

**Elemente der Expressionskontrolle von *regA*,  
eines Schlüsselgens der Differenzierung  
von *Volvox carteri***

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

vorgelegt von  
**KARIN BABINGER**  
aus Regensburg  
Februar 2005

Promotionsgesuch eingereicht am: 09.02.2005

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

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

Erstgutachter: Prof. Dr. Rüdiger Schmitt

Zweitgutachter: Prof. Dr. Herbert Tschochner

Dritter Prüfer: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Organismen und Plasmide.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Verwendete Oligonukleotide .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3 Herkunft von Chemikalien und Enzymen .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 Medien .....</b>	<b>19</b>
<b>2.5 Puffer und Lösungen.....</b>	<b>20</b>
<b>3. METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Kultivierung der Organismen .....</b>	<b>25</b>
3.1.1 <i>Escherichia coli</i> -Kulturen .....	25
3.1.2 Algen-Kulturen.....	25
3.1.3 Kultivierung des Phagen $\lambda$ .....	26
3.1.3.1 Anzucht der Wirtsbakterien .....	26
3.1.3.2 Phagenplattierung für Titerbestimmung und <i>screening</i> einer Genbibliothek .....	26
3.1.3.3 Herstellung von Plattenlysaten.....	26
3.1.4 <i>High Five</i> <sup>TM</sup> – Insektenzellen.....	27
3.1.4.1 Initiation .....	27
3.1.4.2 Kulturhaltung .....	27
3.1.4.3 Aufbewahrung.....	27
3.1.5 Baculovirus-Amplifikation.....	28
<b>3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren .....</b>	<b>29</b>
3.2.1 Isolierung, Reinigung und Auftrennung von DNA .....	29
3.2.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> durch Alkalische Lyse.....	29
3.2.1.2 Isolierung von reiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	30
3.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab.....	30
3.2.1.4 DNA-Extraktion.....	30
3.2.1.5 DNA-Fällung.....	30
3.2.1.6 Isolierung von DNA aus <i>V. carteri</i> .....	31

3.2.1.7	Isolierung von DNA aus <i>V. carteri</i> im kleinen Maßstab .....	31
3.2.1.8	Isolierung von RNA aus <i>V. carteri</i> .....	32
3.2.1.9	Isolierung von mRNA aus <i>V. carteri</i> .....	32
3.2.1.10	Isolierung von DNA aus dem Phagen $\lambda$ .....	33
3.2.1.11	Isolierung des Plasmids pBK-CMV aus $\lambda$ ZAP Express .....	33
3.2.1.12	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA .....	33
3.2.1.13	Agarose-Gelelektrophorese von DNA .....	33
3.2.1.14	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA .....	34
3.2.1.15	Agarose-Gelelektrophorese von RNA .....	34
3.2.1.16	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	35
3.2.2	Modifizierung von DNA .....	35
3.2.2.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	35
3.2.2.2	Dephosphorylierung von DNA .....	35
3.2.2.3	Ligieren von DNA.....	35
3.2.2.4	PCR-Amplifizierung von DNA und RNA .....	36
3.2.2.5	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten .....	36
3.2.3	Sequenzanalyse und Sequenzbearbeitung.....	37
3.2.4	Transformation von <i>E. coli</i> .....	37
3.2.5	Transformation von <i>Volvox carteri</i> .....	38
3.2.6	Transfektion von <i>High Five</i> <sup>TM</sup> -Insektenzellen.....	39
3.2.6.1	Herstellung rekombinanter Baculoviren .....	39
3.2.6.2	Catechol-Test .....	40
3.2.7	Hybridisierung und Detektion von Nukleinsäuren.....	41
3.2.7.1	Übertragung von DNA aus Agarosegelen auf Nylon-Filter ( <i>Southern blot</i> ) .....	41
3.2.7.2	Direktes Aufbringen von DNA auf Nylon-Filter ( <i>Dot blot</i> ) .....	42
3.2.7.3	Übertragung von RNA aus Agarosegelen auf Nylon-Filter ( <i>Northern blot</i> ) .....	42
3.2.7.4	<i>Screening</i> von $\lambda$ -Genbanken .....	42
3.2.7.5	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	43
3.2.7.6	Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen der Membranen .....	43
3.2.7.7	Nichtradioaktive Detektion von Nukleinsäuren.....	43
3.2.8	Autoradiographie.....	43
3.2.8.1	Autoradiographie mittels Röntgenfilm .....	43
3.2.8.2	Autoradiographie mittels <i>PhosphorImager</i> .....	44

<b>3.3 Arbeiten mit Proteinen .....</b>	<b>44</b>
3.3.1 Expression und Isolierung von rekombinanten Proteinen aus <i>E. coli</i> mittels dem <i>IMPACT-CN</i> -Systems .....	44
3.3.1.1 Transformation und Expression .....	44
3.3.1.2 Zellaufschluß und Reinigung von rekombinanten Protein nach der Intein-Methode .....	45
3.3.2 Expression und Isolierung von rekombinanten Proteinen aus <i>High Five</i> <sup>TM</sup> Insektenzellen.....	46
3.3.2.1 Infektion der Insektenzellen.....	46
3.3.2.2 Denaturierende Gewinnung des Gesamtproteins .....	46
3.3.2.3 Gewinnung des Gesamtproteins unter nativen Bedingungen .....	46
3.3.2.4 Reinigung unter nativen Bedingungen mittels Affinitätssäule .....	47
3.3.2.4.1 Packen der Säule.....	47
3.3.2.4.2 Affinitäts-Reinigung.....	47
3.3.3 Affinitätsreinigung von Antikörper.....	47
3.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	48
3.3.4.1 Proteingehaltbestimmung mit <i>Bio-Rad Protein Assay</i> (Hercules, CA, USA) .....	48
3.3.4.2 Proteingehaltbestimmung mit <i>Bio-Rad DC Protein Assay</i> (Hercules, CA, USA) .....	48
3.3.5 Proteinfällung mit Aceton .....	49
3.3.6 Proteinkonzentrierung mit <i>Centricon</i> .....	49
3.3.7 Proteinanalysen .....	49
3.3.7.1 SDS-Polyacrylgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
3.3.7.2 Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen mit Polyacrylamid-Gelen.....	50
3.3.7.3 Nachweis von Proteinen mittels Coomassie-Färbung.....	50
3.3.7.4 Nachweis von Proteinen mittels Silberfärbung.....	50
3.3.7.5 <i>Western</i> -Analyse.....	50
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Charakterisierung des <i>tbp</i>-Gens von <i>V. carteri</i>.....</b>	<b>53</b>
4.1.1 Gewinnung der Sonde VcTBP .....	55
4.1.2 <i>Screening</i> einer genomischen und einer cDNA-Genbibliothek .....	56
4.1.3 Kopienzahl des <i>tbp</i> -Gens im <i>Volvox</i> -Genom .....	58
4.1.4 Vergleich der TBP-Sequenzen von <i>V. carteri</i> und <i>C. reinhardtii</i> .....	60
4.1.5 Rekombinante Expression von <i>tbp</i> im <i>IMPACT-CN</i> -System .....	61

---

<b>4.2 Rekombinante Expression von RegA zur Herstellung von Anti-RegA-Antisera</b> .....	<b>63</b>
4.2.1 Rekombinante Expression von RegA .....	63
4.2.1.1 Expression mit dem <i>IMPACT-CN</i> -System.....	64
4.2.1.1.1 Expression von <i>regA/1</i> .....	65
4.2.1.1.2 Expression von <i>regA/2</i> .....	67
4.2.1.1.3 Expression von <i>regA/3</i> .....	68
4.2.1.2 Expression von RegA mit dem Baculovirus-Insektenzell-System .....	68
4.2.2 Herstellung von Anti-RegA-Antikörpern.....	70
4.2.2.1 Herstellung und Reinigung des Anti-RegA/1-Antikörpers.....	70
4.2.2.2 Herstellung und Reinigung des Anti-RegA-Antikörpers .....	73
<b>4.3 Untersuchung der 5'NTR auf Kontrollelemente der <i>regA</i>-Genexpression</b> .....	<b>75</b>
4.3.1 Ein empfindlicher Komplementationstest.....	78
4.3.2 Analyse von zwei Deletionen in der 5'NTR von <i>regA</i> .....	79
4.3.3 Bedeutung der ATG-Triplets in der 5'NTR.....	80
4.3.4 Mutationen im ATG9-Leseraster .....	83
4.3.5 Ein Stopp-Codon im ATG10-Leseraster.....	85
4.3.6 Untersuchung des ORF2 .....	86
4.3.6.1 Vergleich mit <i>V. carteri</i> f. <i>kawasakensis</i> .....	87
4.3.6.2 Vergleich mit verschiedenen <i>V. carteri</i> -Spezies.....	89
4.3.6.3 Einführung zweier Stopp-Codons hinter ATG2 .....	91
4.3.6.4 Transkription von <i>orf2</i> .....	94
4.3.6.5 Produziert <i>orf2</i> ein eigenes Protein? .....	97
<b>5. DISKUSSION</b> .....	<b>99</b>
<b>5.1 Das <i>tbp</i>-Gen von <i>V. carteri</i></b> .....	<b>99</b>
<b>5.2 Rekombinante Expression von RegA und Herstellung von Anti-RegA-Antisera</b> .....	<b>103</b>
<b>5.3 Die 5' nicht-translatierte Region von <i>regA</i> und ihre Bedeutung für die <i>regA</i>-Translation</b> .....	<b>106</b>
<b>5.4 Ausblick</b> .....	<b>112</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>113</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>116</b>

---

<b>8.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>123</b>
<b>8.1</b>	<b><i>tbp</i>-Sequenzen .....</b>	<b>123</b>
8.1.1	Genomische <i>tbp</i> -Sequenz .....	123
8.1.2	cDNA-Sequenz von <i>tbp</i> .....	124
8.1.3	<i>Multiple alignment</i> von TBP-Proteinsequenzen verschiedener Spezies.....	126
<b>8.2</b>	<b>Verteilung der überdurchschnittlich häufig repräsentierten Codons im <i>regA</i>-Gen .....</b>	<b>128</b>
<b>8.3</b>	<b><i>orf2</i>-Gen.....</b>	<b>130</b>
8.3.1	Auswertung der <i>Dotblot</i> -Analyse mittels <i>Optiquant</i> .....	130
8.3.2	<i>orf2</i> -cDNA-Sequenz.....	130
8.3.3	Auswertung der <i>Nothern</i> -Analyse mittels <i>Optiquant</i> .....	131

## Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetat
Ak	Antikörper
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ETZ	Eppendorf-Tischzentrifuge
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
nt	Nukleotid(e)
NTR	Nicht-translatierte Region
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm Wellenlänge
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pfu	<i>plaque forming unit</i>
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit(s)</i> (Aktivitätseinheit bei Enzymen)
ÜK	Übernachtskultur
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro min
ÜS	Überstand
UZ	Ultrazentrifuge
v/v	<i>volume per volume</i>
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
w/w	<i>weight per weight</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## 1. Einleitung

Die Regulation der Zelldifferenzierung ist in den Biowissenschaften eines der aktuellsten Themen. Durch rapide Fortschritte in der Gentechnik konnte bereits eine Reihe grundlegender Prinzipien der Genregulation und Differenzierung bei Eukaryonten aufgeklärt werden. Wichtige Modellorganismen für die Studien sind *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* und *Arabidopsis thaliana*. Die hier eingesetzte Kugelalge *Volvox carteri* (Abb. 1) hat den großen Vorteil, das einfachste Modell mit nur zwei Zelltypen – somatischen und reproduktiven Zellen – zu sein, ein Umstand, der viele „überflüssige“ Details der Zelldifferenzierung auf ihre Grundprinzipien reduziert.

*Volvox* wurde vor ca. 300 Jahren von Antony van Leeuwenhoek entdeckt (Dobell, 1932). Zweihundert Jahre später diente die Alge August Weismann als Kronzeugin für seine Keimbahn-Theorie (1889). Durch die bahnbrechenden Forschungen von Richard Starr (1968) wurde *V. carteri* zum bevorzugten Untersuchungsobjekt von Entwicklungsgenetikern (Huskey, 1979; Huskey & Griffin, 1979; Huskey et al., 1979; Kirk, 1988; Kirk, 1990; Kirk, 1994; Kirk, 1998; Kirk, 2001; Kirk & Nishii, 2001; Schmitt et al., 1992).

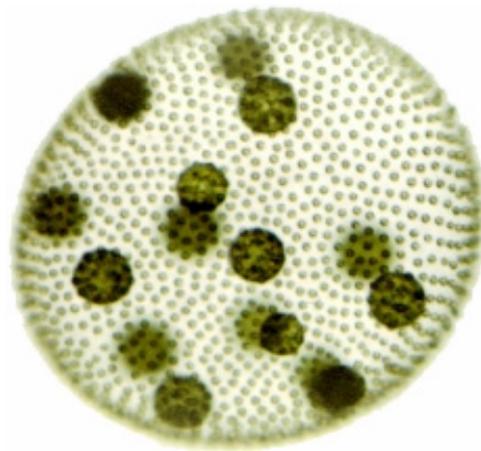


Abb. 1. **Adultes Sphäroid von *V. carteri* f. *nagariensis* mit 16 Gonidien (innen) und ca. 2000 *chlamydomonas*-artigen somatischen Zellen an der Oberfläche der Kugel** (aus Stark, 1996).

Die grüne Kugelalge steht mit 16 Gonidien und ca. 2000 Somazellen am Ende der Entwicklungsreihe der *Volvocida*, die vom Einzeller *Chlamydomonas* über die kolonialen *Gonium*, *Pandorina*, *Eudorina* und *Pleodorina* bis zum differenzierten Vielzeller *Volvox* reicht. Der vermutliche gemeinsame Vorläufer dieser Linie war ein *chlamydomonas*-ähnlicher Einzeller. Aus dieser rezenten Entwicklungsreihe resultiert die einmalige Situation, daß auch die Evolution der molekularen Grundlagen der Differenzierung der gentechnischen Analyse zugänglich wird (Kirk, 1998). Der Einzeller *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt zwei Flagellen und einen Augenfleck und kann im Gegensatz zum obligat photoautotrophen *V. carteri* heterotroph auf Acetat wachsen. Jede dieser Zellen durchläuft in ihrem Lebenszyklus eine vegetative und eine reproduktive Phase. Beginnend mit diesem Einzeller beobachtet man über *Gonium*, *Pandorina*, *Eudorina* und *Pleodorina* eine zunehmende morphologische Komplexität und Assoziation von *chlamydomonas*-artigen Zellen zu immer größeren Kolonien; aber erst *Volvox* vollzieht die vollständige Differenzierung in zwei funktionell unterschiedliche Zelltypen mit vollständiger Aufteilung der vegetativen und reproduktiven Funktionen (Schmitt et al., 1998).

Der vegetative Lebenszyklus (Abb. 2) von *V. carteri* dauert im 16:8 h Licht-Dunkel-Zyklus bei 29 °C zwei Tage. Er beginnt mit je fünf symmetrischen Teilungen der 16 Gonidien, gefolgt von einer asymmetrischen Teilung der 16 anterioren Zellen des Embryos. Die 16 größeren Zelläquivalente teilen sich noch weitere zwei- bis dreimal asymmetrisch. Die kleineren Zellteilungsprodukte werden, wie die 48 posterioren Zellen zu Somavorläuferzellen,

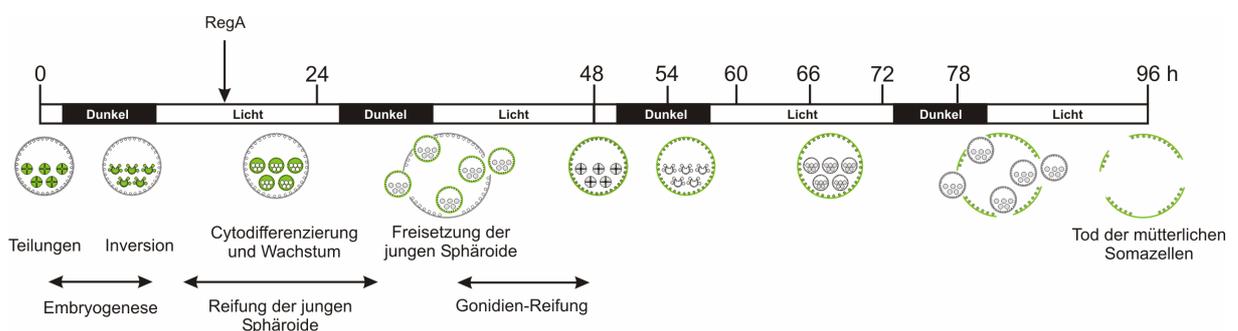


Abb. 2. **Lineare Darstellung von zwei sukzessiven vegetativen Lebenszyklen von *V. carteri* unter Laborbedingungen mit einem 16:8 h Licht-Dunkel-Zyklus.** Ausgehend von einzelnen Gonidien ist der Entwicklungsweg bis hin zum Absterben der Somazellen grün gekennzeichnet. Durch einen Pfeil ist der Zeitpunkt des Auftretens von RegA markiert. Details im Text (verändert nach Stark & Schmitt, 2002).

die sich bis zur Reifung elf- bis zwölfmal teilen. Die 16 großen Zellen sind Gonidienvorläufer für die nächste Generation. Sie gelangen nach der gastrulations-ähnlichen Inversion ins Innere der Kugel (Nishii & Ogihara, 1999; Nishii et al., 2003), wo sie im weiteren Verlauf des Zyklus heranreifen. Währenddessen nimmt die Größe des Sphäroids durch Einlagerung von extrazellulärer Glykoprotein-Matrix zwischen den Somazellen stark zu (Hallmann & Kirk, 2000; Sumper & Hallmann, 1998). Die fertigen Sphäroide werden durch partielle Proteolyse der Matrix aus der Mutterkugel freigesetzt. Die Somazellen in der Zellohülle sterben danach allmählich ab (Green & Kirk, 1981; Kirk, 1997; Kirk, 1998; Kirk et al., 1986; Lichtinger, 2000; Pommerville & Kochert, 1982; Pommerville & Kochert, 1981; Viamontes & Kirk, 1977). Ursache dafür ist primär die Abschaltung der Photosynthese in diesen Zellen (Choi et al., 1996; M. Lichtinger, pers. Mitteilung; Meissner et al., 1999).

Von R. Starr wurden 1970 erstmals morphologische *Volvox*-Mutanten beschrieben, die zur Charakterisierung des Differenzierungsgens *regA* (*somatic regenerator*) führten (Huskey & Griffin, 1979; Starr, 1970). In der Folge wurden zwei weitere Schlüsselgene der Differenzierung, *gls* (*gonidialless*) und *lag* (*late gonidia*), identifiziert (Huskey & Griffin, 1979; Kirk, 1988; Kirk et al., 1991). Diese drei Gene definieren die zentralen Gene der Differenzierung von *V. carteri* (Abb. 3; Kirk, 1998).

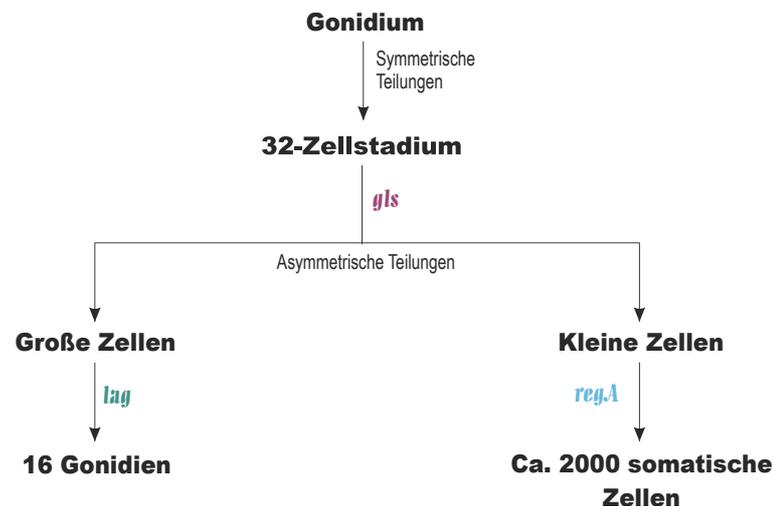


Abb. 3. **Arbeitshypothese, die das genetische Minimalprogramm der Soma-Keimbahn-Differenzierung bei *V. carteri* illustriert.** In einem 32-Zell-Embryo initiiert das Genprodukt von *gls* asymmetrische Teilungen, die zu großen und kleinen Zellen führen. Die großen Zellen hören auf, sich zu teilen und werden zu Stammzellen für den nächsten Zyklus. Die kleinen Zellen teilen sich noch fünf- bis sechsmal und differenzieren zu Somazellen. Das *regA*-Gen wird nur in den Somazellen exprimiert, unterdrückt dort die reproduktiven Eigenschaften und hält somit die Differenzierung aufrecht. Die *lag*-Gene werden nur in den Gonidien exprimiert und unterdrücken dort die Somazell-Eigenschaften. (modifiziert nach Stark & Schmitt, 2002)

Mit der Einführung gentechnischer Methoden – genetische Transformation (Schiedlmeier et al., 1994) mit Selektionsmarkern, wie *nitA* (Nitratreduktase-Gen, Gruber et al., 1992; Gruber et al., 1996) und *aphH* (Paromomycin-Resistenz, Jakobiak et al., 2004), ferner Transposon-Mutagenese (Miller et al., 1993) und Reporteragen-Analogen (Hallmann & Sumper, 1994) – in die Untersuchung von *V. carteri* war der Zugang zur molekularen Analyse dieser Differenzierungsgene erschlossen. Mit Hilfe des endogenen Transposons *Jordan* (Miller et al., 1993) wurden zwei der drei Genorte – *glsA* und *regA* – markiert und isoliert (Kirk et al., 1999; Miller & Kirk, 1999). Der Nachweis der Funktionalität dieser Gene erfolgte durch Cotransformation mit Hilfe einer ballistischen Methode unter Verwendung des *nitA*-Gens als Selektionsmarker (Gruber et al., 1992; Gruber et al., 1996; Kirk et al., 1999; Miller & Kirk, 1999; Schiedlmeier et al., 1994).

