C.** (1969). Structure, reproduction and differentiation in *Volvox carteri* f. *nagariensis* IYENGAR, strains HK 9 & 10. *Arch. Protistenk.* **111**: 204-222
- Starr, R. C. & Jaenicke, L.** (1974). Purification and characterization of the hormone initiating sexual morphogenesis in *Volvox carteri* f. *nagariensis* IYENGAR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1050-1054
- Talaska, G., Roh, J. H. & Getek, T.** (1992). ³²P-postlabelling and mass spectrometric methods for analysis of bulky, polyaromatic carcinogen-DNA adducts in humans. *J. Chromatogr.* **580**: 293-323.
- Tamaru, H. & Selker, E. U.** (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**: 277-283.
- Umen, J. G. & Goodenough, U. W.** (2001). Chloroplast DNA methylation and inheritance in *Chlamydomonas*. *Genes Dev.* **15**: 2585-2597.
- van Blokland, R., Ross, S., Corrado, G., Scollan, C. & Meyer, P.** (1998). Developmental abnormalities associated with deoxyadenosine methylation in transgenic tobacco. *Plant J.* **15**: 543-551.
- Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Mourrain, P., Palauqui, J. C. & Vernhettes, S.** (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* **16**: 651-659
- Vieira, J. & Messing, J.** (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268
- Walsh, C. P. & Bestor, T. H.** (1999). Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev.* **13**: 26-34
- Walsh, C. P., Chaillet, J. R. & Bestor, T. H.** (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat. Genet.* **20**: 116-117.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. C.** (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737-738
- Weismann, A.** (1889). The continuity of the germ plasm as a foundation of the theory of heredity. In E. B. Poulton, S. Schonland & A. E. Shipley (ed.), *Essay upon heredity and kindred biological problems*. Clarendon Press, Oxford.
- Wilson, G. G. & Murray, N. E.** (1991). Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 585-627
- Wilson, V. L., Smith, R. A., Autrup, H., Krokan, H., Musci, D. E., Le, N. N., Longoria, J., Ziska, D. & Harris, C. C.** (1986). Genomic 5-methylcytosine determination by ³²P-postlabeling analysis. *Anal. Biochem.* **152**: 275-284
- Wu-Scharf, D., Jeong, B., Zhang, C. & Cerutti, H.** (2000). Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* **290**: 1159-1162.

- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119
- Yoder, J. A., Walsh, C. P. & Bestor, T. H.** (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* **13**: 335-340
- Zeschnigk, M., Schmitz, B., Dittrich, B., Buiting, K., Horsthemke, B. & Doerfler, W.** (1997). Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 387-395
- Zhang, C., Wu-Scharf, D., Jeong, B. R. & Cerutti, H.** (2002). A WD40-repeat containing protein, similar to a fungal co-repressor, is required for transcriptional gene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J.* **31**: 25-36.

8. Anhang

A1. Sequenz von *met1*. Nukleotidsequenz des analysierten Genombereichs (Abb. 18). Großbuchstaben, Exons; Kleinbuchstaben, Introns und nicht codierende Sequenz. Einzelsträngig sequenzierte Bereiche sind mit einer durchgezogenen Linie über der Sequenz markiert, Sequenzlücken sind mit (XXX) markiert und gesondert bezeichnet. Unter der Nukleotidsequenz ist die aus der cDNA abgeleitete Aminosäure-Sequenz im Einbuchstabencode aufgeführt.

```

1  ctcgagatggggcgtgcatcaacgagcacaattgctgtctgtaaaacttttcatctataaagatcgtgcoctatccctttctattattataaccaggctgc 100
101 gatctatagacgaccataaagtttacagacgtgctcaacaactacgaagcttaacgctgctaaaccgttcttctgttttgagcggattagccgtgtgcgga 200
201 gactccctgcgccctaatttcaaggttggtatcacagttatctgctgcagccggcatgtaacatatgtatcgtgtcctgtcctatacatgcccataaac 300
301 tgatttgctaaaaacgccttaacgccttcataacatgtatgtttacctatgctcgcgttggccatggagtagctagtgtctggagcataaatctgttt 400
401 tccgcgcgggggcggtttttattatttgcacacagggcgcgcgagcggcgctgagggcascggtttcacaacctattgctgtcttaacatataca 500
501 tcattaacacctccaatcttttccctcctgtcgtttttccctcgcagttcaacgtgcaagctcgttgcgtgattgatgatgcatttgtgtcggccacc 600
601 atcaacggagttcccacggcaattagtcccgcatttgatattcctcaagatggcaacctggcagcgcagttttgcgattggccgggctaggtctgaacc 700
701 ttgccagcaacggcgcccaaatctgcatcactctgaagcctaacctggacggacagggtgcactactctgaggagctctgtgccttaccagcgaagg 800
801 cacagaagaagggcgctgcttggttgccatgattggtccaacattggaatgctgctcgcctcacgaccattggaagggaccagacccaccgcgagctcg 900
901 gccaccccaagccagcttattacagtacaacttctcccccatcttaccgccctaccctctgatccaccgcccccaactcctccacmccgctctctccc 1000
1001 tcttctgtctatctttcatcctccccttcgccaccgtcccgttctccaactccacttccaacgcctgcagcacttgccttctgtctcggctcgacatgg 1100
1101 atctcccagatacagctcttttacattgacgataatgtctgttctgtgtgcaagagcagattgcctccaacatcacagcccaaattagatcatggggct 1200
1201 cctccccatgattgccaacttcacagctgacctatacgggtgcgaggggtcaaggaatcagcgtttgtgggacctctctttcagcgtccgacgccaagaag 1300
1301 cttagaccctgggtaaggctccaggccccgtcttggtcggcagtttggttgccgatgcagcccgattttgctgggctcagttccggatcacgacgg 1400
1401 attcaataaatgctaacctgaacgcggatgagctgcagcggagcaggtggcatttccgtctcaagtaaggcttgcgggtgcttctgtgatga 1500
1501 tgataaggcagctcgggtcacgaaggttgattgaaatgttgtaggtaagcaggtctaggatgtagcatgtgccttacaagatgcatacagagacgc 1600
1601 tgcctctgtgctatctaggtgctatcgtcctcttattattaccaactccaaaacatttcgggatcggtcatccaaatgtactcgggtgcttaggtcggt 1700
1701 gatttggcaattctattcatatgcatgtgtggacagcagcagtaactacttcttagtgcttctagctacgtgacagaacaaagctcttcatctcgc 1800
1801 tatagcaggtaactggttagacggttgcgtcaatacatatggtaggcactgtcggatgtagggctgctgacctgggaaacagataaatgagcccgcatgc 1900
1901 atgcacttgcgtaagtagtgaagtaccacgtggcgcttctcctagggcggataaacggccttaacaggcttgctgacctgctgcgctgctgaccttc 2000
2001 ctgctgccccgtctctgctgccgctgctgctgacacacacactactgctaaacaaccatacaatgctgaaagcatacaatacgtttaatcctagcgaa 2100
2101 tcattcgttaggtcaaaaataatcagattcgttggaataggcaaaaggcctgtgcaactcaatcatttgcgtgcatgctgtagcatgagcagaag 2200
2201 agaagtacagcagccattctacgcatgcccgtcggcaacaaatcaagggcaggccgctgtcgaaacaccaacctgtactgcttccgactgctattat 2300
2301 tgccctggatgattacctgtagaggtgctgctacgtatgtagttaggtgcatgcttataatcatgttgcataatggacaatacacacacacagc 2400
2401 cacactcgatattagctagccactgaaagggcccatcatgacgccgacagaccgcttgcagcggctcgtcgacgacgctgtgacatacatatcacgga 2500
2501 caatagctactgcgcaagataccgaacctttcgtctgttgcttgacctcctctgccctcgttgcctcgcgtctaccattcaagctccccgttctcag 2600
2601 ggccttgcagctcgggcacgacgctcaacaaggctgagattgggcccgtcagtagcttgcggggggcgcctcaacactgcatatacagctgctgct 2700
2701 agcgggcatccactcaaggctgcatgctctgtttgtttaagtttggeatataatgaagacattttagcgcataaaaaatgtcgggtcactgcttgcac 2800
2801 ttgtaatttccctaatctcctattggaataagcataacgttatgacgactgctaccacagacaaaacctccgcccgaagcccggtattcgactga 2900
2901 ccccaacggcgctacccttgggaagtcgcatcgtgggagggcattggggaaccgactgaaaggttgcgtgctgctttaaattgtttataagaac 3000
3001 cacatcgacaccgattaccgacaatcaggacgggacaggttggaagcagatctggtcaagaatgcctgcagcagcttctgctacctgacgcaacaataa 3100
3101 aataatgctgccagcgtgagatgtagcttttgaataggcaggatacctactacacctctgctgctgctgctgctgctgctgctgacttctcatcat 3200
3201 cagctactcgatcgcgccatgcatgactcaggtgcaacgggaccccccgatcgcgccagatcgccctcaactaaatgacctgattggctttaagcac 3300
3301 ctgtgtgtgctgacccggcctgcccaatattgtagtaaccaacatcaactgggtctgtcggaggctcacgggtggtgagattgcatgagctcaagaa 3400
3401 catcacctccttgagttcgtgtgtctaggagaccaccaggaacctggtaagccttctgtggtttagggttttacacatacacacacacacacagggac 3500
3501 acacacatgcatgacatgacatgcatgctgctgctcctcaagcagtgatgcaacctaaactgaccgtgtttgacgaggtggtgtcaag 3600
3601 tgttggtagcggcattataattataacaaatgctgtataaactgggtatctgctccttggatgaccttggtaagcagcgtgataatgctcaattgt 3700
3701 gcgcaaacacgctatcctttgataggcacacacacgctgtagttgagtagcgtgtgacagatgtacaagcttccgcccgtgttctcttgcgtc 3800
3801 atatatgtgtgctgctgctgcatgtagacacatgtgtaccggacgacacatgtcagctcccctgggcatgctcccgcccttgacaagctccct 3900

```

3901 tggcatctcctgcgagaaataataataatagtaacgcccggcggggctggcgtgtgtaagggggtggggaactgagggcgcgtagccgctcctg 4000
4001 tatgcccgcaccaccgtgggtcctgcgagtagcccttctgctgtctctacacttagtccgctcctgccatctgttcttagccgcttagctaataaccct 4100
4101 ctgcccctctccctgctgctgtgctcaactgcaaaactcctggctcgttacctggagcttacagctacatcagcctgttacaacgaccggacctgc 4200
4201 tgccccacttaccagtcctggtggggccggtaccctagctgtcctcggggtgttctgtttatgctgataatgatgatattatgtacctgttctcttac 4300
4301 catgtagggtgctcgttcgtgcagtcagtagggcgtttgctgttgataaacgagcgtcagtgagcatttcgtaactcgggtatttgttagctatttgcctttg 4400
4401 ctgctgctgctgctcgccgctgggtttttttggccctggcgccgacatggttggattaattgcaacgcccacacaaaaatctaccgatgtatg 4500
4501 ggaacgctcgtgtggtggggatcatgtagagattatgtatggcacgctgcaggttagaggacttcggaaatccgcccgtgctgcttctgttcaatttgcgg 4600
4601 acttggcttatgatgtgtagattatggttgcagtgatgatgggaccagcagcagcaatcagttgaacgcccgtggctgatgctgcccagctgatcgaatgaa 4700
4701 tgcacactaccocctcctcctgactcaggttagtggtagcgtgtggtacatttagcgtcacgatttttatcgatacctgttgggttacattttatg 4800
4801 tgcactggtggattggcaatattcctttggattggtgatagcgcgctgcccacatctgagtgatgctacatataagcattctatttcaatacccca 4900
4901 caacagcagtagccctactcaccagcaggggtcactttctggtgatgcagctagttgcaggatttgcacttgcgggcatggcactttggtatttgcca 5000
5001 tcatgtcagacatgtatgtaactatttctcgcagtgatgtaactatttaccacaaatctccctgcccgtgttcgctccttgcggcgtgcaacctgttattag 5100
5101 ttaaggggacttcaacagccataactgttattgcaactcgttactacagagctgtttagcacttttcggcactatctgttaaattgcttacgtgca 5200
5201 tagttgtaatacagtaaatctcttctaccgtccttgagtaacaaggataaaactctgtacgatactgtactttgagtttctttttttacctttcc 5300
5301 tgttccaagctacggtggctcctctggccctaccagctcgacaaagcttgtgacaaaaatgcaaaagggtcaggatcagcgcaccgaataactaagg 5400
5401 gtaaaagtcttttgcgcaacaatttgattatgactgcagccgaaaaggcaggactggcatataggtttgcttgggtgcccacaaataagacatc 5500
5501 gtacacctgagtcctagctcgcagctcgaagttacgacaggtccaacacaaaggcccgaagatcgcaacttacttcgaaacatttacagctctctaa 5600
5601 gataatgtcgcgttgtgctacgttcgcggtgatttggcaaaactgtcgaagaaccagcaagaagaatcgcagtaatcattaccaagtaaaagggtggtg 5700
5701 caagaacgcatgctgtgctgagaagaagggggccgcccagggcgagcaagcaaaactggggcaaccgcccggcagggcatcaccctcctacagc 5800
5801 aacggctgtcaacacgaaagcctaacgcccgtttcagggactcagcgaagacaagctagttatctgcttatatgatttgtatcttagcgggtttcag 5900
5901 tagcggcagcagattgttcatgaccggacatgacccggcctgtgaaacgctcagacagaacctcgtaagtgtaacgctatcgtaactcgcgctca 6000
6001 ggagcagaggccatccaataagccgttagccctgaatgacctgttttctgctgaggtcatttcgttgtccgctcgcctaacgctctctcattacaccgat 6100
6101 caagagagggtgtaagtgcattcacagctcgcgtgctgctcaggtccgactcctggtgtaaccgtgacccatgtatggcttgggctcgcagttctcaccct 6200
6201 taaagagcttagtacacctattcatgcccggccatccagcgtctacacacagctcatgctggccgggtactaggaaacatccggtaagctctggatgc 6300
6301 actggatattggccacttagaagcttgcggccatatttctcctggagctaccgatcacaccagttacctggaggatccaggcagtggaagatcgatca 6400
6401 tgttctcgtgctgaccatttaccgaaagttaagactatccttcttagttccctcttcaagtgcatgtgagaaatataaaaccagaacctaacaggg 6500
6501 tgttctcactgtccgaacactatctcggtagactatgtgctagtggtgacttagtggtgaggtgttccactagcggcactaaggagcgcgcaaaac 6600
6601 aaaattgtttcgtattttgaaagcttttagcggcagggttaattgctgataaattgtcaaggtctgtaagaattcgcgtagtaggactccgctgcccgcga 6700
6701 gcctcgtcatgatgtccgcatgaagtccgcatggtgcatggcaacgctccggccagcaaggaaggcaaaactagcggatattgttgcgtgaacgcttat 6800
6801 tgaaggagggtccattgcaaaatggcgggttctgaggctgctcgtgttggcgctgcgcaagtcaacgcccgtttgcaaggaaggaagaaatagctg 6900
6901 cttagctctaaagtctggtgtagaaggacaatccagctcataaaagtgcggcccaaaactacttagtctaggtactaaagttaatggcaggtctgagg 7000
7001 tccaataacttttagtgctgcttagtggtgacttagtgtaggggtgttccactaggccttacggctcctccgcccaggagtcccccaacctccaatttgggt 7100
7101 gatgaatatttctactatcattagtagtatacaatataatgcaatttagaacggcgagagcaggtccaggacgaaaaacatcaaaactattgntagtggt 7200
7201 cggccaagtggaaacaccctgtaacagacagctcttaaggaataactcaattctactcttttaggaataacttgacttgcactctctcttactctccg 7300
7301 ctatccatgacgcaagaagcaatattgtaagttatgatattagtagtggctgtttgggctgcatgtacggaagcggggagttaaatgaagttgatctc 7400
7401 tccgttggatctgcctcggcaagcagattgggtcaattagattagcatcttccctacttgcaatattgggttaacggggtgccaccgcccgtgcaaaag 7500
7501 gacagccgtgggagagcaatgaaggagcctttgcagagtgctggagcgcacttgaatactcaccagctggtgcaaaaggtcaggaagagagttataat 7600
7601 gggccgaattgtctcagagagatgacttatgattcatgtcagtttcgatggccttgctatcctaaaaatttccgggtgggtcttattgaaaaatgcgttta 7700
7701 ttgaaagttaaccataggtggtgcttgtatgcttacgaagattgtaccgacagatattggacagcgcaccctacccttttccggggttaacgcccgt 7800
7801 gacctggtaacgtcaattgtacaggtactcttgaacgaaaaactgaaggaattcccgaattggctaccgatggcaacgggtcccgcacaaagcgaac 7900
7901 atcggagaaggtgcttccaaacgtgatgcccctcttctcagtgaaaccagtttcaggacgggctacttcatgaggctatgatgtattttaaagg 8000
8001 gtgctcgtcagatagcccaaccagttggactttctgcatgacatgacacatgactcctgttctcctcatagcatagcacattgacgcccgggaagcgt 8100
8101 atgtggacatcgaaaacagcagttgagctatgaactcacatgcgtctcctgtagggggcctgaacttatcagatgcgtcctagccgtcctcccgaagcgt 8200
8201 acctctatctcctcggccatcaggcaccagcgcgcccggataacggcaacagatgctgcagctgctgctgttctcagttctcagcagagccctcc 8300
8301 ggtcctctctcagcgggaaatcaaaatccacacatgctcaatcagcgttgacagtgctgcagccgctggctctgctcccaccgctggcggcagggcg 8400
8401 ccgcccacattggcgtgagggcgcgctgtggcggaggtgaagcacctcacgggctcggctgaggcggcggagggcggcggacccaagggtaagaagca 8500
8501 aaaggtgtgcaacttaccgccaccgctggtgctgcaacagcgcgaacggcaagcgaacggcggataggccagcagtggtcagtagcgaaggcg 8600