Das *gls*-Genprodukt sorgt nach fünf symmetrischen Teilungen im 32-Zell-Stadium der Embryogenese bei den asymmetrischen Teilungen für die Verschiebung der Teilungsebene und somit für unterschiedlich große Tochterzellen (Abb. 3; Miller & Kirk, 1999). Hat dieser Genlocus eine Defektmutation, so entstehen nur gleich große Zellen, die dann alle zu somatischen Zellen differenzieren. Wegen des Fehlens von reproduktiven Gonidien würde der Organismus sterben, wenn nicht zusätzlich eine inaktivierende *regA*-Mutation eingeführt wird, die in einer Redifferenzierung aller somatischen Zellen zu reproduktiven Zellen resultiert. Eine solche *gls-regA*-Doppelmutante enthält keine primären Gonidien im Inneren der *Volvox*-Kugel; jedoch sind die somatischen Zellen an der Kugeloberfläche nach ca. zwei Tagen zu reproduktiven Gonidien redifferenziert, aus denen neue Sphäroide entstehen. In den Gonidien unterdrücken die Lag-Proteine die Ausprägung somatischer Eigenschaften, wie den Augenfleck und die beiden Flagellen (Abb. 3; Kirk, 1990).

Das RegA-Protein ist für die Aufrechterhaltung der Differenzierung verantwortlich. In *regA*-Defektmutanten ist die terminale Differenzierung der somatischen Zellen (Abb. 4) aufgehoben. Sie entwickeln sich während der Reifung der jungen Sphäroide zu funktionsfähigen Gonidien (Starr, 1970). Dieser Vorgang beginnt mit dem Verlust des Augenflecks und der Flagellen und der Größenzunahme der Zelle. Anschließend kann eine erhöhte Expression von Chloroplasten-Genen beobachtet werden, was sich in der zunehmenden Intensität der grünen Farbe widerspiegelt (Kirk, 1997). Wird RegA konstitutiv in allen Zellen exprimiert, resultiert dies im Fls-Phänotyp (*fruitless*). Diese Mutanten haben normale Somazellen, aber winzige Gonidien, die sich extrem langsam teilen. Solche Sphäroide sterben nach zwei bis drei Generationen (Stark et al., 2001).

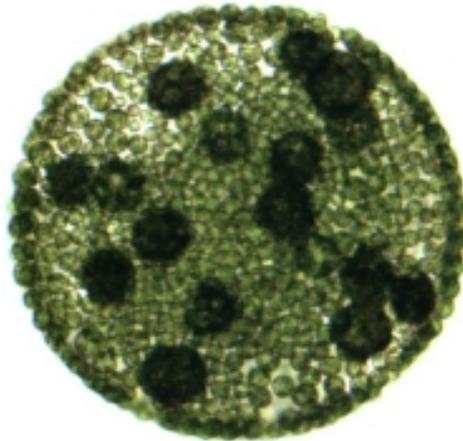


Abb. 4. **RegA-Mutante 153-68 von *V. carteri* am zweiten Tag des Lebenszyklus.** Zu diesem Zeitpunkt werden die Somazellen dunkelgrün und beginnen zu wachsen. Später werden sie sich teilen, um Nachkommen des gleichen Phänotyps zu produzieren.

Das RegA-Protein reprimiert in den somatischen Zellen die Ausbildung reproduktiver Eigenschaften, indem es als negativ regulierender Transkriptionsfaktor fungiert (Abb. 3, Kirk et al., 1999; Meissner et al., 1999). Daß kernkodierte Chloroplasten-Komponenten, vor allem zentrale Bestandteile der Energiegewinnung durch Photosynthese, in somatischen Zellen Zielgene der negativen RegA-Regulation sind, wurde bereits nachgewiesen (Amann, 2002; Choi et al., 1996; Meissner et al., 1999; Schmidt, 2004). Die Aufklärung der Regulation des *regA*-Gens einerseits und der zelltyp-spezifischen Expression und der Wirkung des RegA-Proteins andererseits sind für das Verständnis der terminalen Differenzierung der somatischen Zellen essentiell.

Der 12,5 kb-Genlocus von *regA* (Abb. 5) enthält 8 Exons (zusammen 3147 bp) und 7 Introns, sowie eine kurze 5'NTR (940 bp) und eine lange 3'NTR (2638 bp). Das RNA-Transkript ist 6725 nt lang und ist etwa 12 h nach Beginn der Embryogenese detektierbar; das RegA-Protein tritt nach 16 h auf (Kirk et al., 1999). Das RegA-Protein wird von den Exons 5 (3' Ende) bis 8 kodiert (Abb. 5, gelbe Boxen); die stromaufwärts positionierten Exons 1 bis 5 sind nach früheren Befunden stumm (Kirk et al., 1999).

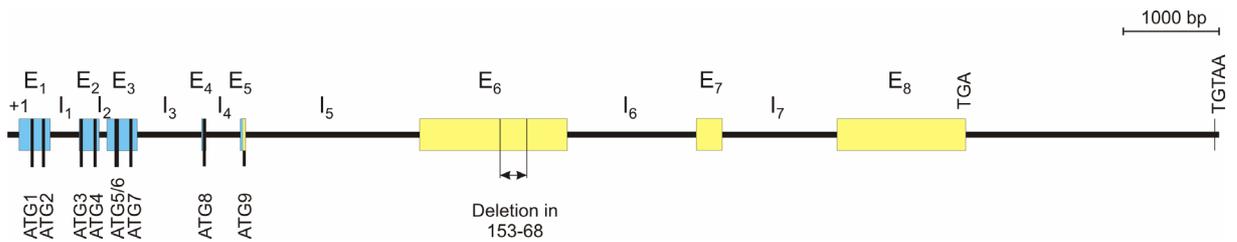


Abb. 5. **Maßstabsgetreue Karte des *regA* Genlocus.** Blaue Boxen symbolisieren nicht-kodierende Exons (E1-E5), gelbe Boxen repräsentieren kodierende Exons (E5-E8), und die Linien zwischen Exons markieren Introns (I<sub>1</sub>-I<sub>7</sub>). Die Positionen von Transkriptions-Startpunkt (+1), Translations-Start (ATG9) und Translations-Stopp (TGA) sowie PolyA-Signal (TGTA) sind bezeichnet, ferner die Lage von acht ATG-Tripletts in der 5'NTR, sowie einer inaktivierenden 280-bp Deletion in E6, die den stabilen Reg-Phänotyp von 153-68 verursacht.

Dieser *upstream* Bereich enthält 8 potentielle AUG-Startcodons (Abb. 6), die eigentlich durch den *scanning*-Mechanismus von der Translationsmaschinerie erkannt werden müssten (Kozak, 1995; Kozak, 2002). Für die Erkennung eines AUG-Tripletts ist außerdem dessen Umgebung, die sogenannte Kozak-Sequenz, mitentscheidend. Bei *Chlamydomonas* wurde sie wie folgt festgelegt (Ikeda & Miyasaka, 1998): **MAMMAUUGC** (M = A oder C; Fettdruck = hochkonserviert), wobei die Positionen -3 und +4 am stärksten konserviert und für die Erkennung besonders wichtig sind.

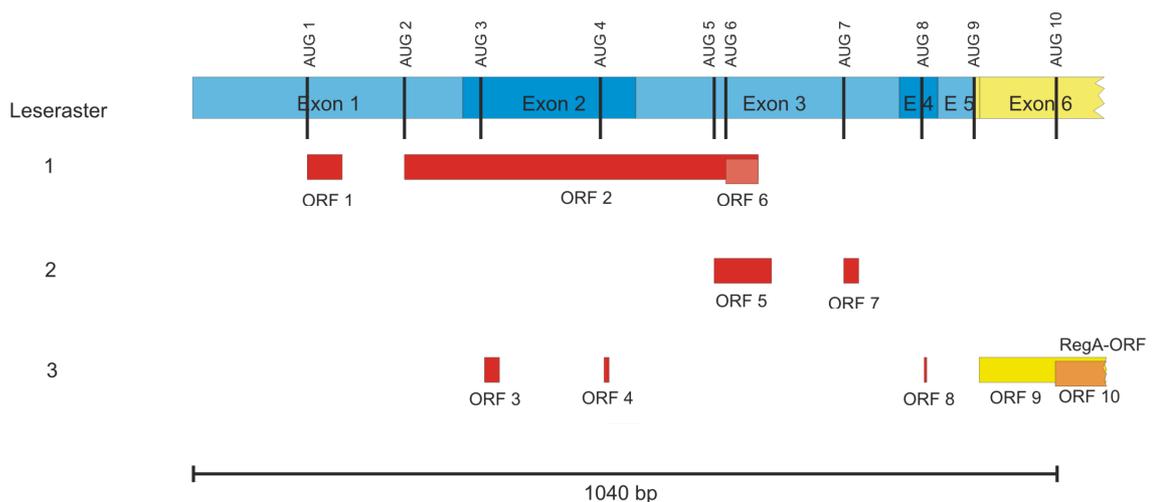


Abb. 6. **Schema des reifen Transkripts der 5' NTR (blau) von *regA* und des 5'-Bereiches der kodierenden Region (gelb) mit den Positionen von 10 AUG-Codons und den zugehörigen offenen Leserastern (ORF1-ORF10).** Die Länge der ORFs (rot), die Zuordnung zu einem der drei Leseraster (von oben nach unten) und die maximale Ausdehnung der 5'NTR von +1 bis AUG10 sind dargestellt.

Keines der ersten 10 AUG-Codons im *regA*-Transkript besitzt diese ideale Sequenzumgebung. Die Verteilung der AUG-Codons auf die Exons 1 bis 6 und mögliche Leseraster sind in Abb. 6 zusammengefaßt. Dieses Muster ist auch im *regA*-Transkript der verwandten Spezies *Volvox carteri* f. *kawakasiensis* auffällig stark konserviert (D. Kirk, pers. Mitteilung), ein Befund, der die vermutete regulierende Bedeutung dieser Region unterstreicht.

Das, beginnend vom AUG9-Startcodon, kodierte RegA-Protein enthält 1049 AS-Reste mit einem berechneten Molekulargewicht von 111.000. RegA ist außergewöhnlich hydrophil und hat einen isoelektrischen Punkt von 4,8. Es enthält zwei Alanin-, drei Glutamin-, zwei Glutamat- und zwei Prolin-reiche Regionen, die zusammen mehr als 35% des gesamten Proteins ausmachen. Diese Domänen sind typisch für Transkriptionsfaktoren (Cowell, 1994; Hanna-Rose & Hansen, 1996). Zusätzlich wurden bei Computer-Strukturanalysen zwei potentielle Helix-Loop-Helix-Motive (Position 639-708 und Position 781-826; Positionsangaben vgl. Anhang 8.2), sechs Kernlokalisierungs-Signale des Typs SV40 großes T-Antigen (PKKKRKKV; jeweils eins an den Positionen 461-464, 911-914 und 1016-1019 und drei überlappende an Position 798-803), ein Kernlokalisierungs-Signal des *Xenopus* Nucleoplasmin-Typs (KRXXXXXXXXXXXXKKKK; Position 618-634) und ein neuartiges Zn-Finger-Motiv (Position 483-501) entdeckt (Kirk et al., 1999; Stark, 1999). Aufgrund dieser Beobachtungen ist RegA ein neuer Transkriptionsfaktor, der ausschließlich in Somazellen exprimiert wird und fungiert (Kirk et al., 1999). Er wirkt (indirekt) reprimierend auf die Transkription kernkodierter Chloroplastengene (Choi et al., 1996; Meissner et al., 1999; Tam & Kirk, 1991). Kürzlich stellte sich heraus, daß RegA in somatischen Zellen die Transkription des *sac1*-Gens (kodiert für ein Sulfatmangel-Sensorprotein, Wykoff et al., 1998) stimuliert (Schmidt, 2004). Es wird vermutet, daß Sac1 wiederum Gene für den Photosyntheseapparat unterdrückt, ein Vorgang, der zu Seneszenz und Tod der Somazellen führt (Meissner et al., 1999; Stark & Schmitt, 2002). Das RegA-Protein steht also an der Spitze einer Regulationskaskade, die den differenzierten Zustand der Somazellen aufrecht erhält und später im Zyklus Seneszenz und Zelltod determiniert.

Weil die Expression des *regA*-Gens ausschließlich in den kleinen Somazellen die kritische Determinante des Zellschicksals ist, war zu vermuten, daß unterschiedliche Transkriptionskontrollen in den kleinen und großen Zellen nach den asymmetrischen Teilungen wirken. Tatsächlich sorgen zwei *enhancer* in den Introns 3 und 5 von *regA* (Abb. 5) für dessen Transkription in somatischen Zellen und ein *silencer* in Intron 7 blockiert

dessen Transkription in den Gonidien (Stark et al., 2001). Die Aktivierung dieser Elemente scheint von der Zellgröße bzw. dem Zellvolumen in einer bisher unverstandenen Weise abzuhängen (Kirk et al., 1993; Schmitt, 2003; Stark & Schmitt, 2002).

Darüber hinaus wirken weitere Kontrollen auf die Expressionsstärke von *regA*. Ihre Mechanismen, die den Promotor und die 5'NTR von *regA* betreffen, galt es hier zu analysieren und aufzuklären. Expressions-Experimente von rekombinanten *regA* in diversen Organismen dienten ferner dem Ziel, reines RegA bzw. Teile des Proteins für die Produktion spezifischer Antikörper zu gewinnen. Im einzelnen wurden folgende Arbeitsziele formuliert:

- 1) Das TBP-Gen von *V. carteri*, ein ubiquitärer und zentraler Transkriptionsfaktor, sollte isoliert, analysiert und rekombinant als Pendant und Muster für das viel größere RegA-Protein exprimiert werden.
- 2a) RegA war rekombinant vollständig oder partiell zu exprimieren und zu reinigen.
- 2b) Ein polyklonales Anti-RegA-Antiserum war herzustellen und zu reinigen.
- 3a) Die Bedeutung aller 10 AUG-Startcodons in der 5'NTR des *regA*-Gens (Abb. 5) war durch gezielte Mutationen in Kombination mit Transformations- und Komplementationsanalysen zu eruieren.
- 3b) Die Rolle in der *regA*-Translation des hochkonservierten und längsten offenen Leserahmens (ORF2) in der 5'NTR (Abb. 6) war zu testen.

## 2. Material

### 2.1 Organismen und Plasmide

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

Tab. 1. **Verwendete Organismen**

Stamm	Marker <sup>1</sup>	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	F <sup>-</sup> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697 $\Delta$ <i>lacX74 galU galK mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr<sup>-</sup> hsdMRS<sup>-</sup> mcrBC</i> ) <i>mcrA rpsL decR</i> 380 $\Delta$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>endA1 nupG recA1</i>	Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc.
Rosetta(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam <sup>R</sup> )	Novagene
NM538	F <sup>-</sup> <i>gal<sup>-</sup> lacY metB hsdR supF</i>	Frischauf et al. (1983)
XL1-Blue MRF'	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI<sup>q</sup>Z</i> $\Delta$ M15 Tn10 ( <i>Tet<sup>r</sup></i> )] <sup>c</sup>	Stratagene
XLOLR	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 thi-1 recA1 lac[F' proAB lacI<sup>q</sup>Z</i> $\Delta$ M15 Tn10 ( <i>Tet<sup>r</sup></i> )]Su $\lambda$ <sup>r</sup>	Stratagene
<i>Volvox carteri</i> f. <i>nagariensis</i>		
HK10	weiblicher J-Stamm (Japan)	Starr (1969)
Poona	weiblicher I-Stamm (Indien)	Adams et al. (1990)
153-48	HK10 ( ) x Poona ( )-Kreuzung: <i>nitA, chl<sup>R</sup></i>	Schiedlmeier et al. (1994)
153-68	HK10xPoona-Kreuzung: <i>regA, glsA, nitA, chl<sup>R</sup></i>	Kirk et al. (1999)
A2-12	153-68 mit pVcNR15 und pVcRegA2, <i>nitA<sup>+</sup>, regA<sup>+</sup></i>	Stark (1999)

<i>Volvox carteri</i> f. <i>kawasakiensis</i> KK3		NIES <sup>2</sup>
<i>Volvox carteri</i> f. <i>weismannia</i> LB 2170		UTEX <sup>3</sup>
<i>Volvox obversus</i> L1865		UTEX
<i>Volvox aureus</i> 88-1		SAG <sup>4</sup>
<i>Volvox africanus</i> LB1890		UTEX
<i>Volvox tertius</i>		UTEX
<i>Volvox gigas</i> LB1894		UTEX
<i>Volvox rousseletti</i> LB 1861		UTEX
<i>Volvox spermatosphaera</i> 2273		UTEX
<i>Volvox dissipatrix</i>		NIES
<i>Volvox globator</i>		SAG
<i>Pleodorina californica</i>	Umbenennung in <i>Eudorina californica</i> , dann in <i>Eudorina indica</i>	Nozaki (1989)
<i>Pleodorina illinoisiensis</i> LB 808	Umbenennung in <i>Eudorina illinoisiensis</i>	Nozaki (1989)
<i>Eudorina elegans</i> LB 1193		UTEX
<i>Eudorina unicocca</i>		UTEX
<i>Pandorina</i>		UTEX
<i>Gonium</i>		UTEX
High Five™ Zellen	BTI-TN-5B1-4, aus <i>Trichoplusia ni</i> Eiern	Invitrogen

<sup>1</sup> Genetische Nomenklatur nach Bachmann (1990)

<sup>2</sup> National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan

<sup>3</sup> The Culture Collection of Algae at the University of Texas, Austin, USA