20501 atcaactcgctgactaaactgcgctaccatggctgctatgtacgcaggtccgccgctttaccggcctgaggacgtgtcccccgatgtggcttaccgga 20600
20601 ctggctggtgggacctctacatgccgccgctgtcggagggaaacggaggagacccggagcgtgctagagctgtccgtggaggaggtatcggcaaatgtga 20700
20701 cgtcgcttttggggccagccacgaccgaagtaggtacctgcgagtgctgtgtgtgtgttgggtgcgtccgtgctttgtgtgtatgtgcgagaagaggat 20800
20801 atcgcttatgtcgtgtgtgtcgtctgcacactgcttgttacatgtgattatacatcgaggaggaaaggaagtgtgagcactctccccctgcgtcca 20900
20901 cacctccaaccccccccaccaacccctatgatgacctcccgcctcatgtactttagtggctaaccagtaggtaggttaaggcagtgaggcagggttag 21000
21001 ggaggtagggtttcccctgctgcttgcgctaccaggagagccatccgcatgtatccgacacatcacacatgcacggtggaggttaaggaagaagaa 21100
21101 aggagaaggaaggtatagctacgtgtcagcaaacacactaacccacagggcaccaccaccaccaccgcttgcacatactttcccaacgcagatcctgt 21200
21201 tctggatacgttccaagtgggtgggtcgtacgacctcgccagcccgccgacaccggggccccccgacccctctcccacaccgccaactgccagca 21300
21301 ccgcccagcagcagtcagggcattggcgccaaggtcaatgggtggcagggcgccgggagGAGGATGGAAGGGGGGACGGGGAGGAGGACGTAGAGCGGCAG 21400
E D G R G D G E E D V E A A V
21401 TTCACGAAGATGGCGGCGAGGGTATTTCAGTTGGACACGCTGGACATCTTTGCGGGTGTGGCGGACTGAGCGAGGGTATGCACAGGtgcggggcgaggg 21500
H E D G G E G I Q L D T L D I F A G C G G L S E G M H Q
21501 gaggtaaggggggaaaggggggaggggaaaggggtggggcaccgccccgggagcagaggggtatgggcttaccgggttcggcacatgacgatgacca 21600
21601 tgacaatgcaaaatggcaatgacaatgacaatgcaaaatgacagtgatctggtcatcgtatctcgaagcatccgtgctgatgacgtcgtccgccc 21700
21701 catcgccatcgattccttttctgctgacgccaatccatctacaccgtgcgtaacctcccagGCGGCGTGGCTCGTACTCGTGGCCATCGATACGACAG 21800
A G V A R T R W A I E Y D S
21801 TGAGGCAGCCGAGGCATATAAGCTCAATAACCCGGATGCCAAGTCTTTTGCAACAACGTAACGTAAGTCTGCTGCGGgtgaggtggcgataacgggatgg 21900
E A A E A Y K L N N P D A K V F C N N C N V L L R
21901 gggaaatgaggggtgtgttctcggaggagtaattgggggtgggtgaatgaaagtgggtgggtggtctgtgggtgggtgcttcttctttccagc 22000
22001 gcattagcagccgggtactgggaaataaacggggggcggggggggtgggtgggtgggtgcgcccgtgttctcccttggggggggagccaggggct 22100
22101 tagtagcagatcccaaatattctcctcttctgcttctcttctcgcgacgcccactcctagccctaaaccccccaaccgactctcaacgatatcc 22200
22201 acgtctttogattgtgcttacaccccccttcttcttcttctaccctccttctccttcttctcccgaattccccccccagcaacactactccgctacc 22300
22301 accaactattcacctgaacatggcgagcgcacatctcccacatcagactctcccacctggggccttcccacctgaatgaaacccacagGCCCCAT 22400
H Y S P E T W R A P H L P N H D S P H L G P S P P E * N P Q A A M
22401 GCTCAAGCCGGGTTTGAGGCGGATTGCTGGTACCCACCGTGTGGAGGCGGCTGCCGGACTGGACGCGCCACCCCTGGGCGACCTGCCGACCCCT 22500
L K A G F E A D C L A D P T C V E A A A G L D A A T L G D F L P T P
22501 GGTGCGTGCCTCATGATGGGCGGCGCCCTGCCAGGCTACTCGGCATGAACCGGTTCAACAAGGGGCTCTGGTCTCAAGTGCAGAACGATGg 22600
G S V A L M M G G P P C Q G Y S G M N R F N K G L W S Q V Q N S M
22601 tgagattgggagaggggtaattgggtggggaaggggaggggactattgggggtggggagggtaggtgggtggtcatgtaggagttatgtagaag 22700
22701 ttggtgggttttatgacgtggagctctgtatgtacgtcagcagcgatccatccccactctcgggtcctgccaccatgccacacacaaccccgccag 22800
22801 catttgtgcgaatcctcaaacctggctggttgcgatatacaaatgtgaacattcagGTCATGGCGTATTGTCGTAAGTCTACCGCCCGC 22900
V M A Y L S Y C D F Y P R
22901 GTACTTTTGTGGGAGAACGTGCGCAACTTTGCGGTGTACCGCGTGGGAGGTTTTCGACTTGTGTCGACGACGCTGCTGGATCTCGGTTACCAGgtg 23000
Y F L L E N V R N F A V Y R G G E V F R L V V R T L L D L G Y Q
23001 aggctgagaggggctgggactgagaggggcttgatgcgggttccgggtccacacggctgcgcttttgccttctcctcaactgcacgatgcccgcgtccgta 23100
23101 tgtacgcgtaccattttgtacaagctctaaagctcccttgccttctcctccttcttctcctccttcttctccttcttctccttctcctcctcctcct 23200
23201 cacacacacacagctacaacccctccatattgcatgtaacccccctacacacaacccccacaacccctcaacccctaaagccccacccccccctcctgtg 23300
23301 ccgcccctcctcgtaccttctctgcatgacggggccccctaggtgcttcttccccctcactctctcagtatctgctacccctgcagtttcgaccct 23400
23401 ggtatatcagcttcaaacgcctgtggttcgctctcttatccccctccttatctcctccaccaccaccctgatttaaatgcagGTGCGGTTGCGTATTCT 23500
V R F G I L
23501 CAACGCTGGCCACTTCGCGCTCCCTCAGTCCCGCAAGCGCACCTTCATCTGGGCTGCCCTCCCTGGAGAAGTCTACCCGAGTGGCCGACCAAGACAT 23600
N A G H F G V P Q S R K R T F I W A A L P G E V L P E W P T P R H
23601 GTCTTTGTGGGACACAGCTGGGAGTGAGGATGGGTGGCAATGCGGCCGCTGCTGCAGGGGCGAGCTGCGGCGGACGGAAGGGAGGCAAGGGCGCAGAG 23700
V F V A T Q L G V R M G G N A A A A A G G S C G G R K G G K G A D G
23701 GCGTGAAGAACGGCGGTAGAGGTGGAGGTGCAGGTGGAGGTGGAGGTGGGATATCGCAGGGGTTCTTTGGCGCCCCGGGGGTTCTTCTTTGCTTC 23800
V K N G G R G G G A G G G G G D I A G G S L A P P G G F F F A S
23801 GGGGACGCGCTGCCCGGAGCACCCCTGCGGACGGTACCGGTGCGGACGCGATCGGAGACCTGCCCAATCGACAACGACGCAAGACgtgagtgga 23900
G T P L P G A P L R T V T V R D A I G D L P P I D N D A K T
23901 ctgtagctcctccgtagctaaagaaatgctttccattgtgcagcgggggggggattgatgcccagcgggagaacagggaaaaggggtggttcgcttt 24000
24001 gggcccagatgagtgacgacttctatgagtcacgatgcgtgattcatacagatgatagcttcacgatgggtgggaaatccaaatctgtgacaag 24100
24101 gttgcaaaaaggtgatgactgctcgaacagtaactgcacagatatttagtaataacggcagtaatggcggcggcaccgtgtgtcacgaaagcattgccc 24200
24201 ctccaggaatggttgcgtgcgcttcttggagaggaggcagaacaaagattatttctactcgctccaacgatgcctcatggtgacagcagGGACGTGT 24300
D V L
24301 TGCCGTACACAGCGCTGCCAACGAGCGCCTTCCAGCGGCTATTCGCGGCTCGGCGGTTCTGAGCTCCGAGACCATGGTAAAGCAAATGAACGAGCT 24400
P Y T A V P T S A F Q R A I R G S A G S E L R D H M V K Q M N E L

28501 TCTTAGGTGGCCCATGCGGGGAAGGCCTCTCGAGATGCGTTTTGGCGCGTATTTATGCTTGGTCGTGCATGCCGTACTGTACGACGGTGACTAATCTTGT 28600
28601 GCAGGCTTGCAGGAGCGCGTTCATGGTACGCGAGGGTTAGGAGGGGGCATGCCAGCCGCGTCTCCGAATGTCATGTCACTGTACTGTCCGAATGTCAAGT 28700
28701 CACTGACATACAAGTTTCCAACATCGATATCTGATCACTTTAAGCTTTAACTGCTCATTCAccttctttgactataataaccatttctggttccagtg 28800
28801 accataaagcgctggcatgcctgggcccgtacgagctcaagaagcttgcaatcattgtcaaacgccccataaccgagacaacaaatcagatatatttagt 28900
28901 tgccgcccataaattggcccatcgaagacctggcggcctgtggtcctgtgttgagtagctgtgttcgactgttgctgtttcggagcgcttggttccaca 29000
29001 ggaagtcgtcggtaagtgagtgacctcactgaggtctgagctgtcccctgcacactgtgctttgaaaagtactattatcataacgcgtaatttaattgc 29100
29101 gtcacagctaatcactatcgaattaacacacagtcaaccagctatgagattgttgccactgataagggaaaatacattaacgctaaagaagctaaagttt 29200
29201 atcggctctttttagcaaggttggtggtttcccttgcccaagttcggcatgtcgttgtgtccggctagctgtaaacatgtaaatcgaggttagcatttgc 29300
29301 gtagttgaataaaaaacctgttattttcatctgtcaaggcaccttatcgatcgccgaggccagactacaaagtgtcctgttggtgtccagcggtgca 29400
29401 cagaggacggatcgcggaagttgaccaacacataactggcttccatcccttacagcccttccattctctcagctgccacacctaccagacaccaaagcag 29500
29501 cgctccattgctctccctaccggatctgcacggagccgacctcatcaaccccccttcccatacgacaccacacaccataatcgcgccaccatccccagc 29600
29601 ccatttcccaccatcacaagacgcgcacatacacctatccctatatataacgcgcacacacgatggcatctcatgcccagctaatccaagccga 29700
29701 aacccccaggcaacggtaccgcccgaatcgaccccaacagccaactgcaactcaacggccaacccaaccgaaacggtacaacatgtttgacctgctt 29800
29801 ggatcgccaaccgatgacctcaacacgacctcacggatattcccgcg 29849

A2. *Alignment* verschiedener *Jordan-2*-Sequenzvarianten. Die Sequenzen von zehn unabhängigen PCR-Klonen aus dem *bisulfite genomic sequencing* flossen in das *alignment* ein. U58741, in *Jordan-2*-Sequenz (*GenBank Accession No.* U58741); J_01 – J_03, verschiedene Sequenzvarianten, Häufigkeit jeder Variante in Klammern.

```

                *           20           *           40           *           60           *
U58741      : ACATGCCAGAGATCGAGGTTGAGGCCGGAGGGTGTAGCCCTTAGCTTGTAAACAGTCAACAAGGTGCTCCCAA : 73
J_01_ (5x)  : ACATGCCAGAGATCGAGGTTGAGGCCGGAGGGTGTAGCCCTTAGCTTGTAAACAGTCAACAAGGTGCTCCCAA : 73
J_02_ (4x)  : ACATGCCAGAGATCGAGGTTGAGGCCGGAGGGTGTAGCCCTTAGCTTGTAAACAGTCAACAAGGTGCTCCCAA : 73
J_03_ (1x)  : ANAGGAYAAAGYYAGAGCGACYAGYYAGYAGGYAGYAAAYAGGYAAGAAGGAGYYAAYAAAYGGYAYYYAAAYG : 73

```

```

                80           *           100           *           120           *           140
U58741      : TGTAAACCCAAACGTA-----GCAATCTGCACGAAATGAGCGGCCATAATCAACTAATCAATTAACTG : 135
J_01_ (5x)  : TGTAAACCCAAACGTA-----GCAATCTGCACGAAATGAGCGGCCATAATCAACTAATCAATTAACTG : 135
J_02_ (4x)  : TGTAAACCCAAACGTAYACGYACGYAGCAATCTGCACGAAATGAGCGGCCATAATCAACTAATCAATTAACTG : 146
J_03_ (1x)  : YAYAYGNY--ACGTA-----GCAATCTGCACGAAATGAGCGGCCATAATCAACTAATCAATTAACTG : 133

```

```

                *           160           *           180           *           200           *           22
U58741      : ATCCCTGATTCATAGAAGTGTGCAGAGTGTGTCAAGTGTTCACACAGACATACATGGAGTCATGCATCCACAAC : 208
J_01_ (5x)  : ATCCCTGATTCATAGAAGTGTGCAGAGTGTGTCAAGTGTTCACACAGACATACATGGAGTCATGCATCCACAAC : 208
J_02_ (4x)  : ATCCCTGATTCATAGAAGTGTGCAGAGTGTGTCAAGTGTTCACACAGACATACATGGAGTCATGCATCCACAAC : 219
J_03_ (1x)  : ATCCCTGATTCATAGAAGTGTGCAGAGTGTGTCAAGTGTTCACACAGACATACATGGAGTCATGCATCCACAAC : 206

```

```

                0           *           240           *           260           *           280           *
U58741      : TCTGTGGTATTCCGTGTACCTACCTCTCACACATGATGTTGTTGAACGCGCTCGCAGCATGATTCCCATTCT : 281
J_01_ (5x)  : TCTGTGGTATTCCGTGTACCTACCTCTCACACATGATGTTGTTGAACGCGCTCGCAGCATGATTCCCATTCT : 281
J_02_ (4x)  : TCTGTGGTATTCCGTGTACCTACCTCTCACACATGATGTTGTTGAACGCGCTCGCAGCATGATTCCCATTCT : 292
J_03_ (1x)  : TCTGTGGTATTCCGTGTACCTACCTCTCACACATGATGTTGTTGAACGCGCTCGCAGCATGATTCCCATTCT : 279

```

```

                300           *           320           *           340           *           360
U58741      : CCGAAAGCAAGGGTGGTATCCTCGGGGATGGTTCGAGAGGTCCACATCTGCAGCGCTCTTCGCAAAGGTGCTGC : 354
J_01_ (5x)  : CCGAAAGCAAGGGTGGTATCCTCGGGGATGGTTCGAGAGGTCCACATCTGCAGCGCTCTTCGCAAAGGTGCTGC : 354
J_02_ (4x)  : CCGAAAGCAAGGGTGGTATCCTCGGGGATGGTTCGAGAGGTCCACATCTGCAGCGCTCTTCGCAAAGGTGCTGC : 365
J_03_ (1x)  : CCGAAAGCAAGGGTGGTATCCTCGGGGATGGTTCGAGAGGTCCACATCTGCAGCGCTCTTCGCAAAGGTGCTGC : 352

```

```

                *           380           *           400           *           420           *           4
U58741      : ATGTGTACAGATGGAAACACGTCCAGGGACGAGTTAATGACAATTACAAGGCGGCAATACACTAAGAAAGCC : 427
J_01_ (5x)  : ATGTGTACAGATGGAAACACGTCCAGGGACGAGTTAATGACAATTACAAGGCGGCAATACACTAAGAAAGCC : 427
J_02_ (4x)  : ATGTGTACAGATGGAAACACGTCCAGGGACGAGTTAATGACAATTACAAGGCGGCAATACACTAAGAAAGCC : 438
J_03_ (1x)  : ATGTGTACAGATGGAAACACGTCCAGGGACGAGTTAATGACAATTACAAGGCGGCAATACACTAAGAAAGCC : 425

```

```

                40           *           460           *           480           *           500           *
U58741      : ACAGGCGTACCTTCGTGTAGAAGTGTGTTGATTTTCTAGTACTCTGTGGACAACTTTTCGAGGCGGACACAGAGC : 500
J_01_ (5x)  : ACAGGCGTACCTTCGTGTAGAAGTGTGTTGATTTTCTAGTACTCTGTGGACAACTTTTCGAGGCGGACACAGAGC : 499
J_02_ (4x)  : ACAGGCGTACCTTCGTGTAGAAGTGTGTTGATTTTCTAGTACTCTGTGGACAACTTTTCGAGGCGGACACAGAGC : 510
J_03_ (1x)  : ACAGGCGTACCTTCGTGTAGAAGTGTGTTGATTTTCTAGTACTCTGTGGACAACTTTTCGAGGCGGACACAGAGC : 497

```

```

                520
U58741      : AGCATGAAGT : 510
J_01_ (5x)  : AGCATGAAGT : 509
J_02_ (4x)  : AGCATGAAGT : 520
J_03_ (1x)  : AGCATGAAGT : 507

```

A3. *Alignment* verschiedener Osseer-Sequenzvarianten. Die Sequenzen von 20 unabhängigen PCR-Klonen aus dem *bisulfite genomic sequencing* flossen in das *alignment* ein. X69552, hinterlegte Osseer-Sequenz (*GenBank Accession No.* X69552); O_01 – O_17, verschiedene Sequenzvarianten, Häufigkeit jeder Variante in Klammern. CpG-Motive sind rot markiert.

		*	20	*	40	*	60	*		
X69552	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 72
O_01_ (4x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_02_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_03_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_04_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_05_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_06_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_07_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_08_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_09_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_10_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_11_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_12_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_13_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_14_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_15_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 73
O_16_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 56
O_17_ (1x)	:	CGAAG	GATATTAATAT	CGTACGT	CAGTTGAAAGAT	AAGTTGAAAT	TCCATCTT	GATGTGCG	TGACTTGGGTGA	: 56

		80	*	100	*	120	*	140	
X69552	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_01_ (4x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_02_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_03_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_04_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_05_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_06_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_07_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_08_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_09_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_10_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_11_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_12_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_13_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_14_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_15_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	145			
O_16_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	128			
O_17_ (1x)	:	GGCCCGTGTGTTTT	GGGTTTTGAGATTGAGCGTAATCGG	CCGAGCGTACCAATGAAGGTATCACAGAAGAG	:	128			

		*	160	*	180	*	200	*	220
X69552	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_01_ (4x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_02_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_03_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_04_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_05_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_06_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_07_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_08_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_09_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_10_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_11_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_12_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_13_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_14_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_15_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	218		
O_16_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	201		
O_17_ (1x)	:	GTA	CGCCAAGGGGCTAGTTGAGAAGTACGGGCTGGAAGATGCCAACCGGGCGTGTGTCCTTTGT	CGCA	CGGC	:	201		


```

40          *          460          *          480          *          500          *
X69552      : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCATCGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_01_(4x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCAACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_02_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_03_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCACGGGTATTGCAACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_04_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCACGGGTATTGCAACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_05_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_06_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_07_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_08_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCAACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_09_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCACGGGTATTGCAACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_10_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_11_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCACGGGTATTGCAACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_12_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_13_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_14_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 507
O_15_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCACGGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 510
O_16_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCGTAGATACGC : 493
O_17_(1x)   : TTTTCTCCGAAGTCGAGTAATCCATCTTTGCAYGGGTATTGCGACTCGGACTATGCAGCATGCATAGATACGC : 490
    
```

```

520          *          540          *
X69552      : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_01_(4x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_02_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_03_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_04_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_05_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_06_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_07_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_08_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_09_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_10_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_11_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_12_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_13_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_14_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 539
O_15_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 542
O_16_(1x)   : GTCGTTCAAC-----TACCGGCTACGTGTTTTTGAAT : 525
O_17_(1x)   : GTCGTTCAACAAYAGYYGYCGAYTACCGGCTACAATGTTTTTGAAT : 536
    
```

A4. Alignment der (unvollständigen) abgeleiteten Proteinsequenz des *V. carteri met1*-Gens mit verschiedenen Vertretern der Dnmt1/Met1-Klasse. Charakteristische Sequenzmotive sind gekennzeichnet. MI-MX, hochkonservierte Motive; KG, Lysin-Glycin-Wiederholung; V.ca, *V. carteri*; C.re, *C. reinhardtii* (J. Umen, pers. Mitteilung); L.es, *L. esculentum* (Genbank Accession No. CAA05207); D.ca, *D. carota* (AAC39355); Z.ma, *Z. mais* (AAC16389); A.th, *A. thaliana* AAA32829); H.sa, *H. sapiens* (NP_001370); M.mu, *M. musculus* (P13864). Sequenznummerierung über den Sequenzen und am rechten Rand. Hochkonservierte Positionen sind schwarz schattiert, schwächer konservierte grau.

		*	20	*	40	*	60	*	
Met1_V.ca	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
CMT2_C.re	:	VRAGVKQQLGSGQDDMVAPSKHTEATANVKGVKRAADKPADPAPNVAAEKADAPPAPAPAPAPAPAGPVK							70
Met1_L.es	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
Met1_D.ca	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
Met1_Z.ma	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
Met1_A.th	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
Dnmt1_H.sa	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
Dnmt1_M.mu	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-

		80	*	100	*	120	*	140	
Met1_V.ca	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
CMT2_C.re	:	KKQKVSEKAAASAATATTAVGDVDPDAAAEPGAAKASKPRKEKAASTDAGAAASGAAAGKAAGKETGKRLK							140
Met1_L.es	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
Met1_D.ca	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
Met1_Z.ma	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
Met1_A.th	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
Dnmt1_H.sa	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
Dnmt1_M.mu	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-

		*	160	*	180	*	200	*	
Met1_V.ca	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
CMT2_C.re	:	KEKTDNKKQAAKAMDEEAEGEGSDVQEEQEGSGADGAGAAGEAAGEVEVKVEGRASRKAQVKVSYKEAK							210
Met1_L.es	:	~MASPQPENSEVLELPPNNDKS-GHKKNKRKQDSVSKRKAS--ATGKKEKKQAVSETIE-EPTAGRKRPK							64
Met1_D.ca	:	~~~~~MGSSAVVDAPALDAGLETKKNKRNADCDSEKTA--VSGQKKQRAHALKSSE-TPVGSRKMPK							60
Met1_Z.ma	:	~~~~~MQSKATKEGREGIHRKQQAGEWISGYNRRGASWSRKSD-GHV-TRKRPR							46
Met1_A.th	:	~~~~~MVENGAKAAKRRKRPLPEIQEVEDVPRTRPR							32
Dnmt1_H.sa	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
Dnmt1_M.mu	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-