<sup>4</sup> Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen, Deutschland

Tab. 2. **Verwendete Plasmide, Phagen und Genbanken**

Name	Marker <sup>5</sup>	Herkunft/Referenz
<b>Plasmide</b>		
pSK <sup>-</sup>	<i>bla</i> , <i>lacZ'</i>	Stratagene
pGEM <sup>TM</sup> -T	<i>bla</i> , <i>lacZ'</i>	Promega
pBK-CMV	Neo <sup>r</sup> /Kan <sup>r</sup> , <i>lacZ</i>	Stratagene
pAcSG-His-NT B	Derivat von pAcSG1, His-Tag, <i>bla</i>	Pharmingen
pAcSG 111	pAcSG-His-NT B mit kodierendem Bereich von <i>regA</i>	Eschenwecker (2000)
pVL1392-Xyle	pVL1392 mit Gen für Catechol-2,3-Dioxygenase aus <i>Pseudomonas putrida</i>	Pharmingen
pUC 19	<i>bla</i> , <i>lacZ</i>	Vieira & Messing (1982)
pUC19Reg111	kodierender Bereich von <i>regA</i> in pUC19	Eschenwecker (2000)
pVcRegA1	<i>regA</i> (15,3 kb genomisch) in pSK <sup>-</sup>	Kirk et al. (1999)
pVcRegA2	pVcRegA1 + Ha- <i>tag</i> (YPYDVPDYA) in KpnI-Schnittstelle des Exon 6 (Base 5638)	Stark (1999)
pGEM-AvrII/PmeI	pGEM-T mit integrierter Avr II- und Pme I-Schnittstelle	diese Arbeit
pGEM-5,5kb	pGEM-T mit Pme I/Avr II-Fragment aus <i>regA</i>	diese Arbeit
pVcRegA1ATG1	<i>regA</i> mit ATG→TGG Mutation in Exon 1 in pSK <sup>-</sup> (1. Motiv)	diese Arbeit
pVcRegA1ATG2	<i>regA</i> mit ATG→TGG Mutation in Exon 1 in pSK <sup>-</sup> (2. Motiv)	diese Arbeit
pVcRegA1ATG2Stop	<i>regA</i> mit zwei Stop-Codons hinter ATG2	diese Arbeit
pVcRegA1ATG3	<i>regA</i> mit ATG→TGG Mutation in Exon 2 in pSK <sup>-</sup>	diese Arbeit
pVcRegA1ATG5	<i>regA</i> mit ATG→TGG Mutation in Exon 3 in pSK <sup>-</sup> (1. Motiv)	diese Arbeit
pVcRegA1ATG6	<i>regA</i> mit ATG→TGG Mutation in Exon 3 in pSK <sup>-</sup> (2. Motiv)	diese Arbeit
pVcRegA1ATG7	<i>regA</i> mit ATG→TGG Mutation in Exon 3 in pSK <sup>-</sup> (3. Motiv)	diese Arbeit

pVcRegA1ATG9	<i>regA</i> mit ATG→TGG Mutation in Exon 5 in pSK <sup>-</sup>	diese Arbeit
pVcRegA1ATG9Stop	<i>regA</i> mit Stop-Codon hinter ATG9	diese Arbeit
pVcRegA1ATG9Stop <sup>2</sup>	<i>regA</i> mit zwei Stop-Codons hinter ATG9	diese Arbeit
pVcRegA1ATG10Stop	<i>regA</i> mit Stop-Codon hinter ATG10	diese Arbeit
pVcRegA1ΔBamHI	pVcRegA1 mit BamHI – Deletion (7420 bp)	diese Arbeit
pCR4-TOPO-3xHA	an die <i>codon usage</i> von <i>V. carteri</i> angepaßter synthetisch hergestellter dreifacher Ha-tag in pCR4-TOPO (Invitrogen)	Entelechon
pGEM-3xHA	dreifacher HA-tag mit Nco I-Schnittstelle an beiden Seiten in pGEM-T	diese Arbeit
pGEM-6xHA	sechsfacher HA-tag mit Nhe I- (5'-Ende) und Avr II-Schnittstelle (3'-Ende) in pGEM-T	diese Arbeit
pVcRegA1ΔBamHI+HA	pVcRegA1ΔBamHI mit hinter ATG2 integriertem dreifachem HA-tag	diese Arbeit
pVcRegA1+6xHA	pVcRegA1 mit sechsfachem HA-tag in Avr II-Schnittstelle	diese Arbeit
pVcRegA1ATG2Stopp+6xHA	pVcRegA1ATG2Stop mit sechsfachem HA-tag in Avr II-Schnittstelle	diese Arbeit
pVcNR15	<i>bla</i> , <i>Volvox nitA</i> (cDNA + Promotor + Intron 1)	Gruber et al. (1996)
pTYB4	<i>bla</i> , <i>rop</i> , <i>lacI</i> , <i>Sce</i> VMA Intein-tag, CBD aus <i>B. circulans</i>	NEB
pTYB4-regA/1	kodierender Bereich von Base 1 bis Base 1180 des <i>regA</i> -Gens in pTYB4	diese Arbeit
pTYB4-regA/2	kodierender Bereich von Base 1156 bis Base 2214 des <i>regA</i> -Gens in pTYB4	diese Arbeit
pTYB4-regA/3	kodierender Bereich von Base 2194 bis Base 3150 des <i>regA</i> -Gens in pTYB4	diese Arbeit
pSK-λ17Xba2,7/7	<i>tbp</i> (2,7 kb genomisch aus λ17) in pSK <sup>-</sup>	diese Arbeit
pGEM-TBPKon	cDNA-Sequenz von <i>tbp</i> (Base 427 bis Base 824 der mRNA) in pGEM-T	diese Arbeit
pBK-CMV-11	<i>tbp</i> (2,6 kb cDNA aus λ11) in pBK-CMV	diese Arbeit
pBK-CMV-61	<i>tbp</i> (2,6 kb cDNA aus λ61) in pBK-CMV	diese Arbeit
pSK-61	<i>tbp</i> (2,6 kb cDNA) in pSK <sup>-</sup> mit BamH I/Xba I-Verdau aus pBK-CMV-61	diese Arbeit

pSK-TBP	TBPcDNA mit BamH I- und Nco I-Schnittstelle (5'-Ende) in pSK <sup>-</sup>	diese Arbeit
pTYB4- <i>tbp</i>	kodierender Bereich von <i>tbp</i> in pTYB4	diese Arbeit
<b>Phagen und Genbanken</b>		
λ DashII	λ Vektor für genom. Genbibliotheken	Stratagene
λ ZAP Express	λ Vektor für cDNA-Bibliotheken	Stratagene
<i>ExAssist</i> <sup>TM</sup> <i>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
λ17	λ – DASH II-Klon mit TBP-Teilstück	diese Arbeit
λ11	λ – ZAP Express – Klon mit TBP-cDNA, um 109 Basen am 3'Ende kürzer als λ61	diese Arbeit
λ61	λ – ZAP Express – Klon mit vollständiger TBP-cDNA	diese Arbeit

<sup>5</sup> Genetische Nomenklatur nach Novick et al. (1976)

## 2.2 Verwendete Oligonukleotide

Tab. 3. Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	PCR und Sequenzierung	
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG		
pSKu	CACTATAGGGCGAATTGG		
pSKr	AAAGGGAACAAAAGCTGG		
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG		
pGEMdown	GAATACTCAAGCTATGCATCC		
pAcG2Tuni	TGGTGGCGACCATCCTC		pAcG2T-Sequenzierung
pAcG2Trev	CGTCAGTCAGTCACGATG		
regA/1-NcoIu	CCATGGAGATCGGCTTCCGTAAGGAAG		PCR für pTYB4-Klonierung
regA/1-XhoIr	CTCGAGCTGCACCGCATCGTCGGAAGC		
regA/2-NcoIu	CCATGGAGGCTTCCGACGATGCGGTGC		
regA/2-XhoIr	CTCGAGGTATTGGTTTCAGAACCACGCG		
regA/3-NcoIu	CCATGGCGTCGGTTCTGAACCAATACTTG		
regA/3-XhoIr	CTCGAGGTCCGAAAGGGAATCATCTCCAG		
Intein Reverse	ACCCATGACCTTATTACCAACCTC	pTYB4-Sequenzierung	
regA/1-seq	CAGTTGGCCGTCTATCTCAGC	regA/1-Sequenzierung	
ON-TBP-1	AAYGCNGARTAYAAAYCCNA	degenerierte PCR TBP	
ON-TBP-2	TTYGCNGCNGTNATHATG		
ON-TBP-3	ACNACNGCNYTNATHTT		
ON-TBP-4	GGRAAYTTNACRTCRCA		
ON-TBP-5	AANARYTCNGGYTCRTA		
ON-TBP-6	CATNCKRTADATNARNCC		
TBPSuni	CAGCTCCAGGACATCATG		genomische TBP-Sonde
TBPSrev	GAACCTTGAACGTGG		
Genom. Sonde TBP	GTACGCCAAGATCGTGCAAAAG		cDNA-Sonde TBP
cDNA-Sonde TBPu	GGCACAAAGCTAGACTTGAAGG		
cDNA-Sonde TBPr	GACACAAAGATGAGCAGC	TBP-Sequenzierung	
17Xba2,7/7-1	GACGGAACCTGTGCTGTAAC		
17Xba2,7/7-2	GATGAGCAGCAGATCTTGG		
17Xba2,7/7-3	TGCCTGTATCTCCGAATCCAG		
17Xba2,7/7-1u	GTTACAGCACAGATTCCGTC		
gÜu	GGAGCATATGGAACAGCAGC		
gÜr	GCTGCTGTTCCATATGCTCC		
K1-T3	CCATGACGTTACAGGACCTTC		
T7-Folge1	GCATGCGCAGCTTGGCACATC		
T3-Folge1	CTGGTATTACACCACAGCTGC		
61-T7-Folge1	GCATGCGCAGCTTGGCACATC		

61-T3-Folge2	GAAGCAGCCCAAGATCGTGC	TBP-Sequenzierung
61-T7-Folge2	CTACAAGGACATGCACCTGCC	
61-T3-Folge2.2	CTACGAGCCGAGCTCTTTCC	
51-T3-Folge1	CTACATGAATATCTACCCAC	
61-T7-Folge3	CAAACGGGTGTCGGCGCAAG	
11-T7-Folge2	CGCGTTTGCTCATAACCAAGGC	
gDNA5' E6	GATTCAGTACAAGAAAGGAGA	PCR zur Vervollständigung
gDNA3' UTR	GCACTCAACCCTGCTAGCGAC	der genomischen <i>tbp</i> -
gDNA3' polyA	CCTAAAATATGAATTACAGCC	Sequenz
ATGmutOEu	GTCGTTGCGTTGGAGACCCTTC	Außenprimer für ATG-
ATGmutOEr	CTTGGAAGATCTGCAGACAATG	Mutagenese
AP-XhoI	GCTCGAGAGAATCTTGGTGC	
AP-BamHIr	GTGGATCCCGGCCATTTGAG	
AP-BamHIu	CCTCAAATGGCCGGGATCCAC	
AP-AvrII	CCCTAGGTCGTCGACCACCG	
ATG1mutu	GTTGATAGGCTGGCGTTGGGC	ATG-Mutagenese
ATG1mutr	GCCCAACGCCAGCCTATCAAC	
ATG2mutu	CACTTAGCCTGGGCGTATCC	
ATG2mutr	GGATACGCCCAGGCTAAGTG	
ATG2nonu	CAATGGCGTAACCTTGATACCTTG	
ATG2nonr	CAAGGTATCAAGGTTACGCCATTG	
ATG3mutu	CACTCAGCCTGGCTCAAGAAG	
ATG3mutr	CTTCTTGAGCCAGGCTGAGTG	
ATG5mutu	GAGCAGGGCACTGGTCGGCGT	
Atg5mutr	ACGCCGACCAGTGCCCTGCTC	
ATG6mutu	CGTCCCGTGGGGCACCACCTTG	
ATG6mutr	CAAGTGGTGCCCCACGGGACG	
ATG7mutu	CGGCGTTTGGGCAAAGCCCTC	
ATG7mutr	GAGGGCTTTGCCCAAACGCGG	
ATG9TGGu	CTGCGAAGCAGCTTCTGGGAGGTGAGAGCGTGC	
ATG9TGGr	GCACGCTCTCACCTCCCAGAAGCTGCTTCGCAG	
ATG9non1u	GCAGCTTCATGTAAGTGAGAGCG	
ATG9non1r	CGCTCTCACTTACATGAAGCTGC	
ATG9non2u	CTTCGCAGATCTGATTCCGTAAGG	
ATG9non2r	CCTTACGGAATCAGATCTGCGAAG	
ATG10nonu	GACATGCCACCCTAACCTCAGCTG	
ATG10nonr	CAGCTGAGGTTACGGTGGCATGTC	
ATG9seq	CATTGCCGACTTTGTGTTC	Sequenzierung
ATG9rev	GTGGCTGGACAGCGTTCGTG	
ATG10uni	GAAACACAGCAATCACCGC	
ATG10nonseq	CTCTTTAATGGTTACAGAG	
ATG10nonseqrev	CTCTGTAACCATTAAGAG	
NcoHAuni	CGCCCTCCATGGCATAACCCGTACG	PCR für HA-tag-Klonierung
NcoHArev	CCTTGGTCCATGGCGTAGTCGGG	
ATG2NcoHAu	CCAACACTTAGCCATGGCGTATCC	

ATG2NcoHAr	GGATACGCCATGGCTAAGTGTGG	PCR für HA-tag-Klonierung
regA-HA-NheI	CCCTTGGCTAGCTACCCGTACGAC	
regA-HA-AvrII	CCTTGGCCTAGGGGCGTAGTCGGG	
LE6	TTGGGAGCCGACCTGCCATCC	<i>Screening</i> -PCR auf
RE6	AGCGTGACCTCGCATGTATCC	Cotransformation
ATG2HAuni	GGCTTACCTCGCTCGTATAAC	<i>Screening</i> -PCR auf HA in
ATG2HArev	TCATGGAGTGGATGGACTACC	orf2
orf2uni	ATGGCGTATCCTTGCTACCTTG	orf2-PCR
orf2rev	TCTGGACAAGTGGTGCCCATC	
orf2degu	GARTAYTGYCNGTNCARMG	
orf2degr	GYTGRCANGTNGCCCACC	
deg1	GARTAYTGYCNGTNCA	
deg2uni	TGGGCNACNTGYCARCA	
deg2rev	TGYTGRCANGTNGCCCA	
deg3	CARGCNCTNACNACNCA	
deg4	ACNGCNAGRCADATNCC	
Oligo-dT+A	GACTCGAGTCGACATCGA (T) <sub>17</sub>	RT-PCR
Adapter	GACTCGAGTCGACATCGA	
ATG2expu	CAGCCTTGCTTGCGTTCTTCT	
NcoATG2	ACCATGGCGTATCCTTGCTAC	
Actin-fwd	TAGATTCCGGTGACGGTGTA	Aktin-Sonde
Actin-rev	TCTTCGCGATCCACATTTGC	

## 2.3 Herkunft von Chemikalien und Enzymen

DNA-Leiter-Mix	peqlab (Erlangen)
Acrylamid/Bisacrylamid - Lösungen	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Sigma-Aldrich (München)
Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Anti-CBD-Ak	NEB, Inc. (Beverly, MA, USA)
Anti-Glutathion-S-Transferase Ak, monoklonal	Sigma-Aldrich (München)
Anti- <i>mouse</i> IgG	Amersham Biosciences (Freiburg)
Anti- <i>rabbit</i> IgG	Amersham Biosciences (Freiburg)
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)
Catechol	Sigma-Aldrich (München)
Chitin <i>beads</i>	NEB, Inc. (Beverly, MA, USA)
Coomassie 250 R	Serva (Heidelberg)
DEPC	Sigma-Aldrich (München)
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Roth (Karlsruhe)
DMSO	Sigma-Aldrich (München)
DNase I	Roche (Mannheim)
DTT	Sigma-Aldrich (München)
ECL <sup>TM</sup> <i>Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System</i>	Amersham Biosciences (Freiburg)
ECL <sup>TM</sup> <i>Western blotting analysis system</i>	Amersham Biosciences (Freiburg)
E.Z.N.A. <i>Plasmid Miniprep Kit II</i>	peqlab (Erlangen)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
GFX <sup>TM</sup> <i>PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i>	Amersham Biosciences (Freiburg)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
Harnstoff	GIBCO BRL (Gaithersberg, MD, USA)
HEPES	Biomol (Hamburg)
Hybond <sup>TM</sup> ECL	Amersham Biosciences (Freiburg)
Hybond <sup>TM</sup> N <sup>+</sup> -Nylonmembran	Amersham Biosciences (Freiburg)
IPTG	LOEWE BIOCHEMICA GmbH (Otterfing)

---

Magermilchpulver	Töpfer (Dietmannsried)
<i>MultiMark<sup>®</sup> Multi-Colored Standard</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Nucleospin<sup>TM</sup> Plasmid Kit</i>	Macherey-Nagel (Hilden)
<i>pGEM-T-Vektor Kit</i>	Promega (Mannheim)
Phenol (Tris-gesättigt)	Roth (Karlsruhe)
Phenol/Chloroform	Roth (Karlsruhe)
<i>Prestained Protein Marker</i>	NEB, Inc. (Beverly, MA, USA)
<i>ProofStart<sup>TM</sup> DNA Polymerase</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Oligotex mRNA Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QIAfilter<sup>TM</sup> Midi Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Qiagen<sup>TM</sup> Plasmid Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Rapid-hyb buffer</i>	Amersham Biosciences (Freiburg)
Restriktionsenzyme und Restriktionspuffer	Roche (Mannheim)
	NEB, Inc. (Beverly, MA, USA)
RNaseA	Roche (Mannheim)
<i>RNaseOUT<sup>TM</sup> Recombinant Ribonuclease Inhibitor</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
SDS	Serva (Heidelberg)
<i>Silver Staining kit, Protein</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>SuperScript<sup>TM</sup> II RNase H Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
T4 DNA Ligase	Qiagen (Hilden)
Taq DNA-Polymerase	Serva (Heidelberg)
TEMED	USB (Cleveland, OH, USA)
Tris	Sigma-Aldrich (München)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Tween <sup>TM</sup> 20	Roche (Mannheim)
X-Gal	Merck (Darmstadt)
alle weiteren Salze, Zucker, Chemikalien und Lösungsmittel	

## 2.4 Medien

Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Medien zeigt Tab. 4.

Tab. 4. **Verwendete Medien**

LB <sub>0</sub> (Luria Broth)	Bacto Trypton Bacto Yeast Extract NaCl H <sub>2</sub> O	10 g 5 g 10 g ad 1 l
für Platten:	+ Bacto Agar	15 g/l
LB <sub>0</sub> -amp	LB <sub>0</sub> Nach autoklavieren hinzufügen: Ampicillin	100 µg/ml
LB <sub>0</sub> -amp/X-Gal/IPTG (für Platten)	LB <sub>0</sub> nach autoklavieren hinzufügen: Ampicillin X-Gal (20 mg/ml in DMFO) IPTG (100 mM)	100 µg/ml 20 µg/ml 375 µl/l
LB <sub>0</sub> -Kan	LB <sub>0</sub> nach autokalvieren hinzufügen: Kanamycin	50 µg/ml
TY	Bacto Trypton Bacto Yeast Extract H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> -EDTA*2 H <sub>2</sub> O FeCl <sub>3</sub> *6 H <sub>2</sub> O MnCl <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O ZnCl <sub>2</sub> CoCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	1,5 g 194 mg 82 mg 10 mg 4 mg 8 mg ad 1 l

SVM	Hepes 0,6 g Na-Glycerophosphat-Hydrat 50 mg KCl 50 mg Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O 118 mg MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O 40 mg Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> *10 20 mg Harnstoff 30 mg Thiaminchlorid-hydrochlorid 1 mg Biotin 2,5 µg Vitamin B12 1,5 µg Metall-Lösung 3 ml H <sub>2</sub> O ad 1 l  mit 10N NaOH auf pH 8,0 einstellen autoklavieren
SVMN	wie SVM, ohne Harnstoff
Express Five SFM – Medium (GibcoBRL, Karlsruhe)	

## 2.5 Puffer und Lösungen

In den Tab. 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 50 mM NaCl 0,1 M MgSO <sub>4</sub> 8 mM Gelatine 0,01 %
Top-Agar	Agar 7 g MgSO <sub>4</sub> 10 mM LB <sub>0</sub> ad 1 l

Tab. 6. Lösungen für die Plasmidisolierung

Lösung A	Glucose EDTA Tris/HCl, pH 8,0  DNase-freie RNase	50 mM 10 mM 25 mM  250 µg/ml
Lösung B	NaOH SDS	0,2 M 1 % (w/v)
Lösung C	Ammoniumacetat	7,5 M

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 %
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 <sub>2</sub> O 5x TBE 10 % APS TEMED	20 ml 59,3 ml 20 ml 0,7 ml 100 µl
PA-Auftragspuffer	Bromphenolblau Xylencyanol Glycerin H <sub>2</sub> O	0,25 % 0,25 % 30%
10x TBE	Tris Borsäure EDTA	0,89 M 0,89 M 25 mM
Agarosegel (1 %)	Agarose in 1x TBE	1 % (w/v)
Auftragspuffer für Agarosegele	Glycerin Bromphenolblau Xylencyanol EDTA	50 % (v/v) 0,2 % (w/v) 0,2 % (w/v) 10 mM

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 <sub>2</sub> O Bromphenolblau Xylencyanol	20 µl 5 ml 5 ml 40 mg 40 mg
DEPC-behandeltes Wasser	H <sub>2</sub> O DEPC  inkubieren 12h, 37°C, autoklavieren	1 l 0,1 ml

Tab. 11. 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

Tab. 12. Lösungen für Protein-Analyse

SDS-Extraktionspuffer	Tris/Cl, pH 6,8 SDS	60 mM 2 %
SDS-Sammelgel	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1) Tris/Cl pH 6,8 SDS APS TEMED	5 % (v/v) 125 mM 0,1 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,07 % (v/v)

SDS-Trenngel (10 %)	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1) Tris/Cl ph 6,8 SDS APS TEMED	10 % (v/v) 376 mM 0,1 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,07 % (v/v)
SDS-PAGE-Laufpuffer, pH 8,3	Glycin Tris SDS	192 mM 25 mM 0,1 % (w/v)
SDS-PAGE-Auftragspuffer, 3x, SDS-frei	Glycerin 2-β-Mercaptoethanol Bromphenolblau	30 % (v/v) 3 % (v/v) 0,03 % (w/v)
SDS-PAGE-Auftragspuffer, 2x, mit SDS	Tris/Cl Glycerin SDS 2-β-Mercaptoethanol Bromphenolblau	0,02 mM 18,4 % (v/v) 4,2 % (w/v) 20 % (v/v) 0,013 % (w/v)
natives Polyacrylamidgel (10 %)	5x TBE Acrylamid/Bisacrylamid APS TEMED	20 % (v/v) 26 % (v/v) 0,6 % (w/v) 0,1 % (v/v)
Auftragspuffer für Polyacrylamidgelle, 5x	Glycerin 1x TBE Bromphenolblau	40 % (v/v) 25 % (v/v) 0,04 % (w/v)
Transferpuffer für Western Blot	Glycin Tris Methanol	192 mM 25 mM 20 % (v/v)
PBS	Dinatriumhydrogenphosphat Natriumdihydrogenphosphat NaCl	80 mM 20 mM 100 mM
Blockierungslösung	Magermilchpulver Tween 20 in PBS	5 % (w/v) 0,1 % (v/v)
Coomassie-Färbelösung	Coomassie 250 R Ethanol konz. Essigsäure	0,14 % (w/v) 45 % (v/v) 9 % (v/v)
Entfärber	konz. Essigsäure Ethanol	7 % (v/v) 5 % (v/v)

## 3. Methoden

### 3.1 Kultivierung der Organismen

#### 3.1.1 *Escherichia coli*-Kulturen

*Escherichia coli* wurde, ausgehend von Einzelkolonien, bei 37 °C in LB<sub>0</sub>-Flüssigmedien oder auf LB<sub>0</sub>-Agarplatten (nach Sambrook et al., 1989) angezogen. Zur Transformantenselektion wurden LB<sub>0</sub>-amp-Platten verwendet, oder LB<sub>0</sub>-amp/X-gal/IPTG-Platten, um zusätzlich ein „Blau-Weiß-screening“ (Vieira & Messing, 1982) auf pUC-Rekombinanten durchführen zu können. Kulturvolumina bis 7,5 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. Das Bakterienwachstum wurde photometrisch bei 600 nm Wellenlänge verfolgt (Novaspec II, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Eine OD<sub>600</sub> von 1,0 entspricht einer Kulturdichte von  $8 \times 10^8$  *E. coli*-Bakterien pro ml (Sambrook et al., 1989).