		220	*	240	*	260	*	280	
Met1_V.ca	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
CMT2_C.re	:	EVESDGNSDGDDDDVVDVVEETKVATEDEAL-KQTAGSGPGAGAGSATGGVMRSLVVEWDFTDSEGRPEPIE							279
Met1_L.es	:	RAAACDFKEKSVHLSKKSIVIETKKDHCVDDEEVAIRLTLTAGLQE-SQRPCRRLTDFVFNHSEGIQPPFG							133
Met1_D.ca	:	RAAACDFKEKSIQISKSSIIETKDRSVDEEEVAVRLTAG-QE-DGRPCRRLTDFIFHNSDGIQPAFE							128
Met1_Z.ma	:	RS AACDFKEKSI R L S E K K S V M V K K N R M E E E E V D A V N L T K L G P E - D P P P C R K L I D F I L H D A E G N P Q P F E							115
Met1_A.th	:	RAAACTSFKEKSI R V C E K S A T I E V K Q Q I V E E E F L A L R L T A L E T D V E D R P T R R L N D F V L F D S D G V P Q P L E							102
Dnmt1_H.sa	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	1
Dnmt1_M.mu	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	1

		*	300	*	320	*	340	*	
Met1_V.ca	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	-
CMT2_C.re	:	RLGKVEGG-----LYISAAAAGVIALGRRV R V C P V S S W R V A Y S P K A D P M V I V H T A A A Q Y V C G K P A A G A A							344
Met1_L.es	:	MSEVDDLFI SGLI L P L E D S L D K V K A G I R C E G F G R I E W A I S G Y E D G T P V I W I S T E T A D Y D C L K P S G - S Y							202
Met1_D.ca	:	MLEVDDL I S G L I L P L E D S S Q K - E A C S I K C E G F G R I E N W A L S G Y E E G V P T L W V S T D V A D Y D C V K P S A - S Y							196
Met1_Z.ma	:	MSEIDDF I T A L I M P M D D D L E K E R E R G V R C E G F G R I E D W N I S G Y E D G T P V I W V S T D V A D Y E C V K P S T - N Y							184
Met1_A.th	:	MLEIHDFVSGAILPSDVCCTDKEKEKGVRC T S F G R V E H W S I S G Y E D G S P V I W I S T E L A D Y D C R K P A A - S Y							171
Dnmt1_H.sa	:	PARTAPARVPTLAVPAISLPDDV R R L K D L E R D S L T E K E C V K - E K L N L L H E F L Q T E I K N Q L C D L E T K L R K							70
Dnmt1_M.mu	:	PARTAPARV P A L A S P A G S L P D H V R R L K D L E R D G L T E K E C V R - E K L N L L H E F L Q T E I K S Q L C D L E T K L H K							70

		360	*	380	*	400	*	420	
Met1_V.ca	:	RK L L E P L L A Q V E L A G A V H Q A L C T E T G G R L - D S T F E D V C C R V A R T - - K V S K Q - Y G G A R Y A L K L N G R F I L E Q							66
CMT2_C.re	:	R G F M A Q L E P Q L G L A D L V Y K S L T P A A G G R M - D T S F D E V C A K V A R T K A K M A R Q - Y G G A D M A L Q L H G D F I L E Q							412
Met1_L.es	:	K K F Y D H F L A K A T A C V E V Y K K L S K S S G G N P - D L S L D E L L A G V V R A M - T G I K C - F S G G - V S I R - - - D F V I T Q							265
Met1_D.ca	:	K K H Y E H L F A K A T A C V E V Y K K L S K S S G G N P - D L S L D E L L A G V V R G L - S G M K C - F S R S - V S I K - - - D F I I S Q							259
Met1_Z.ma	:	K S Y F D H F Y E K A Q V C V E V F K K L A K S V G G N P - N Q G L D E L L A S V V R S T - N A M K G - Y S G T - M S - K - - - D L V I S I							246
Met1_A.th	:	R K V Y D Y F Y E K A R A S V A V Y K K L S K S S G G D P - D I G L E E L L A A V V R S M S S G S K Y - F S S G - A A I I - - - D F V I S Q							235
Dnmt1_H.sa	:	E E L S E E G Y - L A K V K S L L N K D L S L E N G A H A Y R E V N G R L E N G N Q A R S E A R V G M A D A N S P P K P L S K P R T P R							139
Dnmt1_M.mu	:	E E L S E E G Y - L A K V K S L L N K D L S L E N G T H T L T Q K A N G C P A N G S R - - - P T W R A E M A D S N R S P R S R P K P R G P R							136

Met1_V.ca : LAAMA*TAGSHIVVGADNGGKDKQPADNSKAAAAAADKYSYDNG-----PFARGLRQALETEDHMPL : 129
 CMT2_C.re : LKA-----SGAISKDDKGGKGPAAAGSGAASNYDDG-----PFAQGLLSVMSSGE-LPE : 460
 Met1_L.es : -----CGFIYKELIIGLDDTSKKTDQL-----FVEL-----PVLASLRDESSKHETLAQ : 308
 Met1_D.ca : -----GDFIYNQLVGLDETSKKTDQQ-----FLEL-----PVLIALREESSKHGDPSTI : 302
 Met1_Z.ma : -----GEFVYNQLVGLDETSNNDDK-----FATL-----PVLLSLRDQCRRSVELTK : 289
 Met1_A.th : -----GDFIYNQLAGLDETAKKHES-----YVEI-----PVLVALREKSKIDKPLQ : 278
 Dnmt1_H.sa : RSKSDCEAKPEPSPSPRTTRKSTRQTTITSHFAKGPARKRKPQEESEERAKSDESIKEEDKQDQEKRRRVTS : 209
 Dnmt1_M.mu : RSKSDSDTLFETSPSSVARRTRTQTTITAHFTKGPTRKPKKEESEEGNSAESAAEE-RDQDKRRVVDT : 205

Met1_V.ca : SKDALAMIMRGGGGGGGGIRIATDGG---GGRDAETGGDGGGGGGGGTVDVDDYEMACRMAEEYA : 196
 CMT2_C.re : SFQTLAML---DGTGGGGGGIRIASDGGAAAAAAAEAG-AGSGGGSGAGADADADRAMALRQAEEYNA : 526
 Met1_L.es : PETISS-----GN-GLRI-----GPKAGGGDKIVESGLANGPAPEDELKLAKLHEEEYW : 359
 Met1_D.ca : GKVAST-----NG-TLTI-----GPKIKDGENK-----KDSATEEDEGVKVARLQEEEFW : 347
 Met1_Z.ma : LPSNFS-----NT-SL-----KIKDSE-----CDETAEDDDDAKLARLQEEEFW : 328
 Met1_A.th : RERNPS-----NGVRIKE-----VSQVAESE-ALTSQDLVDGT---DDRRYAAILQDEENR : 326
 Dnmt1_H.sa : RERVARPLPAEPPERAKSGTRTEKEEERDEKEEKR-LRSQTKPTPKQKLKEEPPDREARAGVQADEDEDG : 278
 Dnmt1_M.mu : ESGAAAV--EKLEEVTAGTQLGPPEPCEQEDDNRSLRRHTRRELSLRRKSKEDPDREARPETHDEDEDG : 273

Targeting zur Replikationsgabel →

Met1_V.ca : EHMNG-GSR*-----RGAGSKAAGGGCNSKEPYIQVREBEETADDYPEKEYKGEEDQ--DEWDELI : 255
 CMT2_C.re : AWENGEADQP-----RGRG-RGGGGGARTS--GYIQVREBEETADDYPVREYAADEEEGADCEDEVL : 585
 Met1_L.es : CSLK--Q-K-----KDRNT-----SSSSKIYIKINEDEETASDYPLPAYYKTSNE---ETDEYI : 407
 Met1_D.ca : NSMK--Q-K-----KGRGS-----STSSNKYIKINEDEETANDYPLPAYYKTANQ---ETDEYI : 395
 Met1_Z.ma : KMK--K-Q-----RGRG-----TPSQKNVIKISEAETANDYPLPAYYKPSQ---EMDEYI : 376
 Met1_A.th : KSMQ--QPR-----KNSS-----GSASNMFIKINEDEETANDYPLSYYKTSSE---ETDELI : 375
 Dnmt1_H.sa : -DEKDEKHKRSQPKDLAAKRRPEEKEPEKVNQISDEKDEDEKBEKRRKTTKE-----P---TEKKM : 337
 Dnmt1_M.mu : KDKRSRPRSQPRDPAARRRPEKVRARAGSSRDSERDEDERBEKRRKTRKKLESHTVPVQSRSERKA : 343

Met1_V.ca : LEDPELLGCGFHGADERDSSRTLDFEAIYNSDGLFTLLELVPMVAGLDANVNIIFASGVLAEDTCDWGP-- : 323
 CMT2_C.re : VGG-----GFGLHPDDMPE--QTLDRFAFYNAAGLMLCPMETVPLMKDLQLDGTGFASGVVADNCDWGTGG : 649
 Met1_L.es : VFDSGVETY--HIDELP--RSMLNHWALYNSDRLISLELLPMKACADIDVTIFGSGVMTADDGSG---- : 469
 Met1_D.ca : IFDGGADAC--YTDDL--RSMLNHWALYNSDRLISLELLPMKGCADIDVTIFGSGVMTEDDCTG---- : 457
 Met1_Z.ma : -FDS--DSI--FSDDVP--VRILNHWALYNSDRLISLELLPMKSGAENDVVFSGCFMRDDGSC---- : 436
 Met1_A.th : LYDASYE-V--QSEHLP--HRMLNHWALYNSDLRFISLELLPMKQCDDIDVNIIFGSGVVTDDNC-- : 436
 Dnmt1_H.sa : ARAKTYMNSKTHPPKCIQCGQYLDLDPDLKYGOHPDDAVDEPQMLTNEKL--SIFDANESGSFYEALPQH : 405
 Dnmt1_M.mu : AQSXSVI-PKINSPKCFCGQHLDDPNLKYQHPEDAVDEPQMLTSEKL--SLYDSTSTWFDYEDSPMH : 410

Met1_V.ca : AAPEAVDAEASGC-----GSGAGGSGSGGS-----ASC-GGQR-YFLTQIREWFVE-CGPEGOV : 375
 CMT2_C.re : AAGGEGSGAAAGAAAGGASGAGSGAGSGSGG-----GGAGGCLR-ITFTQVREWEVE-AGHD-HV : 711
 Met1_L.es : -----YNFDTDANHSSGSGRS-----AEID-GMP-TYLSAIKEWMI-EFGS-SMI : 511
 Met1_D.ca : -----FNLDGTSQSSAGLGT-----ANVD-GIP-TYLSAIKEWMI-EFGS-SMV : 499
 Met1_Z.ma : -----CS-TAESVKSSSSSKA-----DQLDAGIP-TYLSAIKEWMI-EFGS-SMI : 478
 Met1_A.th : -----ISLN-----DPDGSQS-----HDPD-GMC-TFLSQIKEWMI-EFGSDDIT : 474
 Dnmt1_H.sa : KLTCFSVYCKHGHLCPIDGLIEKNIELFFSGSAKPIYDDPSLEGGVNGKNGPINEWMITGFDGGEKA : 475
 Dnmt1_M.mu : RFTSFSVYCSRGHLCPVDTGLIEKNVLYFSGCAKAIHNDENPSMEGGINGKNLGPINQWVLSGFDGGEKV : 480