#### 3.1.2 Algen-Kulturen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Stämme nach Starr und Jaenicke (1974) in 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 bei Bedarf durch geringe Koloniedichte und Aussortieren asynchroner Sphäroide beim Überimpfen erreicht. Jedoch wurden die Algen für manche Experimente bewusst asynchron angezogen, um DNA aus allen Phasen des Zyklus zu erfassen. *V. globator*, *V. aureus*, *V. obversus* und *Eudorina uniccoca* wurden wie oben, aber bei 22 °C kultiviert. Stammkulturen wurden in Reagenzgläsern mit 10 ml SVM gehalten und nach zwei bis drei Generationen in frisches Medium überimpft. Bei *V. globator* und *V. obversus* war die Zugabe von Erdexudat (modifiziert nach Pringsheim, 1946) im Verhältnis 1:7 notwendig. Größere Kulturvolumina (200 ml bis 9 l) wurden belüftet.

### 3.1.3 Kultivierung des Phagen $\lambda$

#### 3.1.3.1 Anzucht der Wirtsbakterien

Der Phage  $\lambda$  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 LB<sub>0</sub>-Medium, supplementiert mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,4% Maltose, ÜN angezogen. Am nächsten Tag wurde die Zelldichte bestimmt (3.2.1.12), die Bakterien abzentrifugiert (HTZ, 3.000 Upm, RT, 5 min) und zu einer OD<sub>600</sub> von 2,0 in 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert.

#### 3.1.3.2 Phagenplattierung für Titerbestimmung und *screening* einer Genbibliothek

Für Titerbestimmungen von Phagenlysaten wurden Verdünnungsreihen in SM-Puffer erstellt. Für das *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  $\mu$ l Phagenlysate (in SM-Puffer) mit 100  $\mu$ l vorbereiteter Wirtsbakterien gemischt 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 LB<sub>0</sub>-Platte ausgegossen. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert, bis die Plaques gut sichtbar waren (ÜN, mindestens 10-12 h). Beim *screening* als positiv identifizierte Plaques wurden mit einer Pipettenspitze 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  $\lambda$ -DNA-Präparation (3.2.1.10) wurden 10<sup>5</sup> 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.

### 3.1.4 *High Five*<sup>TM</sup> – Insektenzellen

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen mit 10 ml serologischen Pipetten (Roth, Karlsruhe) bzw. mit Mikro-Pipetten (Gilson, Villiers le bel, Frankreich) unter Verwendung von Filtertips (Peqlab, Erlangen) durchgeführt.

#### 3.1.4.1 Initiation

Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Insektenzellen der Schmetterlingsart *Trichoplusia ni* (*High Five*<sup>TM</sup>, Invitrogen, Groningen, Niederlande, 1ml Aliquot) wurden durch Zugabe von auf 37° C vorgewärmtem *Express Five SFM* (GibcoBRL, Karlsruhe) aufgetaut, in ein 15 ml-Sarstedt-Röhrchen (Nümbrecht) überführt und mit Medium auf 5 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden dann sofort bei RT mit 500 x g für 10 min in einer Hettich-Zentrifuge (Rotix RP, Kista, Schweden) abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml neuem Medium resuspendiert, in eine Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>; Sarstedt *Cell*<sup>+</sup> Gewebekulturflasche, Nümbrecht) überführt und mit 10 ml Medium versetzt. Die Flasche wurde bei 27° C im Brutschrank (Heraeus, Karlsruhe) inkubiert. Nach 30 min wurde das Absetzen der Zellen unter dem Mikroskop (Zeiss IM, Zeiss, Jena; Olympus SZM, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg) kontrolliert.

#### 3.1.4.2 Kulturhaltung

Die Insektenzellen wurden bei 27° C im Brutschrank unter normaler Atmosphäre kultiviert. Kulturen, die am Gefäßboden eine kohärente Zellschicht ausgebildet hatten, wurden folgendermaßen aufgeteilt: Das Medium wurde vorsichtig, ohne die Zellschicht zu zerstören, abgenommen und durch 15 ml auf 27° C vorgewärmtes Medium ersetzt. Danach wurden die Zellen durch Abklopfen vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Ein Teil der Suspension wurde in eine neue Kulturflasche überführt, ein Teil blieb in der alten Flasche, und der Rest wurde verworfen. Danach wurde neues Medium zugegeben, so daß wieder 15 ml in jeder Flasche enthalten waren. Die Inkubation fand bei 27° C. Es wurde ein Zell-Logbuch geführt.

#### 3.1.4.3 Aufbewahrung

Von einer gut bewachsenen Kulturflasche wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer (Blaubrand, Wertheim) bestimmt. Danach wurden die Zellen 10 min bei RT und 1000 x g (Hettich Rotixa RP, Kista, Schweden) sedimentiert, der Überstand abgenommen und

die Zellen in 90% FBS / 10% DMSO resuspendiert, so daß in 1 ml  $3\text{-}4 \times 10^6$  Zellen enthalten waren. Jeweils 1 ml wurde in ein *Cryocup* (InterNunc, Dänemark) pipettiert, während die Zellen ständig auf Eis gehalten wurden. Die Gefäße wurden 90 min bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach einer 24 h-Lagerung bei  $-80^\circ\text{C}$  wurden sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### 3.1.5 Baculovirus-Amplifikation

Für die Amplifikation der rekombinanten Baculoviren, die durch Transfektion von Insektenzellen entstanden sind (3.2.6), wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in einer 10 cm – Petrischale (*Optilux Tissue Culture Dish, TC-treated*, Becton Dickinson, Plymouth, England) ausgebracht. Nach 30 min, wenn sich die Zellen zu mindestens 80% abgesetzt hatten, wurden sie mit 1,25 ml virus-enthaltenden Überstand (3.2.6) versetzt und die Viren vorsichtig durch Schwenken verteilt. Nach 3 d Inkubation wurde der Überstand abgenommen, bei 1000 x g (Hettich Rotixa RP, Kista, Schweden) abzentrifugiert und der virus-haltige Überstand bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Der Virustiter wurde durch den *end-point delution assay* (nach *Baculovirus Expression Vector System Manual 5th Edition May 1998* von Pharmingen, Plymouth, England) bestimmt. Hierzu wurden in eine 12 well – Platte (Zellkultur Testplatte, Renner, Darmstadt) jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen/Mulde ausgebracht. Nach 30 min wurden die Zellen nach folgendem Schema (Abb. 7) mit Virus infiziert:

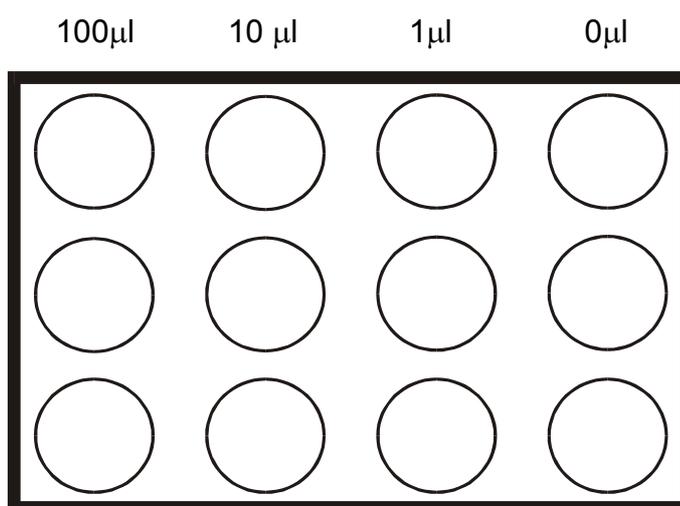


Abb. 7. Infektionsschema des *end-point delution assay*.

Wenn auch die Insektenzellen, zu denen nur 1  $\mu\text{l}$  Überstand gegeben wurde, im Vergleich zur Kontrolle (0  $\mu\text{l}$ , Abb. 8 A), infiziert aussahen (Abb. 8 B), wurde der Virustiter für eine effiziente Proteinexpression als ausreichend definiert.

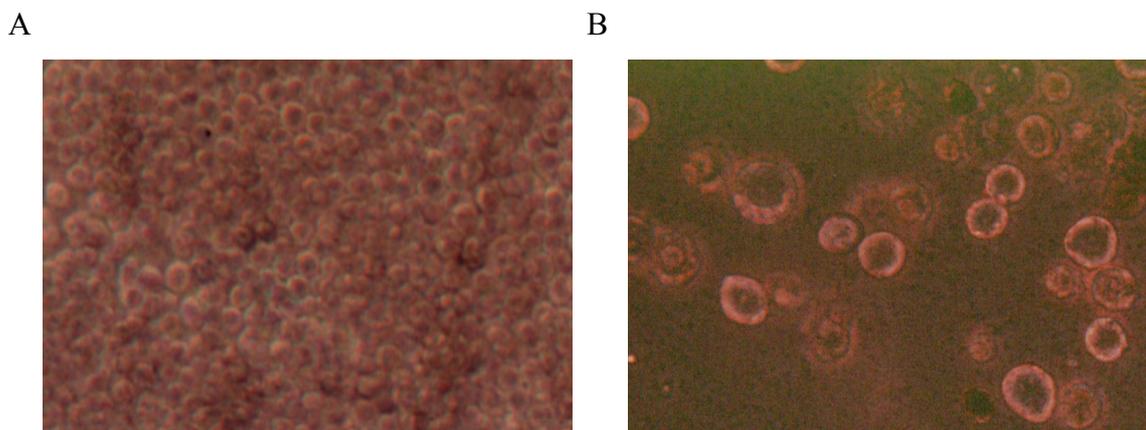


Abb. 8. **Vergleich infizierter und nicht-infizierter Insektenzellen.** In A ist ein nicht-infizierter Insektenzellrasen zu sehen. In B wurden die Zellen 96 h vorher mit Baculoviren infiziert.

## 3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 3.2.1 Isolierung, Reinigung und Auftrennung von DNA

#### 3.2.1.1 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 5 ml  $\text{LB}_0$ -amp ÜN im Roller (37 °C) angezogen. Nach Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, RT, 1 min) wurden die Zellen in 200  $\mu\text{l}$  Lösung A resuspendiert. Durch Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  frisch hergestellter Lösung B und fünfminütiger Inkubation bei RT erfolgte die Lyse der Zellen. Zellproteine und SDS wurden durch Mischen des Lysats mit 300  $\mu\text{l}$  7,5 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  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 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol versetzt und 15 min bei -20 °C gehalten. Nach einer weiteren Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, RT, 15 min) wurde nach dem Abziehen des Überstandes das DNA-Präzipitat mit 500  $\mu\text{l}$  70 % EtOH gewaschen

und nach dem Trocknen in 30-50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen (Rohplasmid). Die Ausbeute lag zwischen 2 µg und 10 µg Plasmid-DNA pro ml Kultur.

#### 3.2.1.2 Isolierung von reiner Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA, z.B. zur nachfolgenden automatischen Sequenzierung, wurde der *Nucleospin Plasmid Kit* von Macherey-Nagel (Hilden) oder der E.Z.N.A. *Plasmid Miniprep Kit II* von peqlab (Erlangen) verwendet. Es wurden 5 - 50 ml einer *E. coli* ÜK eingesetzt. Für die Plasmidpräparation wurde gemäß der Vorschrift des Herstellers verfahren. Die DNA mit 50 - 100 µl des mitgelieferten Elutionspuffers oder H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 3.2.1.3 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 des Herstellers aus 25-30 ml einer *E. coli* ÜK isoliert. Die DNA wurde je nach Bedarf in 100-300 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Es wurden Ausbeuten von 70-130 µg DNA erreicht.

#### 3.2.1.4 DNA-Extraktion

Die Ausgangslösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt, kurz gemischt und anschließend zentrifugiert (ETZ, 14.000 Upm, RT, 1 min). Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit dem gleichen Volumen einer Phenol/Chloroform-Lösung (Roth, Karlsruhe) versetzt und wie oben behandelt. Dieselben Schritte wurden noch zweimal mit Chloroform durchgeführt, um Phenolreste zu entfernen. Die Nukleinsäuren wurden dann durch eine DNA-Fällung (3.2.1.5) gewonnen.

#### 3.2.1.5 DNA-Fällung

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 2,5 Volumen 95% EtOH versetzt und in Gegenwart von zusätzlich 2,5 M NH<sub>4</sub>Ac und 40 µg Glycogen bei -20° C 15 min inkubiert. Danach wurde die DNA sedimentiert (ETZ, 14.000 Upm, RT, 15 min) und der ÜS vorsichtig abgenommen. Das Sediment wurde mit 150 µl 70% EtOH gewaschen und erneut abzentrifugiert (ETZ, 14.000 Upm, RT, 5 min). Das Sediment wurde dann getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O wieder gelöst. Die DNA wurde bei -20° C aufbewahrt.

### 3.2.1.6 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 mittels 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 1 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.

### 3.2.1.7 Isolierung von DNA aus *V. carteri* im kleinen Maßstab

50-200 ml einer *Volvox*-Kultur wurden geerntet, die Sphäroide mittels 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 P1 (*Plasmid Mini Kit*, Qiagen, Hilden) und 250 µl SDS-Extraktionspuffer versetzt. Nach 10 min Inkubation bei 95 °C wurden 350 µl N3 (*Plasmid Mini Kit*, Qiagen, Hilden) 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 H<sub>2</sub>O aufgenommen. Evtl. vorhandene Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation entfernt. Die so gewonnene DNA wurde für PCR-Analysen eingesetzt.

### 3.2.1.8 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 x g 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 zugesetzt, 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 H<sub>2</sub>O (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 H<sub>2</sub>O aufgenommen und nochmals durch Zugabe von 40 µl 2 M NaOAc und 1 ml kaltem EtOH (100 %) bei -80°C 1h lang 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 bei RT getrocknet, in 200 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurde aus der so gewonnenen Gesamt-RNA polyA<sup>+</sup> - mRNA isoliert, dazu wurde der *OligoTex™ mRNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt.

### 3.2.1.9 Isolierung von mRNA aus *V. carteri*

Eine *Volvox*-Kultur wurde geerntet, die Sphäroide mit einem Dounce-Homogenisator geöffnet und bei 350 x g 5 min zentrifugiert. 50.000 Sphäroide wurden mit 4 ml RNA-Lysepuffer gemischt und bei 30 °C 30 min inkubiert. Während dieser Zeit wurde regelmäßig mittels Heidolph-Mixer durchmischt. Anschließend wurde 1 Volumen Phenol pH 4,8 zugegeben und 10 min unter regelmäßigen mischen die RNA extrahiert. Die wässrige Phase wurde durch Zentrifugation (Hettich Rotixa, 3.000 Upm, RT, 10 min) abgetrennt und in ein neues Röhrchen überführt. Die Phenol-Extraktion wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde in

gleicher Art und Weise zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit CIA (24:1) extrahiert. Die so gewonnene RNA wurde mit Isopropanol gefällt und in RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die mRNA wurde dann mit dem *OligoTex™ mRNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers isoliert.

#### 3.2.1.10 Isolierung von DNA aus dem Phagen $\lambda$

Für die Gewinnung von  $\lambda$ -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  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 3.2.1.11 Isolierung des Plasmids pBK-CMV aus $\lambda$ ZAP Express

Der Phagen-Vektor  $\lambda$  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 LB<sub>0</sub>-kan-Platten gezogen.

#### 3.2.1.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die zu bestimmende DNA-Probe wurde, wenn nötig, verdünnt und mit einem Photometer die Absorption bei 260 nm gemessen. Dabei entsprechen 50  $\mu$ g/ml doppelsträngige DNA bzw. 40  $\mu$ g/ml RNA einem OD-Wert von 1,0. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen und das Verhältnis von OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> gebildet. Ein Wert OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> von 1,8 entspricht einem hohen Reinheitsgrad der DNA, bei RNA liegt der Faktor bei 2,0.

#### 3.2.1.13 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente von Größen zwischen 0,1 kb und ca. 20 kb wurden, versehen mit 1/10 Vol. Auftragspuffer, zur analytischen Größenbestimmung bzw. für präparative Zwecke auf

0,75-2%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) fotografiert. Die digitalisierten Bilder wurden über einen Mitsubishi™-Thermoprinter ausgedruckt und konnten mit der Kappa™-Software (V 3.15) zur Weiterverarbeitung im Computer gespeichert werden.

#### 3.2.1.14 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 1 x TBE) ca. 30 min geschwenkt und, wie beschrieben (3.2.10), fotografiert.

#### 3.2.1.15 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

RNA wurde auf denaturierenden Agarosegelen (1-1,5 %) mit 2,2 M Formaldehyd in 1 x MOPS-Puffer aufgetrennt (Sambrook et al., 1989). Die RNA-Proben wurden mit 2 µl 5 x MOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd, 10 µl Formamid und H<sub>2</sub>O 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 (Promega, 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 fotografiert. Von Gelen für *Northern blots* wurde der zu hybridisierende Bereich abgetrennt, nicht gefärbt, und vor dem Transfer 10 min in H<sub>2</sub>O und 10 min in 20 x SSC gewaschen. Um Verunreinigungen durch RNasen zu vermeiden, wurde für alle Lösungen DEPC-behandeltes Wasser verwendet.

### 3.2.1.16 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 H<sub>2</sub>O oder mit kommerziellem Elutionspuffer eluiert.

## 3.2.2 Modifizierung von DNA

### 3.2.2.1 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.

### 3.2.2.2 Dephosphorylierung von DNA

Gespaltene DNA wurde gegebenenfalls mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die DNA wurde durch Zusatz von 1/10 Volumen 3M NaOAc pH 5,2, eines dreifachen Volumens EtOH<sub>abs</sub> und anschließender Zentrifugation (ETZ, 13.000 Upm, 15 min) gefällt. Das Sediment wurde mit 70% EtOH gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 34 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Alternativ wurde die DNA durch den Auftrag auf ein Agarosegel mit anschließender Isolierung gereinigt und mit 40 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Es wurden zu 34 µl Eluat 4 µl des 10 x Dephosphorylierungspuffer sowie 2 µl Alkalischer Phosphatase (1U/µl) zugesetzt und 30 min bei 37° C inkubiert. Die Reinigung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.1.13).

### 3.2.2.3 Ligieren von DNA

Die Ligierungsreaktionen wurden in einem Volumen von 10-20 µl durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden in entsprechenden Mengenverhältnissen mit Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase (5 U/µl) gemischt und 1-24 h bei 4-25 °C inkubiert.

#### 3.2.2.4 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 (Biometra, Göttingen) verwendet. Bei der Auswahl der verwendeten Primer (2.2) 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), eine Polymerase mit *proofreading*-Aktivität (*ProofStart*<sup>TM</sup> DNA Polymerase, Qiagen, Hilden) oder eine Mischung aus beiden verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurden in sterilen, ultradünnen 0,2 ml PCR-Gefäße (BIOzym, Hess. Oldendorf) die Ansätze laut Anweisung des Herstellers zusammenpipettiert. Ein Teil oder auch die gesamte Menge des Ansatzes wurde im folgenden zur Auftrennung der amplifizierten DNA auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde, wenn nötig, die erhaltene Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert (3.2.1.16).

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<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase zusammen mit dem *RNaseOUT*<sup>TM</sup> *Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Vorgaben des Herstellers eingesetzt.

#### 3.2.2.5 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

Das gereinigte PCR-Produkt wurde in einen pGEM-T<sup>TM</sup>-Vektor kloniert (pGEM-T<sup>TM</sup> Vektor 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 eingebracht (3.2.4). Positive, durch „Blau-weiß-screening“ identifizierte Klone wurden weiterkultiviert (3.1.1), Plasmid-DNA isoliert (3.2.1.1) durch geeignete Restriktion (3.2.2.1) auf ihre Richtigkeit überprüft und sequenziert (3.2.3). Zur Sequenzierung wurden die im Vektor bindenden Primer pGEMdown und T7 (Tab. 3) verwendet.

### 3.2.3 Sequenzanalyse und Sequenzbearbeitung

Die DNA-Sequenzanalyse wurde als Auftragssequenzierung an einem ABI 310-Sequencer am Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg bzw. von der Fa. Entelechon (Regensburg) und der Fa. Geneart (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.*) und mit Emboss (Zugang über *UK Human Genome Mapping Project Computing Services*, <http://www.Hgmp.mrc.ac.uk/>) 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/>)
- Für weitere Analysen wurden zahlreiche im Internet verfügbare Datenbanken und Programme benutzt (z.B. mfold, <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/form1.cgi>).

### 3.2.4 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Zellen (DH10B) wurden für die Transformation 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 OD<sub>600</sub>=1,0 geschüttelt. Nach Zugabe von 2 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> 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 Ligierungsansätzen) 80 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis gehalten. Nach einem Hitzeschritt (4 min, 37 °C) wurde der Ansatz nochmals

5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 10-100 µl des Ansatzes auf geeignete LB<sub>0</sub>-Selektionsplatten plattiert und ÜN bebrütet.

### 3.2.5 Transformation von *Volvox carteri*

Die genetische Transformation von *V. carteri* erfolgte mit der *particle gun*-Methode (Schiedlmeier et al., 1994). Als Rezipienten kamen die *nitA*<sup>-</sup>-Stämme 153-48 (WT-Morphologie) und 153-68 (*regA*-Morphologie) zum Einsatz. Als Selektionsmarker diente das *nitA*-Gen des Plasmids pVcNR15 (Gruber et al., 1996). Nur Transformanten können in Medium mit Nitrat als einziger Stickstoff-Quelle (SVMN) wachsen und wurden auf diese Art selektioniert.

Algen mit *regA*-Morphologie wurden vor der Transformation konzentriert und die Sphäroide mittels 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 konzentriert 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 der Selektionsplasmid-DNA (pVcNR15) 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 sofort in 30 ml SVMN aufgenommen und nach Beendigung aller Transformationsansätze nochmals auf bis zu vier weitere Platten unter Zugabe von SVMN aufgeteilt. Nach 7-15 Tagen wurden potentielle Transformanten isoliert. Dabei wurde je Ansatz nur eine Transformante weiterkultiviert, um eine zufällige Auswahl von Geschwistern zu vermeiden. Zwischen 30 und 80 % der *nitA*<sup>+</sup>-Transformanten treten als Cotransformanten auf und haben somit auch das unselektierte Transgen aufgenommen (Schiedlmeier et al., 1994). Ein *screening* auf Cotransformation wurde mittels PCR aus lebenden Sphäroiden durchgeführt. Hierzu wurden zwei bis drei Sphäroide pro Ansatz als *template* in die PCR eingesetzt und ein initialer Schritt von 95 °C für 5 min vorgeschaltet.

### 3.2.6 Transfektion von *High Five*<sup>TM</sup>-Insektenzellen

#### 3.2.6.1 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Es wurde die Zellzahl einer mit *High Five*<sup>TM</sup>-Insektenzellen gut bewachsenen Flasche mit einer Neubauer-Zählkammer (Blaubrand, Wertheim) bestimmt und dann  $2 \times 10^6$  in einer 6 cm – Petrischale (*EASY GRIP*<sup>TM</sup> *Tissue Culture Dish* von Becton Dickinson, Plymouth, England) ausgebracht. Die Schale wurde bei 27° C inkubiert. Währenddessen wurden 0,5 µg Baculogold<sup>TM</sup> Baculovirus DNA (Pharmingen, Plymouth, England) mit 5 µg Transfervektor mit der im Leseraster klonierten Gensequenz gemischt und dies mit HBS (20 mM HEPES; 150 mM NaCl) auf 55 µl gebracht. Außerdem wurden 30 µl des DOTAP Liposomalene Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim) mit 70 µl HBS verdünnt. Diese beiden Lösungen wurden wiederum miteinander gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Das Absetzen der Insektenzellen wurde nach 30 min kontrolliert. Anschließend wurde zu den Zellen, die sich zu 90 % abgesetzt hatten, die hergestellte Transfektionslösung zugeben und durch leichtes Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt. Nach 6 h Inkubation bei 27° C wurde die Transfektionslösung vorsichtig abgenommen und durch vorgewärmtes Medium ersetzt. In dieser Zeit wurden der Transfervektor und die Baculo-DNA in die Insektenzelle aufgenommen, wo sie anschließend durch homologe Rekombination homologer Bereiche im 5'Bereich des Polyhedrin-Gens und des Transfervektors miteinander verknüpft wurden und ein intaktes Virusgenom entstand (Abb. 9). Danach erfolgte eine weitere Inkubation von 5 d. Dann wurde der Überstand abgenommen und bei 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt das rekombinante Virus und wurde bei 4° C aufbewahrt.

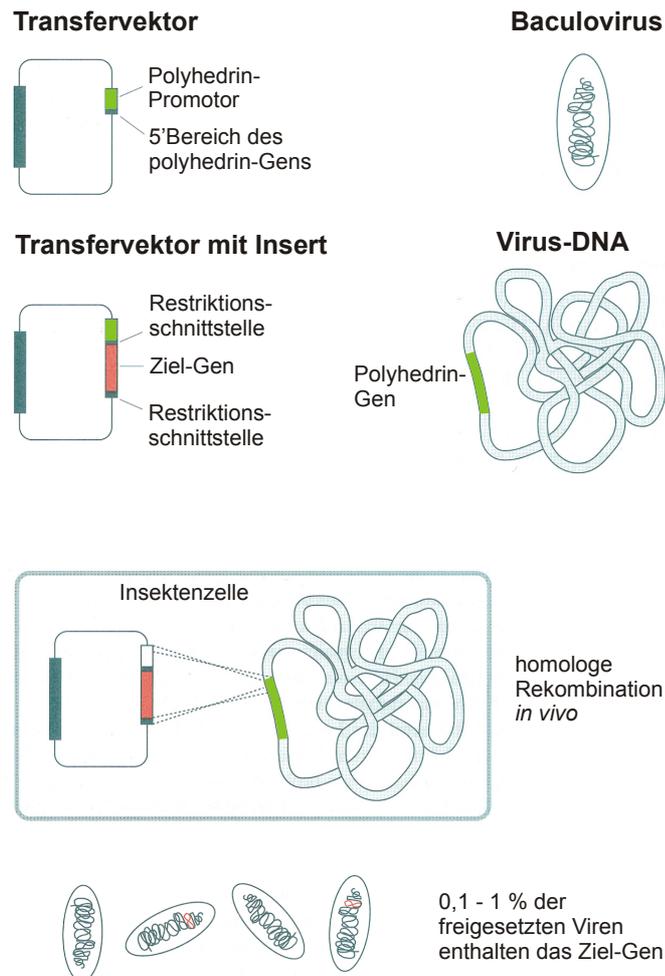


Abb. 9. **Konstruktion von rekombinanten Baculoviren für die Expression in Insektzellen.** (modifiziert nach Lottspeich & Zorbas, 1998)

### 3.2.6.2 Catechol-Test

Zur Kontrolle der Transfektion, wurde eine gut bewachsene Kulturflasche parallel mit dem pVL1392-XylE-Kontrollvektor transfeziert (3.2.6.1). Der dabei entstandene K<sup>+</sup>-Virus enthielt das Gen für das Enzym Catechol-2,3-dioxygenase aus *Pseudomonas putrida*. Wird dieses Enzym exprimiert, wurden die Zellen nach der Zugabe von 500 µM Catechol und 50 µM Natriumbisulfat ins Medium und vier Tagen Inkubation bei 27 °C gelb. Dieser Test konnte auch zur indirekten Kontrolle der rekombinanten Proteinexpression verwendet werden. Dazu wurde das K<sup>+</sup>-Virus in gleicherweise wie das Virus, das das Ziel-Gen enthält, amplifiziert (3.1.5) und eine Zellkulturflasche infiziert (3.3.2.1). Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 27 °C wurden 500 µM Catechol und 50 µM Natriumbisulfat ins Medium

gegeben. Nach ca. 20 h konnte eine Gelbfärbung des Mediums beobachtet werden (Abb. 10), wenn die Insektenzellen das Enzym Catechol-2,3-dioxygenase rekombinant exprimierten. War dies der Fall, wurden technische Probleme bei der Expression des Ziel-Gens ausgeschlossen.



Abb. 10. **Catechol-Test.** 48 h nach der Infektion mit dem K<sup>+</sup>-Virus wurden der linken Kulturflasche 500  $\mu$ M Catechol und 50  $\mu$ M Natriumbisulfat zugesetzt und ÜN bei 27° C inkubiert. Die rechte Flasche enthält als Kontrolle infizierte Zellen ohne Catechol.

### 3.2.7 Hybridisierung und Detektion von Nukleinsäuren

#### 3.2.7.1 Übertragung von DNA aus Agarosegelen auf Nylon-Filter (*Southern blot*)

DNA aus Agarosegelen wurde durch Kapillartransfer (modifiziert nach Southern, 1975) auf Hybond™ N<sup>+</sup>-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 10 x SSC. Nach kurzem Waschen der Membran in 2 x SSC wurde sie zur Immobilisierung der DNA 2 h bei 80 °C gebacken.

### 3.2.7.2 Direktes Aufbringen von DNA auf Nylon-Filter (*Dot blot*)

Um Kopienzahlen, z.B. von Transgenen, zu bestimmen und entsprechende Daten aus *Southern*-Analysen zu verifizieren, wurden *Dot blot*-Analysen 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 20 x SSC versetzt. Ein Stapel aus einer Hybond™ N<sup>+</sup>-Nylonmembran (Amersham Biosciences, Freiburg) und zwei Whatman-3MM-Filterpapieren wurde in 10 x 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 zweistündiges Backen bei 80 °C an der Membran fixiert und bis zur Hybridisierung zwischen zwei Whatman-3MM-Papieren aufbewahrt.

### 3.2.7.3 Übertragung von RNA aus Agarosegelen auf Nylon-Filter (*Northern blot*)

RNA aus Agarosegelen wurde analog zur *Southern*-Technik (3.2.7.1) auf Hybond™ N<sup>+</sup>-Nylonmembranen (Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Vor dem Kapillartransfer wurde das Gel 10 min in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O und 10 min in 20 x SSC gewaschen. Als Transferpuffer diente 10 x SSC. Zur Fixierung der RNA wurden die Membranen nach dem *blotting* 2 h bei 80 °C gebacken.

### 3.2.7.4 *Screening* von λ-Genbanken

Von Phagenplatten (3.1.3.2) wurde durch *plaque lifting* Phagen-DNA auf Hybond™ N<sup>+</sup>-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 2 h bei 80 °C gebacken und bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

### 3.2.7.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung wurde als Auftragsmarkierung durch *Random Primed Labeling* von der Fa. Hartmann Analytic (Braunschweig) durchgeführt.

### 3.2.7.6 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 2 x SSC, 0,1 % SDS bei RT, dann 2 x SSC, 0,1 % SDS bei 65 °C und, je nach Bedarf weiter jeweils 20 min in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 65 °C und evtl. bei noch höheren Temperaturen gewaschen. Danach wurden die Membranen auf ein feuchtes Whatman-3MM-Papier gelegt, in Folie eingeschweißt und eine Autoradiographie durchgeführt (3.2.8).

### 3.2.7.7 Nichtradioaktive Detektion von Nukleinsäuren

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

## 3.2.8 Autoradiographie

### 3.2.8.1 Autoradiographie mittels Röntgenfilm

Zur Autoradiographie wurde auf die 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 -80 °C exponiert (Biomax™-Film mit Verstärkungs-Schirm). Für Hybridisierungen nach dem ECL™-Verfahren wurde ein Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg) 0,5-30 min exponiert, anschließend 2-4 min entwickelt (Rodinal Entwickler, Kodak) und 2 min fixiert (Tetenal Fixiersalz, Kodak).

### 3.2.8.2 Autoradiographie mittels *PhosphorImager*

Zur radioaktiven Autoradiographie wurde auch ein PhosphorImager (*Cyclone™ Storage Phosphor System*, Packard Instruments Co., Meriden, CT, USA) eingesetzt. Dazu wurden 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 Intensitäten von Banden der Autoradiogramme möglich.

## 3.3 Arbeiten mit Proteinen

### 3.3.1 Expression und Isolierung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* mittels dem *IMPACT-CN-System*s

#### 3.3.1.1 Transformation und Expression

Für die rekombinante Expression wurde das *IMPACT-CN-System* (NEB, Beverly, MA, USA) mit dem Expressionsplasmid pTYB4 (Abb. 11) und dem *E. coli* Stamm *Rosetta* (DE3) verwendet. Die zu exprimierenden kodierenden Bereiche wurden mittels PCR mit den

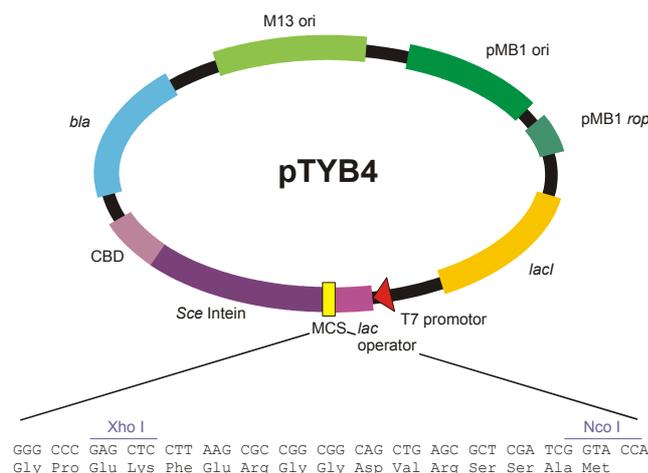


Abb. 11. **Expressionsvektor pTYB4 (NEB)**. Dieser Vektor kodiert für ein Fusionsprotein mit einem C-terminalen Intein-tag aus *S. cerevisiae* (Sce Intein) und eine daran anschließende Chitin-Bindedomäne (CBD). Der zu exprimierende Bereiche wurde über die in der MCS enthaltene Schnittstellen *Nco I* und *Xho I* integriert. Die Transkription wird durch den mit IPTG induzierbaren T7 Promotor kontrolliert. Durch den Lac Repressor, LacI, der an den *lac operator* bindet, wird die Basaltranskription minimiert. pMB1 ori, Replikationsursprung für *E. coli*; *bla*, Ampicillin-Resistenz.

*Nco I*- (5') und *Xho I*-Schnitten (3') versehen und in den Vektor ligiert. Nach Sequenzierung wurden die Plasmide in den *E. coli* Stamm laut Anweisung des Herstellers eingebracht. Anschließend wurden Einzelkolonien in 10 ml LB-amp angeimpft und bei 37 °C ÜN im Roller inkubiert. Mit dieser Kultur wurde dann 1 l LB-amp + 1 % Glucose beimpft und bei 37 °C geschüttelt bis eine OD<sub>600</sub> von 0,8 erreicht wurde. Die Kultur wurde mit 0,3 mM IPTG induziert und ÜN bei 15 °C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5.000 x g (10 min) geerntet und bei -80 °C bis zur Reinigung gelagert.

### 3.3.1.2 Zellaufschluß und Reinigung von rekombinanten Protein nach der Intein-Methode

Zellen aus 1 l Kultur wurden in 50 ml *Cell Lysis Buffer* (20 mM Tris, pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, Proteaseinhibitor Complete<sup>TM</sup> von Roche, Mannheim) aufgenommen und mittels French Press aufgeschlossen. Anschließend wurde 10 µg/ml DNase I zugesetzt und die nicht löslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei 12.000 x g (1 h) abgetrennt. Der Überstand wurde dann auf eine laut Hersteller (NEB, Beverly, MA, USA) vorbereitete Chitinsäule geladen (Abb. 12). Dem Waschschrift mit etwa 10 Säulenvolumen *Cell Lysis*

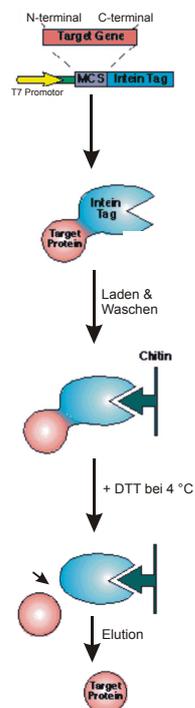


Abb. 12. Fließdiagramm einer Reinigung nach der Intein-Methode.

*Buffer* (ohne Proteaseinhibitor) folgte das Auftragen von drei Säulenvolumen 50 mM DTT, gelöst in *Cell Lysis Buffer*, zur Induktion der Spaltreaktion des Inteins. Nach 16-stündiger Inkubationszeit wurde das abgespaltene Protein in 5 ml Fraktionen in hoher Reinheit von der Säule eluiert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE getestet und die Protein-enthaltenden Fraktionen vereinigt.

### **3.3.2 Expression und Isolierung von rekombinanten Proteinen aus *High Five*<sup>TM</sup> Insektenzellen**

#### 3.3.2.1 Infektion der Insektenzellen

Es wurden  $5 \times 10^6$  Zellen pro Zellkulturflasche ausgebracht und nach 30 min bei 27 °C kontrolliert. Nach dem Absetzen der Zellen wurden 500 - 1000 µl Virusüberstand zugegeben und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden 3 d bei 27 °C inkubiert. Danach wurden sie bei 1.000 x g (RT; Hettich Rotixa RP, Kista, Schweden) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Aus dem Sediment wurde das Protein gewonnen.

#### 3.3.2.2 Denaturierende Gewinnung des Gesamtproteins

Für die denaturierende Gewinnung des Gesamtproteins wurde zum oben gewonnenen Sediment (3.3.2.1) 1 ml SDS-Extraktionspuffer gegeben und 3 min aufgekocht. Danach wurde die Suspension in der ETZ 2 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein ERG überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

#### 3.3.2.3 Gewinnung des Gesamtproteins unter nativen Bedingungen

Zur Gewinnung des Gesamtproteins unter nativen Bedingungen wurde das oben gewonnene Sediment (3.3.2.1) in eiskaltem *Insect Cell Lysis Buffer* (Pharmingen, Plymouth, England), der einen Protease Inhibitor Cocktail (Pharmingen, Plymouth, England) enthält, resuspendiert. Zu  $2 \times 10^7$  Zellen wurde 1 ml Lysepuffer gegeben. Die Zellen wurden 45 min auf Eis lysiert. Danach wurde das Lysat in der Tischzentrifuge 5 min zentrifugiert und der Überstand durch Spritzenvorsatzfilter (*Supor*<sup>TM</sup> *Acrodisc*<sup>TM</sup> 25; 0,2 µm; Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) filtriert. Das Lysat wurde gegen PBS 24 h bei 4 °C dialysiert und bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.3.2.4 Reinigung unter nativen Bedingungen mittels Affinitätssäule

Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte über eine *HiTrap* NHS-aktivierte Säule (1 ml, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

#### 3.3.2.4.1 Packen der Säule

Die *HiTrap* NHS-aktivierte Säule wurde zuerst dreimal mit 2 ml 1 mM HCl gewaschen, um das Isopropanol zu entfernen. Anschließend wurde sofort 1 ml einer Ligandenlösung (1mg Ak; in 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 M NaCl; pH 8,3) aufgetragen und 4 h bei 4 °C inkubiert, dreimal mit 2 ml Puffer A (0,5 M Ethanolamin; 0,5 M NaCl, pH 8,3), dann mit dreimal 2 ml Puffer B (0,1 M Acetat; 0,5 M NaCl, pH 4,0) und schließlich mit dreimal 2 ml Puffer A gewaschen. Die Säule wurde 30 min bei RT inkubiert und anschließend wurde dreimal mit 2 ml Puffer B, dann dreimal mit 2 ml Puffer A und schließlich dreimal mit 2 ml Puffer B gewaschen. Danach wurden 2 ml PBS (pH 7,2) injiziert. Der Durchlauf betrug weniger als 1 ml/min.