Met1_V.ca : VINIRTDVSWYRLLRPQKRYAPWFRVVRQAANVAVQTIKWLDEQDRAARLYFPDVIIRLSSLAPGHEAYI : 445
 CMT2_C.re : SIIIVITDYGKYRLLRPHESYTGHRVLERCFHWASKVVFWLEESDRASKVPFSEVWTRLAALPPADKAHV : 781
 Met1_L.es : FISIRTDMAWYRLGKPLKQYAPWYEPVIKTKARLAVSITLLKQNRVARLSFGEVIRKRVSEFKKDHPAYI : 581
 Met1_D.ca : FISIRTDMAWYRLGKPSKQYASWYEPVVKTKARVAISITLLKQARVSRLSFMDVIRKRVSEFEKGHPAYI : 569
 Met1_Z.ma : CITIRTDVWYKLRQPTKQYAPWCEPVLKTKARLAVSITLLKQSRASKLSFADVIRKVAEFDKGNPAFI : 548
 Met1_A.th : SISIRTDVWYRLGKPSKLYAPWVKPVLKTKARVGISITLFLRVESRVARLSFADVTRLSGLQANDKAYI : 544
 Dnmt1_H.sa : LIGFSTSAFAYILMDPSPEYAPIGLMQEKIYISKIVVEFLQNSDST---YEDLNKIETTVP--PSGL : 540
 Dnmt1_M.mu : LIGFSTSAFAYILMEPSPEYAPIGLMQEKIYISKIVVEFLQNNPDAV---YEDLNKIETTVP--PSTI : 545

← Targeting zur Replikationsgabel

Met1_V.ca : -----RAKVEAVERFVVHGVVNLIGRHYKDAIRCGFGKALRVKLGERRRRLKGPASAAGGARRG : 508
 CMT2_C.re : PTNRAFKGARAAVERFIVVHGVVLLTVLGL-IKKAISGCGFAKTLKEKLTERRRVL---AAAGGG-KG : 846
 Met1_L.es : SSN-----VDAVERYVVHGVVILQQFSEFPDVSIRNCAFAVGLSRKMEERHHTKWVI----- : 634
 Met1_D.ca : SSV-----PAAVERYVVHGVVILQQFLEFPDEKIKKSAFVIGLTKMMEERHHTKWLM----- : 622
 Met1_Z.ma : SSN-----ITLVERYIVVHGVVILQQFADFPDETIRSAFVSGLLKMEQRHHTKLVN----- : 601
 Met1_A.th : SSD-----PLAVERYIVVHGVVILQLFVAVPDDNVRKCPFVVGSLASKLEDHRHHTKWI--- : 597
 Dnmt1_H.sa : NLNRF-----TEDSLRHAQFVVSQVESY-DEAGDSDEQPIFLTPCMRD-----LIKLAGVTLG : 593
 Dnmt1_M.mu : NVNRF-----TEDSLRHAQFVVSQVESY-DEAKDDDETPIFLSPCMRA-----LIHLAGVSLG : 598

```

          920          *          940          *          960          *          980
Met1_V.ca : GRGATAAAGGAGSGMAAAKENPVKLRQVRKAKKPEPEPATSTAQVR----- : 554
CMT2_C.re : GKGKAAAA--AARALRSAVENPVRRARVKKSGGRPVAMPATTTVQVRVHTAPAAEVHAAAGDDGDVEMQEA : 914
Met1_L.es : -KKKKVMQRLEQNL-----NP-RASMAPSV-KRKAMQATTT--RLINRTWGEFYSNYSPEVSKQEVADC : 692
Met1_D.ca : -KKKKLQRDEPNL-----NP-RAALAPVSKRKAMQATTT--RLINRTWGEFYSNYSPEDMKEGITG : 681
Met1_Z.ma : -KKKTQVMRGE-NL-----NP-SAAMGPA-SRKKARATTT--RLINRTWSDYVAHHFPEDSKQEGDGN : 658
Met1_A.th : -KKKKISLK-ELNL-----NP-RAGMAPVASKRKAMQATTT--RLVNRTWGEFYSNYSPEPDLQATAA : 655
Dnmt1_H.sa : QRRARARRQTIHSTREKDRGPTK-----ATTT--KLVDYQIFDTFFAEQIEKDDRE----- : 642
Dnmt1_M.mu : QRRATRR--VMGATKEKDKAPT-----ATTT--KLVDYQIFDTFFSEQIEKYDKE----- : 644

```

```

          *          1000          *          1020          *          1040          *
Met1_V.ca : -----RIW-----SDYFTALDEIQ----- : 568
CMT2_C.re : AAAAGGAGGAGSGAGSGVAGGSAGGVVPNRTWQLQEPQPATTTAASSSSTVTRVLYGAAVCGDLCLKPGA : 984
Met1_L.es : EVKDDEEPDEQEENEED-DVPERNLDVPEKAHTP-----SSTRRHIKSRSDSKEINW----- : 743
Met1_D.ca : EDKEEEEEPEEQEIEEEE-EEKE-TLTALEKTPTP-----TSTPRKTKSIPKVKDIRW----- : 731
Met1_Z.ma : ETKEID-DEQEENEDE-DAEDEGQIENISKTP-----PSTRSKLLSQCKEIRW----- : 707
Met1_A.th : ENGEDEVVEEGNGEEEEVEEEGENGLTETDTPPEPVEVQKPHTPKKIRGSSGKREIKW----- : 712
Dnmt1_H.sa : -----DKENAFKRRRCGVCEVCQQPECGKCKACKDMVKFGGSGRSKQACQERRCPNMAKKE : 698
Dnmt1_M.mu : -----DKENAMKRRRCGVCEVCQQPECGKCKACKDMVKFGGTGRSKQACLKRRCPNLAVKE : 700

```

```

          1060          *          1080          *          1100          *          1120
Met1_V.ca : ---RKQQLKKEQELQQNGDQQQLQEEKEQKMDVDSIPAA--GAPAAPAPAPVHAAPVAAAESAAGVF : 631
CMT2_C.re : VIRVRKAGLLRRAAAQDKNAEEEESEDDADGEEEEFEAAEEEGASSEGESEWDEEEVKERIAADIQE : 1054
Met1_L.es : -----DCESIGKTASGEQLFKKARVHGHEIAVGDSDLVEH : 778
Met1_D.ca : -----NRKSVGETLSGEALVKQAIIVYGTETIAVCGAVLVD- : 765
Met1_Z.ma : -EGTSGKTLSETLVKCAVRELRIPIVGGTVALED : 742
Met1_A.th : -----DCESLTKTSAGEPLVQALVGGEMVAVCGAVTLEV : 747
Dnmt1_H.sa : ADDDEEVDDNIPEMPSPKMKHQGKKKKQKNKRISWVGAV-KTDGKKSYPKKVCIDAETLEVGDVSVVIP : 767
Dnmt1_M.mu : ADDDEEADDDVSEMPSPKKLHQGKKKKQKNKRISWVGAPM-KIEENRTYVQKVSIDEEMLEVGDVSVVIP : 769

```

```

          *          1140          *          1160          *          1180          *
Met1_V.ca : RLPKILSKSWVTERRTVDEAT-----GR-TMYG-AATCGDLKL---TPGSIIRL-----GIVP : 680
CMT2_C.re : EKEKEDKAKAIYTTKQGGKESSPRLQVRLLVHGRDTMLGEVASASELFLLDTPPRPPVDARSGGPGGAPP : 1124
Met1_L.es : DEPDELGCTYFYVEYMFELKLDGSKMLHGKMMQRGSDTVLIGNAANEREVFLIN----- : 829
Met1_D.ca : DESAQLPAIYYVEYMFETLNGIKMLHGRMLQQGSLTILGNTANECEVFLIN----- : 816
Met1_Z.ma : DSGDTV--ICFVVEYMFQKVDGSKMLVHGRILQKGSQTLIGNAANEREVFLIN----- : 791
Met1_A.th : DDPDEMPAIYFYVEYMFESTDHCKMLHGRFLQRGSMTVLIGNAANERELFLIN----- : 798
Dnmt1_H.sa : DDSSKPLYLARVTALWEDSSNGQMFVAHWFCAGTDTVLGATSDPLELFLVDECEDMQLSYIHSKVKVIYK : 837
Dnmt1_M.mu : DDSSKPLYLARVTALWEDKNGQMFVAHWFCAGTDTVLGATSDPLELFLVGEENMQLSYIHSKVKVIYK : 839

```

```

          1200          *          1220          *          1240          *          1260
Met1_V.ca : QLLAAAPGDVVVLPVINGRTVADVVEKFLSW-SAKHISRLSDSKSDLERVHQDAERVAAGRPPVFVYRSV : 749
CMT2_C.re : AWGPASAGELRELPLNGRGVAGLVEAASLSGRTGTATTRMENANADEARHRSDALRMSAGRPLFVYRSV : 1194
Met1_L.es : -----ECMNLQLGDVKESIAVNRMPWC---HCHR--NTNADKLETAKAEDRKRKGLPTBFFYCKSF : 886
Met1_D.ca : -----DCMDFELADVKKAV-VEIRSRPWC---HQRKVNANADKIYRAGVVEERKKNGLTEBFFYCKSL : 874
Met1_Z.ma : -----DCLEFKLDDIKELVMVDIQSRPWC---HKYRKENSEADKVEQVKAEBERKKKQPMVYFCKSL : 850
Met1_A.th : -----ECMTTQLKDKIKGVASFIRSRPWC---HQRKKNITADKLDWARALERKVKDLPTBFFYCKSL : 857
Dnmt1_H.sa : APSENWAME-----CGMDPESLLEG-DDGKTYFYQLWYDQDYAR---FESPPK : 881
Dnmt1_M.mu : APSENWAME-----CGTDPETTLPGAEDGKTYFQWLWYNQDYAR---FESPPK : 884