#### 3.3.2.4.2 Affinitäts-Reinigung

Die Säule wurde mit je 3 ml PBS und dann mit Elutionspuffer (0,2 M Glycin/HCl pH 2,5) gewaschen. Anschließend wurde sie mit 10 ml PBS äquilibriert, bevor 1 ml nativer Proteinextrakt (3.3.2.3) aufgetragen wurde. Die Säule wurde ÜN bei 4° C stehen gelassen. Mit 10 ml PBS wurde die Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 ml Elutionspuffer. 750 µl Eluat wurden mit ½ Volumen K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung pH 9,0 neutralisiert. Danach wurde der Antikörper gegen PBS pH 7,2 bei 4° C dialysiert. Die Säule wurde nach der Elution mit 10 ml PBS gewaschen und zur Wiederverwendung wurde sie mit 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 % NaN<sub>3</sub>, pH 7 beladen und bei 4° C aufbewahrt. Der Erfolg wurde mit Hilfe eines *Western Blot* (3.3.7.5) überprüft.

### 3.3.3 Affinitätsreinigung von Antikörper

Für die Reinigung von Rohseren wurden 50 bis 200 µg des Antigens auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (3.3.7.1) aufgetragen und anschließend auf eine Membran transferiert (3.3.7.5). Die Membran wurde kurz in PBS gewaschen, 5 min mit Ponceau-S überschichtet und dann vorsichtig mit PBS entfärbt. Die Antigen-Bande wurde ausgeschnitten und in kleinen Stücken in ein 2 ml ERG überführt. Nachdem die Membran mit PBS vollständig

entfärbt wurde, wurden 2 ml Rohserum zugegeben und ÜN im Roller bei 4 °C inkubiert. Die Membranstücke wurden anschließend dreimal 5 min mit PBS + 0,1% BSA, zweimal 5 min mit PBS + 0,1% BSA+ 0,1% + NP40 und dreimal 5 min mit PBS + 0,1% BSA gewaschen. Die Elution wurde dreimal 1 min unter Zugabe von je 750 µl 0,2 M Glycin pH 2,5 durchgeführt. Zum Neutralisieren wurde jeweils 375 µl gekühlter 1M  $KP_i$ -Puffer pH 9,0 zupipettiert. Die Ak-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, gegen PBS dialysiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Membranstücke können in PBS + 0,02%  $NaN_3$  bei 4 °C einige Wochen aufbewahrt und dann wieder verwendet werden.

### 3.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

#### 3.3.4.1 Proteingehaltbestimmung mit *Bio-Rad Protein Assay* (Hercules, CA, USA)

Für die Proteingehaltbestimmung wurde der *Bio-Rad Protein Assay* (Hercules, CA, USA) herangezogen. Dieser Test basiert auf dem *Bradford assay*. Es wurde ein Proteinstandard mit BSA von 2 µg/ml bis 28 µg/ml hergestellt. Davon wurden 800 µl mit 200 µl der *Dye Reagent Concentrate* – Lösung gemischt. Die unbekannte Proteinlösung wurde 40fach verdünnt und, wie die Standard-Lösungen, in den Test eingesetzt. Die anschließende photometrische Messung erfolgte bei 595 nm. Danach wurde die Standard - Proteinkonzentrationen gegen die Absorption aufgetragen, der Wert für die Proteinkonzentration des zu bestimmende Proteins abgelesen und um den Verdünnungsfaktor 40 korrigiert.

#### 3.3.4.2 Proteingehaltbestimmung mit *Bio-Rad DC Protein Assay* (Hercules, CA, USA)

Alternativ wurde die Proteingehaltbestimmung mit dem *Bio-Rad DC Protein Assay* (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Dieser Test basiert auf der Lowry-Methode und kann bei SDS-Konzentrationen von bis zu 10 % eingesetzt werden. Zuerst wurde ein Proteinstandard mit BSA von 0,2 bis 1,4 mg/ml hergestellt. Dann wurden 20 µl des Reagenz S zu je 1 ml des Reagenz A gegeben. 50 µl Standard bzw. Probe wurden zu 250 µl A-S-Gemisch gegeben und kurz gemischt. Danach wurden 2 ml des Reagenz B zugesetzt und sofort gemischt. Nach 15 min wurde dann die Absorption bei 750 nm gemessen, die Standard-Proteinkonzentrationen gegen die Absorption aufgetragen und der Wert für die Proteinkonzentration des zu bestimmenden Proteins abgelesen.

### 3.3.5 Proteinfällung mit Aceton

Zur Fällung von Proteinen wurden 200 µl Proben mit 600 µl Aceton in einem ERG gemischt und 30 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde 5 min zentrifugiert und der ÜS entfernt. Der Niederschlag wurde in 40 µl SDS-PAGE-Auftragspuffer (2 x, mit SDS; Tab. 12) aufgenommen und 10 min bei 95 °C inkubiert.

### 3.3.6 Proteinkonzentrierung mit *Centricon*

Für die Konzentrierung von Proteinen wurden *Centricon*-Röhrchen (Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheit für wäßrige Lösungen, Millipore, Bedford, MA, USA) verwendet, die anhand der Porengröße des Filters ausgewählt wurden. Die Probe wurde in das *Sample Reservoir*, welches auf das Abfallgefäß gesteckt ist, pipettiert und bei der für den *Centricon*-Typ angegebenen g-Zahl zentrifugiert. Nach ausreichender Einengung der Probe, wurde das *Sample Reservoir* umgekehrt auf das Auffanggefäß gesteckt und bei 300 bis 1.000 x g 2 min zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt (3.3.4).

### 3.3.7 Proteinanalysen

#### 3.3.7.1 SDS-Polyacrylgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Elektrophorese von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden Mini-Gele (9 x 7 cm; 1 mm Dicke) verwendet. Die Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgte nach der Anleitung des Herstellers der Elektrophorese-Apparatur (Biometra, Göttingen). Zunächst wurde zwischen die entfetteten Glasplatten das Trenngel (Tab. 12) bis etwa 1 cm unterhalb des Randes gegossen und mit 500 µl H<sub>2</sub>O überschichtet. Nachdem die Polyacrylamid-Lösung polymerisiert war, wurde das Wasser abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel (Tab. 12) überschichtet. Anschließend wurde ein Teflonkamm mit 10 Taschen eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisierung wurde der Kamm und die Dichtung entfernt und das Gel in die Elektrophorese-Kammer eingebaut, in die der SDS-Laufpuffer (Tab. 12) bereits eingefüllt war. Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge Auftragspuffer (Tab. 12) versetzt und, wenn nötig, 3 min bei 100 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Größen wurde ein Molekulargewichts-Standard (*MultiMark<sup>TM</sup> Multi-*

*Colored Standard* oder *SeeBlue™ Pre-Stained Standard* von Novex, Groningen, Niederlande) mit aufgetragen. Die Apparatur wurde mit 20 mA je Gel angeschlossen und lief etwa 2 h.

### 3.3.7.2 Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen mit Polyacrylamid-Gelen

Für die Elektrophorese nicht-denaturierter Proteine wurde dieselbe Apparatur wie unter 3.3.7.1 verwendet. Die Polyacrylamid-Lösung (Tab. 12) wurde zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und der Teflonkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt, in der bereits der Laufpuffer (1x TBE; pH 8,2) eingefüllt worden war. Die Proben wurden mit dem 5 x Auftragspuffer (Tab. 12) für Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen versetzt und ohne Aufkochen aufgetragen. Je Gel wurden für ca. 2 h 20 mA angelegt.

### 3.3.7.3 Nachweis von Proteinen mittels Coomassie-Färbung

Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Gel von der Glasplatte gelöst und 15 min bei RT in der Coomassie-Färbelösung (Tab. 12) leicht geschüttelt. Danach wurde es in die Entfärbelösung überführt. Die Lösung wurde nach 30 und nach 90 min gewechselt und dann ÜN bei leichtem Schütteln weiter entfärbt. Das Gel wurde zur Aufbewahrung zwischen Whatman-3MM-Filterpapier und Kopierfolie mit einem LKB 2003 Slab Gel Dryer (Bromma, Schweden) getrocknet.

### 3.3.7.4 Nachweis von Proteinen mittels Silberfärbung

Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Gel von der Glasplatte gelöst und laut Anweisung des Herstellers unter Verwendung des *Silver Staining kit* (Protein, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gefärbt. Das Gel wurde zur Aufbewahrung zwischen Whatman-3MM-Filterpapier und Kopierfolie mit einem LKB 2003 Slab Gel Dryer (Bromma, Schweden) getrocknet.

### 3.3.7.5 Western-Analyse

Die Transfereinheit wurde nach Anleitung des Herstellers der Elektrobplot-Apparatur (Hoefler TE22 Tank Transfer Unit, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) zusammengesetzt. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig von der Glasplatte gelöst und auf eine passend zugeschnittene Nylon-Membran (*Hybond™ ECL*,

Amersham Biosciences, Freiburg) gelegt. Abb. 13 zeigt den Aufbau der Apparatur für Immunbindetests.

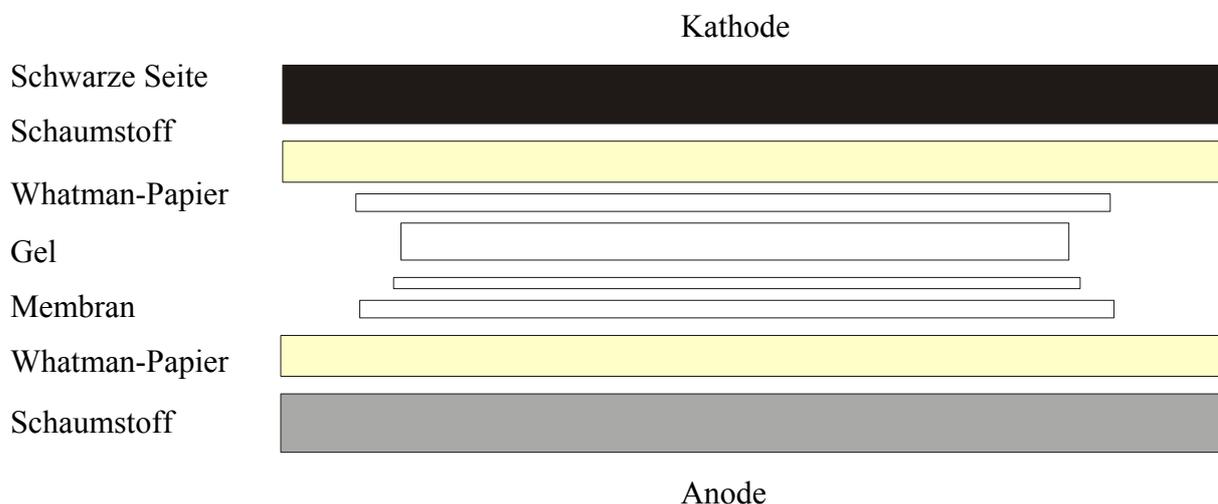


Abb. 13. **Aufbau der Hoefer-Apparatur für Immunbindetests.**

Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte in Transferpuffer (Tab. 12) bei 400 mA für 2 bis 3 h. Die Membran wurde ÜN bei 4° C in *Blocking* Puffer (Tab. 12) aufbewahrt und anschließend dreimal 10 min mit PBS-Tween<sup>TM</sup> 20 (0,2%) unter leichtem Schütteln gewaschen. Währenddessen wurde der primäre Antikörper 1:200 bis 1:800 in 5 ml *Blocking* Puffer verdünnt. Die Membran wurde in das Röhrchen transferiert und in einem Roller (New Brunswick Scientific Co. TC-7, New Brunswick, NJ, USA) bei RT 60 bis 90 min mit dem primären Antikörper inkubiert. Danach wurde sie wieder dreimal 10 min mit PBS-Tween<sup>TM</sup> 20 (0,2%) unter leichtem Schütteln gewaschen. Unterdessen wurde der sekundäre Antikörper 1:2000 bis 1:2500 in 5 ml *Blocking* Puffer verdünnt. Die Membran wurde in das Röhrchen transferiert und im Roller bei RT 60 min mit dem sekundären Antikörper, an den das Enzym Peroxidase aus Meerrettich gekoppelt ist, inkubiert. Danach wurde sie erneut dreimal 10 min mit PBS-Tween<sup>TM</sup> 20 (0,2%) unter leichtem Schütteln gewaschen. Für die Detektion wurde das *ECL<sup>TM</sup> Western blotting analysis System* (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) verwendet. Dazu wurden nach Anleitung des Herstellers zu gleichen Teilen Lösung 1 mit Lösung 2 gemischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt.

Nach 1 min wurde die Lösung abgekippt und die Lumineszenz mit Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) dokumentiert. Hierfür wurde die Membran zwischen zwei Kopierfolien gelegt, auf die der Röntgenfilm für jeweils 30 sec, 2 min, 5 min und 30 min aufgelegt wurde. Die Filme wurden dann mit dem Rodinal Filmentwickler (Kodak, Rochester, USA) entwickelt und mit dem Tetenal Fixierer (Kodak, Rochester, USA) fixiert.

## 4. Ergebnisse

Die Differenzierung von *V. carteri* wird von drei Genloci – *gls*, *lag* und *regA* – gesteuert. In dieser Arbeit steht das *regA*-Gen im Vordergrund der Untersuchungen. Seine Transkription und Expression bestimmen den zellspezifischen und den zeitlichen Verlauf der Differenzierung (Kirk et al., 1999; Schmitt, 2003; Stark et al., 2001). Die regulatorische Wirkung des RegA-Proteins und die Aufklärung der Regulation des *regA*-Gens selbst, sind die entscheidenden Aspekte der Differenzierung von somatischen Zellen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der ubiquitäre Transkriptionsfaktor TBP (TATA-Box-Bindeprotein) von *V. carteri* isoliert und analysiert. Im zweiten Teil wurde das RegA-Protein bzw. Teile davon rekombinant exprimiert. Diese Proteine dienten als Basis für die Gewinnung spezifischer Antikörper, mittels derer die Synthese des Proteins, eventuell auch in anderen *Volvox*-Spezies, nachzuweisen wäre. Im dritten Teil wurde die Translationskontrolle des *regA*-Gens durch Elemente seiner 5'NTR untersucht.

### 4.1 Charakterisierung des *tbp*-Gens von *V. carteri*

Die Frage, wie das RegA-Protein soma-spezifische Gene reguliert, ist bisher offen. Andererseits ist bekannt, daß bei Anwesenheit von RegA die Transkription von *sacI* positiv (Schmidt, 2004) und die der wichtigen Chloroplastengene negativ reguliert wird (Meissner et al., 1999). Es ist offen, ob RegA direkt an Promotor-DNA bindet oder ob z.B. der ubiquitäre Transkriptionsfaktor TBP eine Plattform für die Bindung von *regA* bildet. Deshalb wurde hier das TBP-kodierende Gen von *V. carteri* isoliert, charakterisiert und rekombinant exprimiert als Basis für Bindestudien an DNA und das rekombinant exprimierte RegA-Protein.

TBP ist eine ubiquitäre und essentielle Komponente des Transkriptionsapparates von Archäen und Eukaryonten, die für alle drei eukaryontischen RNA-Polymerasen von zentraler Bedeutung ist. Fehlt die TATA-Box, wie bei den rRNA-Genen (Rausch et al., 1989), so wird TBP durch Protein-Protein-Interaktion rekrutiert. Das TBP (Abb. 14) wird in zwei Regionen unterteilt, eine nicht-konservierte (N-terminale) und eine konservierte Domäne. Die nicht-konservierte, aminoternale Domäne dient der Wechselwirkung mit regulatorischen Proteinen und ist in ihrer Länge sehr variabel. Bei Pflanzen (z.B. *A. thaliana*: 18 AS) ist diese

Region im Vergleich zu den Tieren (z.B. *H. sapiens*: 159 AS) relativ kurz. Die hochkonservierte carboxyterminale Domäne, die sogenannte Kernregion, vermittelt die DNA-Bindung des Proteins. Sie enthält zwei Kopien einer ca. 62 bp langen Sequenz (Abb. 14, grüne Boxen) und mehrere kurze Wiederholungen.

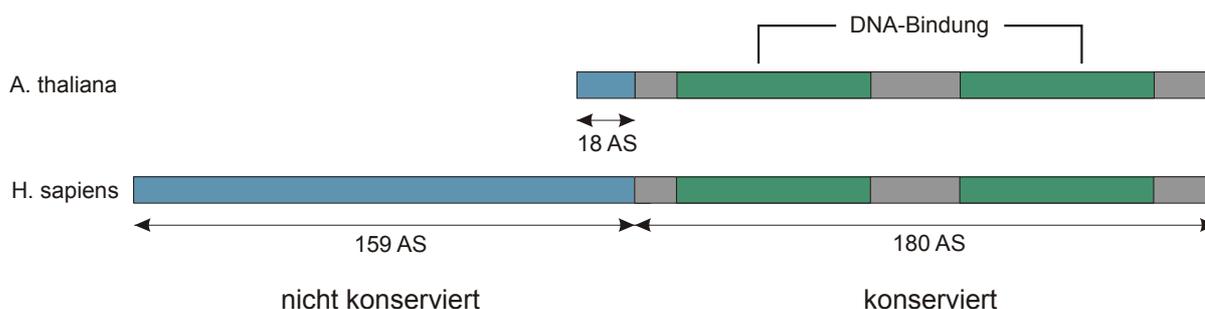


Abb. 14. **Schema der TBP-Primärstrukturen von *A. thaliana* und *H. sapiens*.** Der konservierte Teil (Kernregion, 180 AS) ist grau, die DNA-bindenden Domänen grün markiert; letztere stellen Sequenzwiederholungen dar. Blau: nicht-konservierte Domäne.

TBP-kodierende Gene wurden von zahlreichen Spezies isoliert und sequenziert (Anhang 8.1.3, mit Quellenangaben). In den meisten Fällen existiert nur eine Genkopie, aber es gibt einige Ausnahmen wie z.B. die Modellpflanze *Arabidopsis*, die zwei Kopien enthält (Gasch et al., 1990). Die konservierte TBP-Kernregion vieler Spezies weist über 75 % Identität zum menschlichen Protein auf (Hernandez, 1993). TBP bindet als Monomer sattelförmig an die DNA (Abb. 15), und zwar in der kleinen Furche (Horikoshi et al., 1990; Starr & Hawley, 1991). Durch die Bindung wird die DNA-Doppelhelix (im Bereich der TATA-Box) um mehr als 100° gebogen und dadurch teilweise entwunden, was für die Transkription von TBP als Transkriptionsfaktor essentiell ist (Horikoshi et al., 1992).

TBP-kodierende Gene von *V. carteri* oder anderen Grünalgen waren zu Beginn dieser Studien nicht bekannt. Deshalb war, außer den genannten Gründen, auch eine Aufklärung der Gen- und Proteinstruktur *per se* von Interesse.

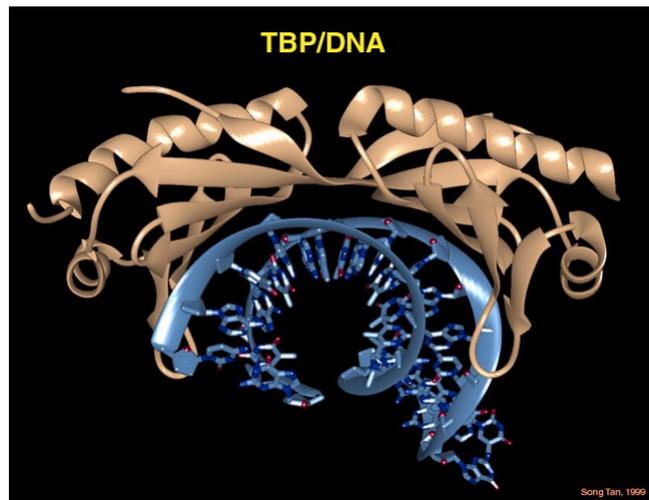


Abb. 15. **TBP/DNA-Interaktion.** Das TBP-Protein bildet eine sattelförmige Struktur, mit der es an die DNA (blau) bindet. TBP ist in braun dargestellt. Die symmetrische Sattelform wird von jeweils fünf  $\beta$ -Strängen (Pfeile, unten) und je zwei  $\alpha$ -Helices (Wendeln, oben) gebildet. (Tan, 1999)

#### 4.1.1 Gewinnung der Sonde VcTBP

Für die Sequenzaufklärung des unbekanntes *tbp*-Gens von *V. carteri* waren entsprechende Klone aus einer genomischen und einer cDNA-Genbibliothek zu fischen. Zur Gewinnung einer geeigneten Sonde wurden AS-Sequenzen aus der universell hochkonservierten TBP-Region in drei degenerierte Primerpaare (Tab. 3) übersetzt (Anhang 8.1.3) und in den  $2^3$  möglichen Kombinationen in eine PCR mit CsCl-DNA (3.2.1.6) von *V. carteri* HK10 als Matrize eingesetzt. Die aufgetrennten PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert (3.2.2.5). Die Sequenzen der Produkte der beiden Primerkombinationen ON-TBP-1/ON-TBP-4 und ON-TBP-2/ON-TBP-4 (Tab. 3) lieferten bei einer BLAST-Suche in der NR-Datenbank (NCBI) die besten Ergebnisse mit ca. 70 % Identität. Das längere der beiden PCR-Produkte (ON-TBP-1/ON-TBP-4; 894 bp) wurde als Sonde, VcTBP, zum *screening* einer genomischen Genbibliothek von *V. carteri* verwendet.