```

```

          *          1280          *          1300          *          1320          *
Met1_V.ca : YCPLOCMFRELRLRDLGLGSYVQ-EAPR---PAT---LELLPGGAGFIIKDGVTYQVGDFLHLRAAALD- : 810
CMT2_C.re : YCPGOCMFRALRHKDLALGSYVQVRAGR---PCASWPLAMLPNASGFTKSGVIYTVGCFMFVVSATAID- : 1259
Met1_L.es : YRPEKCAFFRPLPFDKMGLGNGLCYSC-LLQQTQDEKESFKFDMSSKSFVYLGTEYSVDDFVYVSPDHF- : 954
Met1_D.ca : YCPDKCAFLSLPLNSMGLGSGICSSCK-LDKDLTEKEKFFVHSDKTSFVFNTEYSIHDFLYVSPDQFS- : 942
Met1_Z.ma : YWPEKCAFFALSRDKMGLGSGLCSSCDNIEPDSDELKIF---SKTSFVYRKVTYNNVNEFLYIRP-FF- : 914
Met1_A.th : YSPERCGFFSLPLSDIGRSSGFCTSCK-IREDEEKRSITIKLVSKTGFFINGIEYSVEDFVYVNPDSIG- : 925
Dnmt1_H.sa : TQPTEDNKFKFCVSCARLAEMRQKEIPRVLEQLEDLDSRVLYYSAT---KNGILYRVGDGVYLPPEAFTF : 948
Dnmt1_M.mu : TQPTEDNKHKFCLSCRLAELRQKEMPKVLEQIEEVDGRVYCSSIT---KNGVCYRLGDSVYLPREAFTF : 951

```

```

          1340          *          1360          *          1380          *          1400
Met1_V.ca : EEEEEESDSEDKEQDT-----GSDSCSGTDDP-----NSDSEDND : 846
CMT2_C.re : AAITELGSSSKDSEQEEDGEMEVTAAPKPKVAKGREFAKAAKQPAAGKKSQRKAAAAAAAIAKDKSKDED : 1329
Met1_L.es : AERGGNGT-----FKAGRN-----VGLMAY----- : 974
Met1_D.ca : TERVGNET-----FKGGRN-----VGLKAY----- : 962
Met1_Z.ma : AEEDRAT-----FKAGRN-----VGLKPY----- : 934
Met1_A.th : GLKEGSKTS-----FKSGRN-----IGLRAY----- : 946
Dnmt1_H.sa : NIKLSSPVKRPKRPVDELYP-EHYRKYSYVIKGSNLDAPPEPYRIG----- : 994
Dnmt1_M.mu : NIKVASPVKRPKPKDPVKNPVPRTYRKYSYVIKGRNLDAPPEPYRIG----- : 998

```

```

      *      1420      *      1440      *      1460      *
Met1_V.ca : SDSEDNDEEE-----EXETKNA-----KQRQGMKTNRSNN---NGNTSTNQIA----- : 886
CMT2_C.re : EDEEEDDDEERDSVVEEDGEDASDAMVQLLEVVVPASGGGKASKGGKAGMSGKGPASGQPATVWVRRFFRP : 1399
Met1_L.es : -----GQQP-QQQQQQTGASGSGSGSPKAWPGTEQAEPAGDDDDDAVPSEVLKLEPTMDIFAGCGGSL : 1006
Met1_D.ca : -----AICQLLEIIVPKAPKQAEPH-----STEIKVRRFYRP : 994
Met1_Z.ma : -----AVCQLLEIPEGAGSKKLNPA-----SANTISARRFYRP : 966
Met1_A.th : -----VVCQLLEIV-PKESRKADLG-----SFDVKVRRFYRP : 977
Dnmt1_H.sa : -----RIKETFCPKKSN-----GRPNETDIKIRVWVKFYRP : 1024
Dnmt1_M.mu : -----RIKETHCGKK-K-----GKVN EADIKLRLYK FYRP : 1027

```

```

      1480      *      1500      *      1520      *      1540
Met1_V.ca : -----AA-----AAAGAA-----P-----PRRKRAATTHK-----GSN : 908
CMT2_C.re : EDI--SADLR--AADWWDLYAPLGAABEQLEVPVAEVHGKCAV-----VLG--QRPNKPTVHTLVVGSY : 1460
Met1_L.es : EDI--SSDKAVSSDIRELY-----YSEDIHTVPEVEIKGKCEVRKKYDISS--EDVPAMFDHIFCEYLY : 1067
Met1_D.ca : EDI--SDEKAVCSDIREVY-----YSEETHTDAETVEGRCEVRKKNDLPS--CDAPTIFDHFVCEYLY : 1055
Met1_Z.ma : DDI--SSAKAVASDIREVY-----YSEVDIVVVDMEVKGKCEVRKKNDLAS--SDLPVMFEHVFCELIY : 1027
Met1_A.th : EDV--SAEKAVASDIQELY-----FSQDVTVLPFGALGKCEVRKKSDDMPL--SREYPISDHIFCDLFF : 1038
Dnmt1_H.sa : ENTHKSTPASVHADINLY-----WSDEEAVVDFKAVQGRCTVEYGEDLPECVQVYSMGGPNRFYFLEAY : 1089
Dnmt1_M.mu : ENTHRSYNGSVHTDINMVC-----WSDEEAVVNFSDVQGRCTVEYREDLLESIQDYSQGGPDRFYFLEAY : 1092

```

```

      *      1560      *      1580      *      1600      *
      KG      MI
Met1_V.ca : N---GLRAFAVAMLWSVGEDGRGDGE-----EDVEAAVHEDG-----GEGIQDLDLDFIAGCGGSL : 961
CMT2_C.re : D---GQQP-QQQQQQTGASGSGSGSPKAWPGTEQAEPAGDDDDDAVPSEVLKLEPTMDIFAGCGGSL : 1525
Met1_L.es : DPLNGSLKKLFAQINLILSKIKLDDATS-RIRKKGK--GKEGVDEVGELNETSPQNRRLSTLDIFAGCGGSL : 1134
Met1_D.ca : DPAKGLKQLPNIKLRYSAVKGAHVSSLRKNKGGK--CKEGEDLDLSLK--SKVNCIATLDIFAGCGGSL : 1121
Met1_Z.ma : DRASGALKQLPNNVRF-MSMVQ--RTSALKKNGKQICEPDQIDSGKWLDVPKENRLATLDIFAGCGGSL : 1094
Met1_A.th : DTSKGLKQLPANMKPKFSTIKDD--TLLRKKGKGVSEIESEIIVKVPPEPKIIRLATLDIFAGCGGSL : 1106
Dnmt1_H.sa : NAKSKSFEDPP-----NHARSPGNKGGKGGKGGKPKPSQACEPSEPEIEIKLPKLRITLDVFSGCGGSL : 1152
Dnmt1_M.mu : NSKTKNFEDPP-----NHARSPGNKGGKGGKGGKGGKQVSEPEPEAAIKLPKLRITLDVFSGCGGSL : 1155

```

```

      M II
      *      1620      *      1640      *      1660      *      1680
Met1_V.ca : EGMHAGVARTWAIEYDSEAAEAYKLNNDPAKVFVNCNVLRLRAAMLKAGFEADCIADPTCVFAAAGID : 1031
CMT2_C.re : EGFHAGVAESRWAI EYDREAADAFKLNNDPTVFCDCNVLRLRAAMVKALEADCVSDPAAVEAARRLD : 1595
Met1_L.es : EGLQHSVTDINWAI EY EAPAGDAFRLNHPKIKVFIHNCNVILRAVMQKCCSDSDCI STPEASLAAAMD : 1204
Met1_D.ca : EGLQKSGVCTIKWAI EY EEAAGDAFKLNHPESL MFINNCNVILKAIMDKTCDADDCI STPEAAELAAKLS : 1191
Met1_Z.ma : EGLQQAGVSFTKWAIE Y EEPAGEA FNKNHPBAVVFVDCNVLKAIMDKCDDTDCVSTSEAAQAAKLP : 1164
Met1_A.th : HCLKKAGVSDAKWAI EY EEPAGQAFKQNHPESTVFDNCNVILRAIMEKGCDDDCVSTTEANLAAKLT : 1176
Dnmt1_H.sa : EGFHAGISDTLWAIEMWDPAAQAFRLNHPGTVFTEDCNILLKLVMM-----AGETT : 1204
Dnmt1_M.mu : EGFHAGISETLWAIEMWDPAAQAFRLNHPGTVFTEDCNVLLKLVMM-----AGEVT : 1207

```

```

      M IV      M VI
      *      1700      *      1720      *      1740      *
Met1_V.ca : AATLGDLPTEGSAVLMGPPCCQGYSGMNRFNKGLWSQVQNSVMVMAYLSYCDYFYP RPRYF LLENVRNFVAVY : 1101
CMT2_C.re : PQVVDLPPAGAVGLMMGGPPCCQGYSGMNRFNITGMWSQVQNSVMVMAYTSYCDYFYP RPRYF LLENVRNFVAVY : 1665
Met1_L.es : ESELNSLPLPGQVDFINGPPCCQGFSGMNRFNQSTWSKVQCEMILAFLSFADYYRPRYF LLENVRNFVAVY : 1274
Met1_D.ca : NKGQTFRLAIASLLDMGYQVRFGILEAGAYGVQSRKRAFIWAASPEETLPEWPEPMHVFAPPELKIAL- : 1330
Met1_Z.ma : NKGQTFRLAVASLLEMGYQVRFGILEAGAFVGAQSRKRAFIWAAPGEMLPDWPEPMHVFASPELKITL- : 1303
Met1_A.th : NKGQTFRLTLASLLEMGYQVRFGILEAGAYGVQSRKRAFIWAAPGEVLPWPEPMHVFVGPVKIKISL- : 1315
Dnmt1_H.sa : KRSMVLKLTLRCLVVRMGYQCTFGVLQAGQYVGAQTRRRRAIILAAAPGEKLPFPPEPLHVFAPRACQLSVV : 1344
Dnmt1_M.mu : RRSMV LKLT LRCLVVRMGYQCTFGVLQAGQYVGAQTRRRRAIILAAAPGEKLPFPPEPLHVFAPRACQLSVV : 1347