#### 4.1.2 *Screening einer genomischen und einer cDNA-Genbibliothek*

Zum *screening* der genomischen *Volvox*-Genbibliothek (3.2.7.4) in  $\lambda$  DASH II (Kirk et al., 1999) mit VcTBP (Abb. 16) wurden 96.000 Phagen plattiert. Insgesamt wurden 18 positive Signale erhalten, von denen acht in der zweiten Runde eingesetzt und schließlich vier unabhängige *plaques* gepickt wurden. Eine Restriktionskartierung ergab, daß der  $\lambda$ -Klon Nr. 17 ( $\lambda$ 17, Abb. 16) die Sequenzbereiche der drei anderen Klone enthält. Dieser längste Klon wurde vollständig mittels *primer walking* sequenziert.

Nachdem die genomische *tbp*-Teilsequenz  $\lambda$ 17 bekannt war, wurde sie in drei Leserahmen übersetzt, durch Vergleich der korrekte identifiziert und wahrscheinliche Exon- und Intron-Bereiche abgegrenzt. Auf diese Art wurden fünf Introns und sechs Exons (E6 unvollständig) definiert (Abb. 16). Anhand dieser Daten wurden geeignete Primer (cDNA-SondeTBPu und cDNA-SondeTBPp, Tab. 2) zur Herstellung einer Sonde für die cDNA-Bibliothek in  $\lambda$ -ZAP-Express (B. Cresnar, pers. Mitteilung) konzipiert und mittels einer PCR, mit der gesamten cDNA-Matrize synthetisiert (TBPkon; Abb. 16). Mit TBPkon wurden von 400.000 plattierten Phagen drei positive Plaques erhalten und in einer zweiten Runde vermehrt. Mit dem *ExAssist*<sup>TM</sup> Helferphagen (Stratagene, La Jolla, CA, USA) wurde aus allen drei Klonen ( $\lambda$ -cDNA-Klone 11, 51 und 61) *in vivo* das Plasmid pBK-CMV mit der integrierten cDNA isoliert (3.2.1.11). Der  $\lambda$ -cDNA-Klon 61 ( $\lambda$ 61; Abb. 16) enthielt mit 2363 bp die längste Sequenz bis zum PolyA-Signal (Anhang 0). Ein 109 bp *upstream* liegendes weiteres PolyA-Signal wird in der kürzeren cDNA von  $\lambda$ 11 benutzt (Abb. 16). Der Klon  $\lambda$ 51 war deutlich kürzer und wurde nicht weiter berücksichtigt.

Ein Vergleich von cDNA (Anhang 8.1.2) und genomischer Sequenz (Anhang 8.1.1) zeigte, daß der genomischen Sequenz am 3'Ende noch ca. 1440 bp fehlten, die mittels zweier PCRs mit den Primernpaaren gDNA5'E6/gDNA3'UTR und K1-T3/ gDNA3'polyA (Tab. 3) direkt aus dem Genom isoliert wurden (Abb. 16). Durch den Vergleich von cDNA (ca. 2340 bp, Anhang 0) und genomischer DNA (ca. 4 kb; Anhang 8.1.1) wurde die gesamte kodierende Region und die endgültige *tbp*-Struktur mit sechs Exons und fünf Introns festgelegt (Abb. 16).

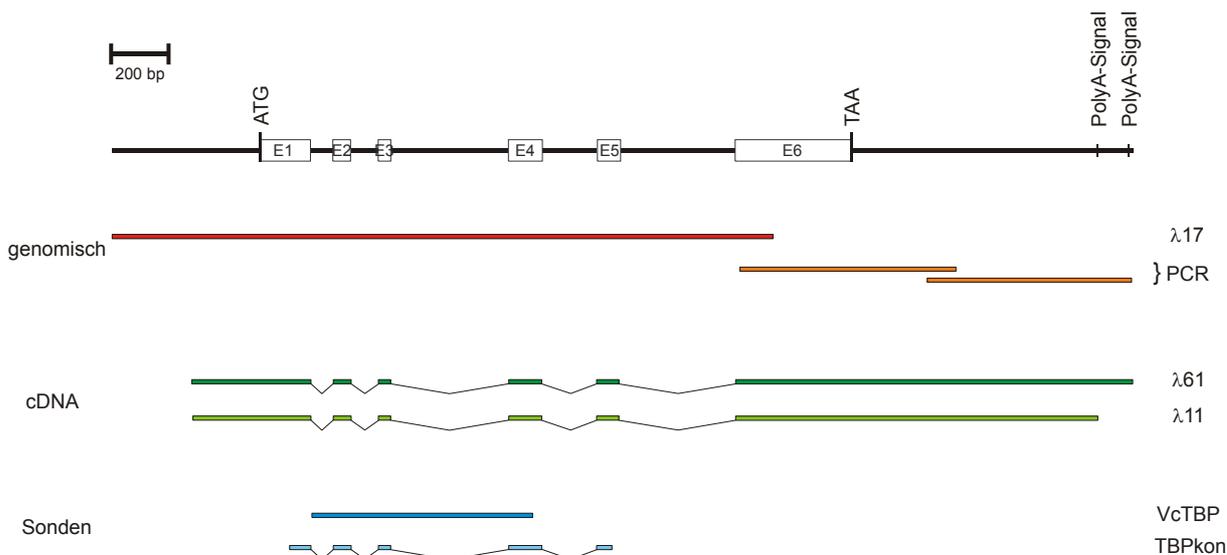


Abb. 16. **Physikalische Karte des TBP-Genlocus *tbp* von *V. carteri*.** Gezeigt ist die hier abgeleitete Exon (weiße Boxen) -Intron (schwarz) -Struktur des Gens mit den NTRs, dem Start- und Stopp-Codon und zwei PolyA-Signalen. Außerdem sind die verschiedenen Sequenzabschnitte der genomischen DNA und der cDNA und deren Lage gezeigt. Die genomische Sequenz setzt sich aus der Sequenz des λKlons 17 (rot) und der durch PCR gewonnenen Teilbereiche (orange) zusammen. Die Lage der beiden cDNA-λKlone 61 und 11 (grün) sowie die der für die Hybridisierung der Genbibliotheken verwendeten Sonden (blau) VcTBP (genomisch) und TBPkon (cDNA) ist dargestellt.

Interessanterweise ist das abgeleitete TBP-Polypeptid N-terminal um ca. 140 Reste gegenüber Metazoen-TBPs (aber nicht gegenüber den Pflanzen-TBPs) verkürzt (Anhang 8.1.3). Nach ca. 20 Resten beginnt bereits die konservierte, DNA-bindende Region. Als einziger Vertreter der TBP-Familie hat das *V. carteri*-Protein jedoch eine ca. 120 AS-Reste lange C-terminale Domäne mit auffälligen Häufungen von Alanin-, Glutamin- und Prolinresten, die auf eine regulatorische Funktion hindeuten. Das Genomprojekt des verwandten Einzellers *C. reinhardtii* (JGI, Walnut Creek, CA, USA) lieferte eine abgeleitete TBP-Primärstruktur mit einer ähnlich verlängerten, aber nur mäßig konservierten (53,7 % Identität) Sequenz (4.1.4 und Anhang 8.1.3).

### 4.1.3 Kopienzahl des *tbp*-Gens im *Volvox*-Genom

Wird außer der C-terminal verlängerten TBP-Spezies noch eine zweite (möglicherweise ohne den C-terminalen Appendix) im *V. carteri*-Genom kodiert? Zwei verschiedene Gene sind z.B. im *A. thaliana*-Genom enthalten (Gasch et al., 1990). Deshalb wurde eine *tbp*-Kopienzahl-Bestimmung mittels *Southern*-Analyse (Abb. 18) durchgeführt. Nach Einzel- und Doppelverdau (3.2.2.1) von *V. carteri*-HK10-DNA mit insgesamt sieben Restriktionsenzymen, Fragmenttrennung mittels Elektrophorese (3.2.1.13) und DNA-Transfer auf eine Membran (3.2.7.1), wurde mit TBPkon (Abb. 17, blaue Boxen) hybridisiert. Die entsprechende Restriktionskarte des *tbp*-Genlocus ist in Abb. 17, das Ergebnis der *Southern*-Analyse in Abb. 18 wiedergegeben.

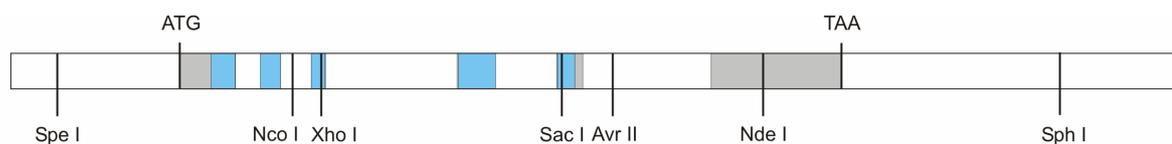


Abb. 17. **Restriktionskarte des *tbp*-Genlocus.** Eingezeichnet sind neben Start- (ATG) und Stoppcodons (TAA) die Positionen der Schnittstellen, der für die *Southern*-Analyse (Abb. 18) verwendeten Restriktionsenzyme. Der hybridisierende Bereich des Gens mit TBPkon ist blau markiert. Die Exonabschnitte des kodierenden Bereichs, die nicht durch die Sonde abgedeckt wurden, sind grau dargestellt.

Aufgrund der Restriktionskarte und der Lage der Sonde TBPkon wurde in den Spuren des *Nco I*-, *Sac I*- und *Xho I*-Verdau zwei, bei den restlichen Verdau eine hybridisierende Bande erwartet. Der Doppelverdau mit *Avr II* und *Spe I* sollte eine 1980 bp Bande, der Doppelverdau mit *Spe I* und *Sph I* eine 3570 bp Bande ergeben. Zusätzlich auftretende Banden würden auf eine weitere Kopie des *tbp*-Gens hindeuten.

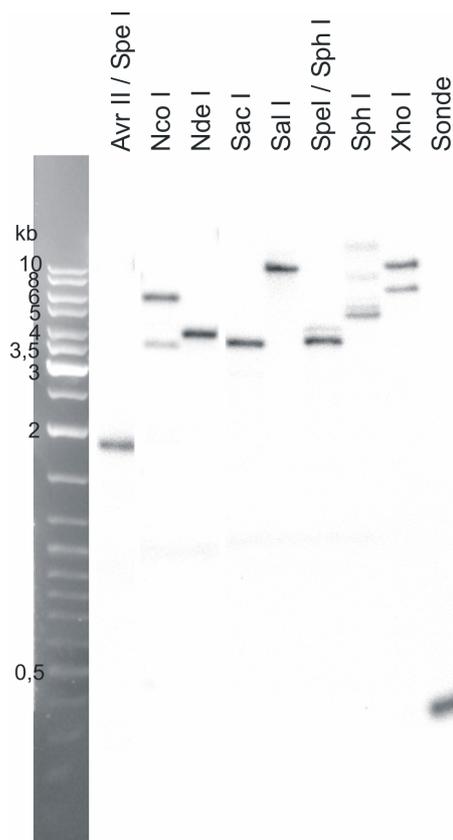


Abb. 18. **Southern-Analyse des *tbp*-Gens.** Je Spur wurde 3  $\mu$ g mit dem jeweiligen Enzym verdaute HK10-DNA eingesetzt. In der Spur „Sonde“ wurde TBPkon-DNA als Hybridisierungskontrolle aufgetragen. Links ist die Spur des Größenstandards des EtBr-gefärbten Agarosegels gezeigt, dessen übrige Spuren auf die *Southern*-Membran transferiert wurden.

Außer in der Spur *Sac I* wurden alle erwarteten Banden detektiert. Im *Sac I*-Verdau trat nur eine statt der erwarteten zwei Banden auf. Allerdings ist der hybridisierende Bereich des zweiten Fragments relativ klein, so daß eventuell die Stärke der Sonden-Bindung unter den verwendeten Waschbedingungen nicht ausreichend war. Zusätzliche Banden wurden nicht beobachtet. Folglich enthält *V. carteri* außer der isolierten keine weitere *tbp*-Kopie.

Zur Absicherung dieses Resultats wurde ein *Northern blot* durchgeführt (3.2.1.8; Abb. 19). Hierzu wurde aus *V. carteri* HK10 RNA isoliert und davon 13  $\mu$ g zur Analyse aufgetragen. Als Sonde wurde wieder TBPkon verwendet. Wegen der beiden PolyA-Signale wurden zwei Banden erwartet, die sich um 109 Basen in ihrer Größe unterschieden. Wenn ein zweites *tbp*-Gen von unterschiedlicher Größe im Genom existiert (und transkribiert wird), sollte eine weitere Bande sichtbar werden. Da der Transkriptionsstart von *tbp* nicht exakt definiert war, wurde eine Größe der *tbp*-mRNA von mindestens 2450 nt erwartet.

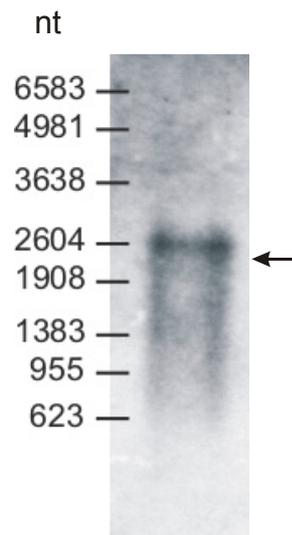


Abb. 19. **Northern-Analyse des *tbp*-Gens.** Es wurden 13 µg HK10-RNA aufgetragen und die Membran mit der Sonde TBPkon hybridisiert. Der Pfeil markiert die minimale Größe von *tbp*. Links wurde der Größenstandard aufgetragen.

Im *Northern blot* wurde eine prominente Bande bei ca. 2600 nt detektiert, eine minimal verkürzte (um 109 bp) zweite Bande wurde nicht beobachtet. Sollte ein weiteres *tbp*-Gen existieren, so wurde es entweder von dieser Sonde nicht erkannt und/oder es unterscheidet sich nicht in seiner Größe. Die Daten lassen den Schluß zu, daß *V. carteri* nur eine Kopie des *tbp*-Gens enthält.

#### 4.1.4 Vergleich der TBP-Sequenzen von *V. carteri* und *C. reinhardtii*

*C. reinhardtii* ist der einzellige Vertreter in der Gruppe der *Volvocida*. Das Genom dieser Alge wurde von JGI (DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA, USA) vollständig sequenziert und teilweise annotiert. Die *tbp*-Sequenz ist bekannt. Dies gab mir die Möglichkeit, das *tbp*-Gen und das abgeleitete Genprodukt des nächsten einzelligen Verwandten von *V. carteri* zum Vergleich heranzuziehen (Abb. 20).

```

      *           20           *           40           *           60           *           80           *
Volvox_carteri : MASTSTDFAPPVATPPITAAANVEAEMAHVSGITPQLQNVVATVNLGKLDLKEIAMHARNAEYNEPKRFAAVIMRIRREPKTALLIFASGK : 90
C_reinhardtii : MAA-A-E-APP-ATPQLSAADVEAEMAHVSGIKPQLQNVVATVNLGKLDLKEIAMHARNAEYNEPKRFAAVIMRIRREPKTALLIFASGK : 86

      100           *           120           *           140           *           160           *           180
Volvox_carteri : MVCTGAKSEDDSRTAARRYAKIVQKLGFPATPKPEFKIQNIVGSCDVKFPPIRLEGLAYAHSLFASYEPPELFPGLIYRMKQPKIVLLIFVSG : 180
C_reinhardtii : MVCTGAKSEDDSRTAARRYAKIVQKLGFPATPKPEFKIQNIVGSCDVKFPPIRLEGLAYAHSLFASYEPPELFPGLIYRMKQPKIVLLIFVSG : 176

      *           200           *           220           *           240           *           260           *
Volvox_carteri : KVVLTGAKTRYEIIYQAYMNIYPTLIQYKKGDAALPALEAAN-LMPPEPRALFPARQAGQPDGS-AEHMEQ-Q-Q-QQPQHHQQQIIPQPVQ : 265
C_reinhardtii : KVVLTGAKTRGEIYQAYMNIYPTLIQYKKGDAVVETLE--NNLMGPPRAL-PA--AG-ESGSGA----QAQAQAQQ-QY--QQQ----- : 247

      280           *           300           *           320           *           340           *           360
Volvox_carteri : HPGSAAAAAMMPPPE---TESAAETESMTLQ---DL---HAM---NLPEPTELHPNLEPPTPRHPGLAPTESLGHVLPPEPSERR : 340
C_reinhardtii : -----AAAG-MMPPEVAATE--AEDEAK--QGGQADVGEPPQAQEQDGNLPEPTEMHHLEPPTPRHPGLAATPSLSHH-LPPPSERR : 325
    
```

Abb. 20. Vergleich der TBP-Primärstrukturen von *V. carteri* (diese Arbeit) und *C. reinhardtii* (Genomprojekt; JGI, Walnut Creek, CA, USA). Identische AS-Reste sind grau hinterlegt, Lücken sind durch – markiert. Das alignment wurde mit Hilfe des Programms water (EMBOSS) erstellt.

Die beiden Polypeptide sind zu 77,5 % identisch, die Ähnlichkeit beträgt 80,6 %. Die Kernregionen (Position 30-212) der beiden TBPs sind nahezu identisch (Identität 98,9 %). Auch das *C. reinhardtii*-Protein besitzt einen zusätzlichen carboxyterminalen Bereich (ab Position 230 der Abb. 20, 120 AS-Reste), allerdings unterscheidet sich dieser doch erheblich in seiner Sequenz von der des *V. carteri*-TBP; die Identität dieser Region beträgt nur 53,7 %, die Ähnlichkeit 57,8 %. Andererseits weisen die konservierten Glutamin-Reste zwischen Position 249 und Position 264, das AAAXMMPPPP-Motiv (Position 277 bis Position 282) und die Sequenz ab Position 321 auf eine funktionelle Bedeutung dieser Bereiche hin. Insgesamt ist zu vermuten, daß dieser grünalgen-spezifische neue C-terminale Bereich von TBP eine besondere regulatorische Rolle spielt, die aber in diesem Kontext nicht weiter untersucht wurde.

#### 4.1.5 Rekombinante Expression von *thp* im IMPACT-CN-System

Das abgeleitete *Volvox*-TBP hat eine Größe von 37 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 10,1 (*pepstats*, EMBOSS). Für die Expression wurde die kodierende Sequenz der cDNA des *thp*-Gens in den pTYB4-Vektor kloniert (Abb. 11). Nach der Überprüfung der Sequenz wurde dieses Plasmid in den *Rosetta*-Stamm von *E. coli* (Tab. 1) transferiert (3.3.1.1). Dieser Stamm hat zusätzlich zum Satz üblicher tRNAs in *E. coli* selten benutzte tRNA-Spezies auf einem Plasmid kodiert, so daß eine abweichende *codon usage* die Expression nicht hemmen kann.

Durch Zugabe von 0,3 mM IPTG wurde die Expression des klonierten *tbp* induziert und die Zellen bei 16 °C ÜN inkubiert (3.3.1.1). Nach dem Zellaufschluß wurde das TBP-Protein mittels Chitinsäule gereinigt (3.3.1.2). Proben von 25 µg bzw. 50 µg des eluierten Proteins (Abb. 21) wurden zur Kontrolle der Reinheit gelelektrophoretisch getrennt (3.3.7.1) und die Banden mit Coomassie angefärbt (3.3.7.3).

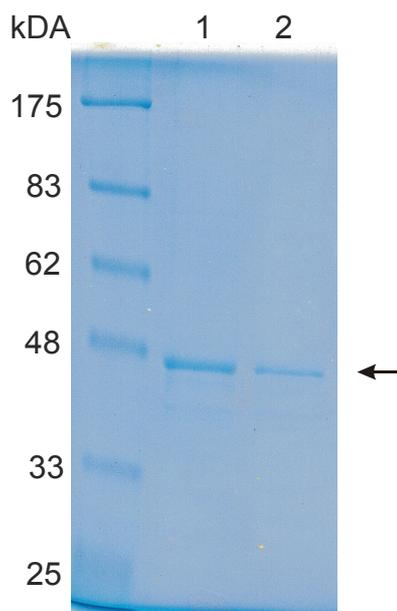


Abb. 21. **SDS-Gel mit gereinigtem TBP-Protein.** In Spur 1 wurden 50 µg und in Spur 2 25 µg Protein aufgetragen. Der Pfeil markiert das TBP. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Links ist der Größenstandard aufgetragen.

Wie Abb. 21 demonstriert, konnte TBP (rechnerisch 37 kDa) nahezu homogen von der Säule gewonnen werden. Allerdings entspricht die Mobilität im Gel einem scheinbaren Molekulargewicht von 45 000. Diese Laufanomalie wurde durchgehend beobachtet und beruht offenbar auf der Proteinzusammensetzung.