```

```

      M VII      M VIII
      1760      *      1780      *      1800      *      1820
Met1_V.ca : RGGEVFRLVVRTLLDLGYQVRFGIINAGHFVGVQSRKRFTIWAALPGEVLPWPTPRHVFVATQLVVRMG : 1171
CMT2_C.re : NDGRVFRLV-----VRFVGLNAGCFVGSQSRKRFTIWAALPGEVLPWPAALHRFKQEQLGVRM- : 1724
Met1_L.es : NQKQTFRLTVASLLEMGYQVRFGILEAGAYGVQSRKRAFIWAGSPEEVLPWPEPMHVFAPPELKIAL- : 1343
Met1_D.ca : NKGQTFRLAIASLLDMGYQVRFGILEAGAYGVQSRKRAFIWAASPEETLPEWPEPMHVFAPPELKIAL- : 1330
Met1_Z.ma : NKGQTFRLAVASLLEMGYQVRFGILEAGAFVGAQSRKRAFIWAAPGEMLPDWPEPMHVFASPELKITL- : 1303
Met1_A.th : NKGQTFRLTLASLLEMGYQVRFGILEAGAYGVQSRKRAFIWAAPGEVLPWPEPMHVFVGPVKIKISL- : 1315
Dnmt1_H.sa : KRSMVLKLTLRCLVVRMGYQCTFGVLQAGQYVGAQTRRRRAIILAAAPGEKLPFPPEPLHVFAPRACQLSVV : 1344
Dnmt1_M.mu : RRSMV LKLT LRCLVVRMGYQCTFGVLQAGQYVGAQTRRRRAIILAAAPGEKLPFPPEPLHVFAPRACQLSVV : 1347

```

```

      *      1840      *      1860      *      1880      *
Met1_V.ca : GNAAAAAGSGCGRKGKGGADGVKNGGRGGGAGGGGDIAGGSLAPPGFFFAASGPLPGAPLRITVTVR : 1241
CMT2_C.re : -----RGVGGD-----GQFFHASGPPAAGAPLRITVTVR : 1752
Met1_L.es : -----SETSYAAAVRSTASGAPFRSLTVR : 1367
Met1_D.ca : -----PENKYAAAVRSTQTGAPFRSITVR : 1354
Met1_Z.ma : -----PDGQYAAAVRSTAGGAPFRAITVR : 1327
Met1_A.th : -----SQGLHYAAAVRSTALGAPFRPITVR : 1339
Dnmt1_H.sa : VDDKK-----FVSNIRLSSGPFRTITVR : 1368
Dnmt1_M.mu : VDDKK-----FVSNIRLSSGPFRTITVR : 1371

```

```

          1900          *          1920          *          1940          *          1960
Met1_V.ca : DAIGDLPPIDNDAKTDVLPYTAVPISAFQRAIRGSAGS-----ELRDHMVKQMNELNLERCRCI PRGV : 1304
CMT2_C.re : DVI GDLPPVENGSTITDPLPYTGQPVSAFQRAIRGRAAAGGGGGNGEVRDHVVKAMNENLNERCRCI PKGD : 1822
Met1_L.es : DTIGDLPPVVGNGASKTCEYQGD PVSWFQKKIRGSSIT-----LSDHISKEMNELNLI RCQRI PKR- : 1428
Met1_D.ca : DTIGDLPMVSN GASRTSEYQMDPISWFOKKTIRANMMV-----LTDHISKEMNELNLI RCQRI PKR- : 1415
Met1_Z.ma : DTIGDLPKVGN GASKLTLEYGGE PVSWFQKKIRGSMV-----LNDHISKEMNELNLI RCQRI PKR- : 1388
Met1_A.th : DTIGDLPSVENGD SRTNKBYKEVAVSWFOKETIRGNTIA-----LTDHISKAMNELNLI RCCLI PTR- : 1400
Dnmt1_H.sa : DTMSDLPEVRNGASALEISYNGE P QSWFQRC LRGA-----QYQPI LRDHIC KDMSE LVAARMRHI PL-A : 1431
Dnmt1_M.mu : DTMSDLPEIQNGASNSEIPYNGE PLSWFQRC LRGS-----HYQPI LRDHIC KDMSE LVAARMPHI PL-F : 1434
    
```

```

          *          1980          *          2000          *          2020          *
Met1_V.ca : PGADWRVL-----LKIVAED PSREFFK-----E--SLVPPFCLP : 1336
CMT2_C.re : PGADWRVL-----LKLVAEDRSREFFN-----Q--ALVPWCCLP : 1854
Met1_L.es : PGADWRDL-----EDEKVKLSNG-----QLVDLIPWCCLP : 1457
Met1_D.ca : RGADWQDL-----PDEKVKLSSG-----QLVDLIPWCCLP : 1444
Met1_Z.ma : PGCDWHDL-----PDEKVKLSNG-----QMDLIPWCCLP : 1417
Met1_A.th : PGADWHDL-----PKRNVTLSDC-----RVEEMIPFCLP : 1429
Dnmt1_H.sa : PGSDWRDLPNIEVRLSDGTMARKLRYTHHDKRNGRSSGALRGVCSCEAGKACDPAARQFN TLIPWCCLP : 1501
Dnmt1_M.mu : PGSDWRDLPNIQVRLGDGVIADKLYTFHDKVNGYSSGTALRGVCSCAE-GKACDPESRQFSTLIPWCCLP : 1503
    
```

MIX

```

          2040          *          2060          *          2080          *          2100
Met1_V.ca : NTADRHNQWRGLYGRLDPYGHFPTATTEPNPMGKVGQVEHPDQDRIVSVRECAR SQGFDPHFREYGNVIC : 1406
CMT2_C.re : NSADRHNQWRGLYSRLDPDGHFPTATTDPNPMGKVGQVEHPDQDRIVSVRECAR SQGFDPHFREYGNVVC : 1924
Met1_L.es : NTAKRHNQWKGLFGRLDWEGNFPT SITDPPMGKVGMC EHPDQDRIVTVRECAR SQGFDPDSYQFAGNILH : 1527
Met1_D.ca : NTAKRHNQWKGLFGRLDWEGSFPT SITDPPMGKVGMC EHPDQDRIVTVRECAR SQGFDPDSYQFAGNILH : 1514
Met1_Z.ma : NTAKRHNQWKGLYGRLDWEGNFPT SVTDPPMGKVGMC EHPDQDRITVRECAR SQGFDPDSYEFAGNIQN : 1487
Met1_A.th : NTAERHNQWKGLYGRLDWQGNFPT SVTDPPMGKVGMC EHPDQDRILTVRECAR SQGFDPDSYEFAGNINH : 1499
Dnmt1_H.sa : HTGNRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQGRVLHPEQHRVVSVRECAR SQGFDPDYRLFGNILD : 1571
Dnmt1_M.mu : HTGNRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQGRVLHPEQHRVVSVRECAR SQGFDPDYRLFGNILD : 1573
    
```

M X

```

          *          2120          *          2140          *          2160
Met1_V.ca : RHRQVGNVPPPLARALGQQLRLALKEGRARDTKEAAEKIQS-MRARRQQQPQQQPQQQHKKH : 1468
CMT2_C.re : RHRQVGNVPPPLARALGQKLWEALKERRDRDREAAEDELKARVRANRQQK LAKKZ~~~~~ : 1981
Met1_L.es : KHRQIGNAVPPPLAYALGRKLEAVESKNRLT~~~~~ : 1559
Met1_D.ca : KHQQIGNAVPPPLAYALGMKLEALESK GCM~~~~~ : 1545
Met1_Z.ma : KHRQIGNAVPPPLAYALGRKLEAVDKRQEASAGVPAP~~~~~ : 1525
Met1_A.th : KHRQIGNAVPPPLAFALGRKLEALHLKKS PQHQP~~~~~ : 1534
Dnmt1_H.sa : KHRQVGNVPPPLAKAIGLEIKLCMLAKARESASA--KIKEEEAAKD~~~~~ : 1616
Dnmt1_M.mu : RHRQVGNVPPPLAKAIGLEIKLCLLSSARESASAAVKAKEEAA TKD~~~~~ : 1620
    
```

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn **Prof. Dr. Rüdiger Schmitt** für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit. Sein persönliches Engagement, seine zahlreichen Tipps und Anregungen und die ständige Diskussionsbereitschaft waren mir eine wertvolle Hilfe.

Dr. Iris Kobl danke ich für die Überlassung der Hill-Transformanten, des Plasmids pIK2 sowie der *C-ars*-Klone sowie zahlreicher Tipps und Informationen dazu. Danke auch für die nette gemeinsame Zeit im Labor. **John Davies** überließ uns die Plasmide pJD27 und pJD54, **Thomas Jakobiak** das Selektionsplasmid pHSR250aphVIII sowie den HSR-Promotor und **Jim Umen** die vorläufige Sequenz der *Chlamydomonas*-Methyltransferase Cmt2. **PD Dr. Armin Hallmann** half mit einigen *Volvox*-Stämmen aus.

Für die praktische Unterstützung in der Endphase dieser Arbeit, sowie die Zubereitung der *Volvox*-Medien und das nette Arbeitsklima danke ich unserer technischen Assistentin **Manuela Neumann** sowie ihren Vorgängerinnen **Ursula Zeiser** und **Katrin Haller**. Nicht vergessen darf ich auch die Praktikanten, die alle ihren kleinen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: **Inese Cakstina, Thomas Göttler, Markus Haindl, Diana Hammer, Rebekka Köppl, Gabriele Kunz**.

Danke auch meinen aktuellen und ehemaligen „*Volvox*-Kollegen“ **Inese Cakstina, Thomas Jakobiak, Rebekka Köppl, Monika Lichtinger, Petra Pickl, Dr. Klaus Stark** und **Birgit Wimmer** für die gute Zusammenarbeit und besonders die nötige Abwechslung im Labor. Anregend war auch der Erfahrungs- und Gedankenaustausch mit dem *Chlamydomonas*-Labor unter Leitung von **Dr. Wolfgang Mages**, der in zahlreichen Diskussionen Anregungen für diese Arbeit gab.

Allen Lehrstuhlmitgliedern, die bisher namentlich nicht genannt wurden, sowie unserer Sekretärin **Sabine Schneider** sei hier ebenfalls für das gute Arbeitsklima und ihre Anregungen gedankt. **Frank Pfannenschmid** möchte ich für die rasche Abwicklung der Sequenzieraufträge danken.

Zuletzt aber möchte ich vor allem **meinen Eltern** und **Karin** danken, deren Unterstützung und Verständnis wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg in der Zeit von Mai 1999 bis April 2003 unter der Betreuung von Prof. Dr. Rüdiger Schmitt angefertigt.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

.....
Patrick Babinger