Das gereinigte, rekombinante Protein wurde für Promotor-DNA-abhängige Bindestudien mit rekombinantem RegA-Protein (4.2) zur Verfügung gehalten. Diese Studien kamen allerdings wegen der geringen Expression und Instabilität des rekombinanten RegA-Proteins bisher nicht zustande.

## 4.2 Rekombinante Expression von RegA zur Herstellung von Anti-RegA-Antisera

Das *regA*-Gen und sein Genprodukt, RegA, spielen in der Aufrechterhaltung der Somazellendifferenzierung bei *V. carteri* eine Schlüsselrolle. Dabei stellt sich die Frage: Wie wird der Regulator selbst reguliert? Zur Beantwortung wurden zwei Wege verfolgt:

- (1) Das intakte 111 kDa-RegA-Protein, bzw. Teile davon, wurden rekombinant exprimiert (4.2.1). Sie dienten als Basis für die Gewinnung spezifischer Antikörper (4.2.2), mittels derer die Synthese des Proteins – eventuell auch in anderen *Volvox*-Spezies – nachzuweisen wäre. Das vollständige RegA-Protein könnte außerdem in die unter 4.1 erwähnten TBP- und DNA-Bindestudien eingesetzt werden.
- (2) Transkription und Translation des *regA*-Gens, vor allem seine Regulation durch Sequenzelemente seiner 5'NTR, wurde mit Hilfe gezielter Mutationen ausführlich untersucht (4.3).

### 4.2.1 Rekombinante Expression von RegA

Zur rekombinanten Expression des Proteins waren im Vorfeld bereits verschiedene Systeme getestet worden: (1) Experimente mit dem *E. coli*-pET-System (Novagen, Bioggio – Lugano, Schweiz; Jakobiak, 1999) und dem *QIAexpress* System (Qiagen, Hilden; Jakobiak, 1999) verliefen ohne Ausbeute. (2) Die Expression sowohl des kompletten RegA als auch von RegA-Teilfragmenten in *Schizosaccharomyces pombe* mit dem *ESP Yeast Protein Expression and Purification System* (Stratagene, La Jolla, CA, USA) führten nicht zum Erfolg, weil die Zellen abstarben. Allerdings konnten mit dem *GST Gene Fusion System* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) zwei Fragmente des RegA-Proteins, Pepi14 (Position 240-Position 512) und Pepi34 (Position 456-Position 512), exprimiert werden (Jakobiak, 1999). (3) Im Insektenzell-Baculovirus-Expressionssystem wurde RegA exprimiert. Dabei resultierten neben geringen Mengen des intakten RegA verschiedene kürzere Proteinfragmente, die vermutlich auf Expressionsprobleme, wie unvollständige Translation, in den Insektenzellen zurückzuführen waren (Eschenwecker, 2000).

Im folgenden wurde versucht, weitere Teilfragmente von RegA mit dem *IMPACT-CN*-System (NEB, Beverly, MA, USA) sowie das komplette RegA-Protein mit Hilfe des Insektenzell-Baculovirus-Expressionssystems zu exprimieren.

#### 4.2.1.1 Expression mit dem *IMPACT-CN*-System

Zu Beginn dieser Untersuchung stand ein Anti-6kDa-Ak (Eschenwecker, 2000; Jakobiak, 1999) zur Verfügung. Zu dessen Gewinnung wurde ein 6 kDa RegA-Fragment (Position 456-Position 512), als GST-Fusionsprotein, Pepi34, eingesetzt. Es wurde anhand eines Hydrophobizitäts-Diagramms (Jakobiak, 1999; Kyte & Doolittle, 1982) ausgewählt, weil dieser Bereich durch seine hohe Hydrophilität wahrscheinlich an der Proteinoberfläche liegt und somit immunogene Epitope enthält. Dieses Antiserum war aber nicht genügend empfindlich um RegA in *V. carteri*-Extrakten zu detektieren (Eschenwecker, 2000). Da sich das RegA-Protein in den früheren Experimenten nicht als intaktes Protein rekombinant exprimieren ließ (Eschenwecker, 2000), wurde hier der Ansatz gewählt, RegA in drei Teilstücken – RegA/1, RegA/2 und RegA/3 (Abb. 22) - zu exprimieren. Dazu wurde das *IMPACT-CN*-System in Verbindung mit dem *E. coli* Rosetta-Stamm (Tab. 1) verwendet. Dieser Bakterienstamm enthält zusätzlich ein Plasmid, das sechs der sieben seltenen tRNAs von *E. coli* kodiert und exprimiert. Dies sollte Probleme bei der Translation wegen der unterschiedlichen *codon usage* zwischen *E. coli* und *V. carteri*, wie sie bei der rekombinanten Expression in *E. coli* bisher aufgetreten waren, verhindern. Das *IMPACT-CN*-System ermöglicht mittels einer Chitinsäule die Reinigung von Fusionsproteinen (3.3.1), die aus dem Test-Protein, einem Intein-tag und einer Chitinbindedomäne (CBD) bestehen. Nach Bindung des Fusionsproteins an die Säule und Waschschritten wird durch Inkubation mit DTT die Selbstspaltung des Intein-tags induziert; das zu reinigende Protein wird eluiert. Als Expressionsvektor wurde das pTYB4-Plasmid gewählt (Abb. 11), in das die zu exprimierenden Teilstücke von *regA* (Abb. 22) einzeln kloniert wurden. Deren rekombinante Expression und die Reinigung der Produkte sind Gegenstand der folgenden Kapitel.

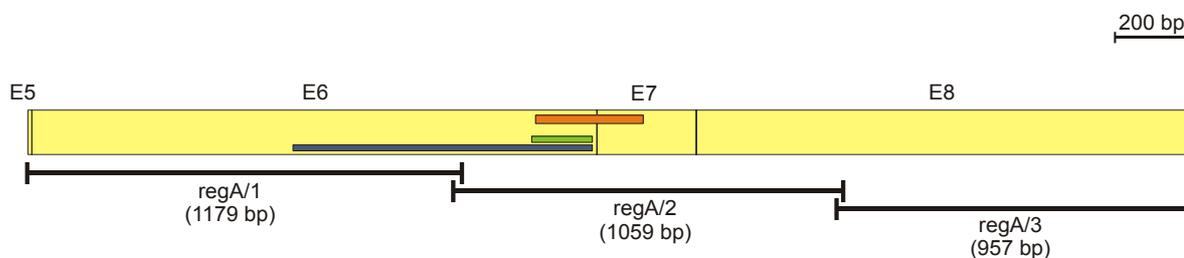


Abb. 22. **Schema des kodierenden Bereichs von *regA***. Die gelben Boxen markieren die kodierenden Exons, E5 bis E8, von *regA*. Die Positionen der drei Teilfragmente, *regA/1*, *regA/2* und *regA/3*, innerhalb des *regA*-Gens sind markiert. Balken stellen die Lage einer in *V. carteri* f. *kawasakiensis* (orange) konservierten Region dar; ferner ist die Lage der Teilpeptide Pepi14 (blau) und Pepi 34 (grün) angezeigt.

4.2.1.1.1 Expression von *regA/1*

Das Teilstück *regA/1* enthält die ersten 1179 bp des kodierenden Bereichs der *regA*-cDNA (Abb. 22). Es wurde mittels PCR an einer klonierten *regA*-Matrize (pUC19Reg111, Tab. 2) inklusive der terminalen Schnittstellen für die Klonierung in pTYB4 hergestellt. Die rekombinante Expression im Rosetta-Stamm von *E. coli* nach IPTG-Induktion verlief problemlos (3.3.1.1). Das rekombinante 44 kDa-Produkt, RegA/1, wurde mittels *IMPACT* gereinigt (3.3.1.2) und die Fraktionen der Elution mittels SDS-PAGE (3.3.7.1) überprüft.

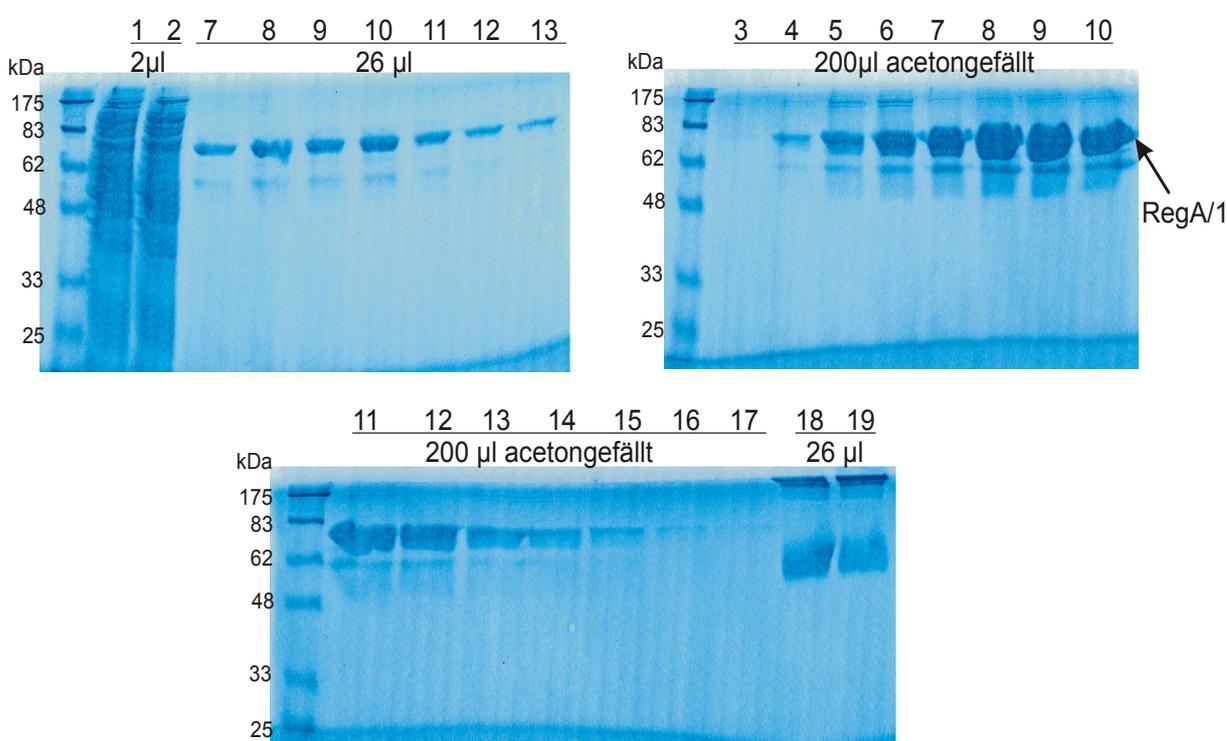


Abb. 23. **SDS-PAGE zur Überprüfung der RegA/1-Reinigung mittels *IMPACT*-Methode.** Die Fraktionen und aufgetragene Volumina sind angegeben, einige wurden mit Aceton gefällt, um das Auftragsvolumen zu verringern. Die Spuren wurden wie folgt beladen: 1, induzierte Zellen; 2, Durchlauf nach dem Auftrag des Gesamtextraktes; 3-7, 5 ml Fraktionen des Durchlaufs während des DTT-Auftrags; 8-17, 5 ml Fraktionen der Elution; 18, 19, 5 ml Fraktionen nach Inkubation der Chitinmatrix mit 1 % SDS. RegA/1 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Standardmarker und –größen sind links gezeigt.

Ein Teil des RegA/1-Proteins wurde schon während des DTT-Auftrags auf die Säule eluiert (Abb. 23/4-7). Der Hauptanteil wurde nach der ÜN-Inkubation mit DTT vollständig vom Intein-tag abgetrennt und eluiert (Abb. 23/8-16). Die geringe Mobilität von RegA/1, die ein ca. 70 kDa-Protein (statt 44 kDa) vortäuscht, konnte später in *Western*-Analysen bestätigt

werden. Außerdem trat in den Eluaten eine zweite 60 kDa-Bande auf (Abb. 23/4-13), allerdings deutlich schwächer als die RegA/1-Bande. Diese Bande, bei der es sich vermutlich um das *E. coli*-Chaperon GroEL handelt, konnte durch Zugabe von 2 mM ATP zum Waschpuffer (Lissin et al., 1990; Viitanen et al., 1990) und durch Erniedrigung der Wachstumstemperatur nach der IPTG-Induktion von 16 °C auf 14 °C eliminiert werden (Abb. 24).

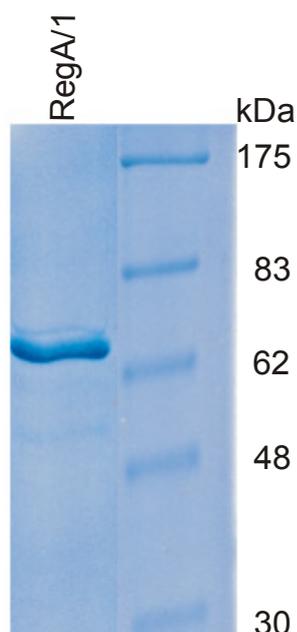


Abb. 24. **SDS-PAGE mit gereinigtem RegA/1**. Es wurde 1 µg Protein aufgetragen. Rechts ist der Größenstandard gezeigt.

Der Intein-CBD-*tag* und möglicherweise nicht gespaltenes Fusionsprotein konnte nach Inkubation der Chitinmatrix mit 1 % SDS abgespalten und eluiert werden. Die so erhaltenen Fraktionen (Abb. 23/18, 19) zeigten Intein zusammen mit der CBD (55 kDa), nicht aber das gesamte Fusionsprotein (ca. 99 kDa). Dieser Befund wies auf eine vollständige Abspaltung des RegA/1-Proteins vom Intein durch DTT hin. Das Teilfragment RegA/1 (Abb. 24) wurde anschließend zur Antikörperherstellung verwendet (4.2.2.1).

4.2.1.1.2 Expression von *regA/2*

Das Teilstück *regA/2* ist 1059 bp lang und deckt den kodierenden Bereich zwischen den Positionen 1156 und 2214 ab (Abb. 22). Expression und Reinigung von RegA/2 erfolgten wie zuvor (4.2.1.1.1). Die berechnete Größe von RegA/2 beträgt 39 kDa.

Wie bei RegA/1 begann die Abspaltung des Proteins vom Intein schon während des DTT-Auftrags, aber die eluierte Menge war geringer als bei RegA/1 (Abb. 25/8, 9). RegA/2 zeigte in der SDS-PAGE ebenfalls eine Laufanomalie, die einem 45 kDa-Protein (statt 39 kDa) entsprach. In den konzentrierten, acetongefällten Fraktionen wurde deutlich, daß neben RegA/2 (Abb. 25/Pfeil) zusätzliche Banden auftraten, deren Mobilität sich z.T. nur

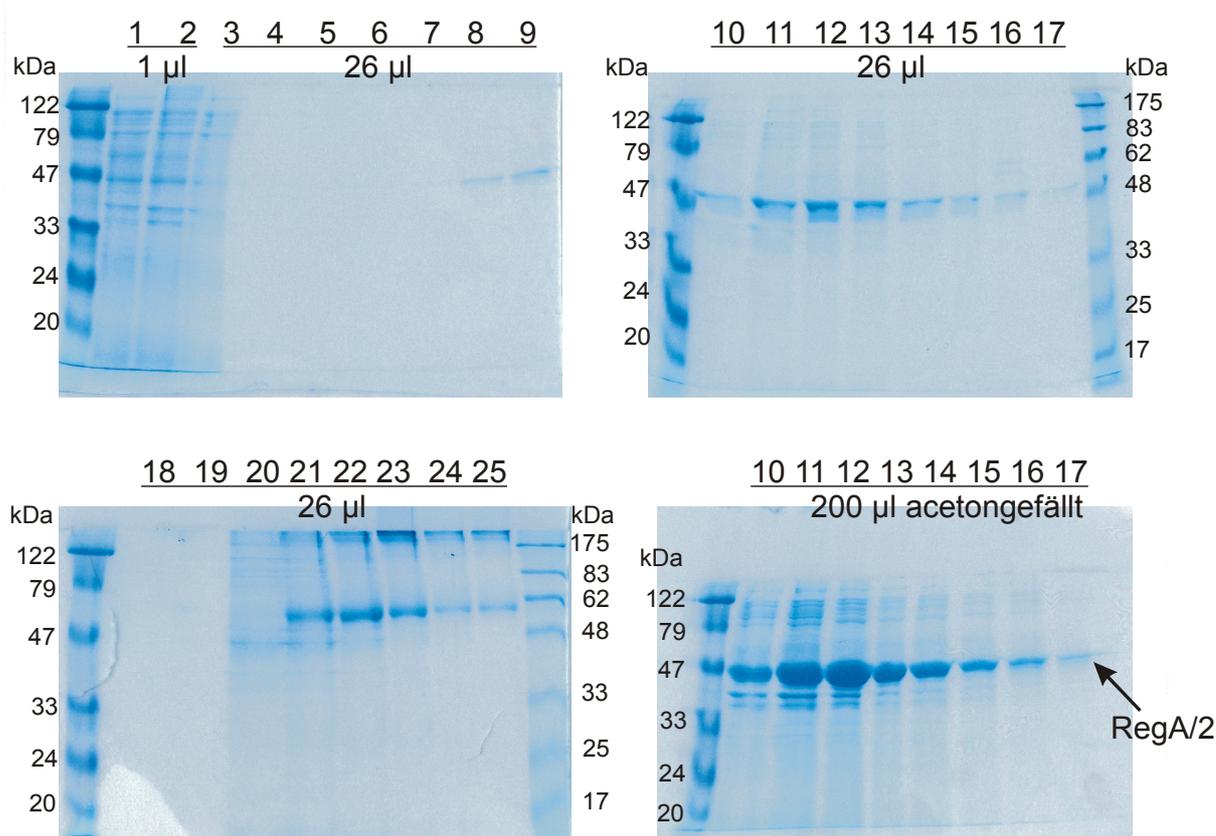


Abb. 25. **SDS-PAGE zur Überprüfung der RegA/2-Reinigung mittels *IMPACT*-Methode.** Die Fraktionen und aufgetragene Volumina sind angegeben, einige wurden mit Aceton gefällt, um das Auftragsvolumen zu verringern. Die Spuren wurden wie folgt beladen: 1, lösliche Fraktion nach Zellaufschluß; 2, nicht-lösliche Fraktion nach Aufschluß; 3, 4, Waschschrte ; 5-9, 5 ml Fraktionen des Durchlaufs während des DTT-Auftrags; 10-17, 5 ml Fraktionen der Elution; 18-25, 5 ml Fraktionen nach Inkubation der Chitinmatrix mit 1 % SDS. RegA/2 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Standardmarker und –größen sind gezeigt.

geringfügig von RegA/2 unterschied (Abb. 25/10-17). Diese Verunreinigungen ließen sich auch durch Veränderung der Waschbedingungen, wie z.B. durch die Zugabe von Tween 20, nicht eliminieren. Die Eluate nach SDS-Inkubation (Abb. 25/18-25) zeigten, daß RegA/2 nahezu vollständig von Intein-CBD abgetrennt wurde.

Das RegA/2-Protein ließ sich gut exprimieren, konnte aber durch *IMPACT*-Reinigung nicht ohne kontaminierende Proteine gewonnen werden. Es wurde deshalb nicht zur Antikörperherstellung eingesetzt.

#### 4.2.1.1.3 Expression von *regA/3*

Das Fragment *regA/3* ist 957 bp lang und deckt den Bereich zwischen den Positionen 2194 und 3150 des kodierenden Bereichs von *regA* ab (Abb. 22). Die abgeleitete Peptidsequenz zeichnet sich u.a. durch ausgedehnte Glutamin-, Glutamat- und Alanin-Wiederholungen aus (Kirk et al., 1999). Die entsprechenden Triplet-Wiederholungen beeinträchtigen die korrekte Amplifikation durch PCR und die Sequenzierung. Deshalb wurden weitere Experimente zur Expression dieses Teilstücks ausgesetzt, zumal das reine RegA/1-Polypeptid für die Gewinnung eines spezifischen Antiserums zur Verfügung stand.

#### 4.2.1.2 Expression von RegA mit dem Baculovirus-Insektenzell-System

Die Expression des kompletten RegA-Proteins ist für eine erfolgreiche Suche nach Bindepartnern von RegA unabdingbar. Außerdem könnte ein polyklonaler Antikörper, der alle Bereiche des Proteins erkennt und somit im Gegensatz zu den Peptidantikörpern Anti-6kDa-Ak und Anti-RegA/1-Ak (4.2.2.1) universeller einsetzbar ist, hergestellt werden. Zur rekombinanten Expression des kompletten RegA-Proteins wurde das Baculovirus-Expressions-System gewählt.

In diesem eukaryontischen Expressionssystem werden rekombinante Viren verwendet, deren Wirtsspektrum auf Insektenzellen beschränkt ist. Die gentechnisch veränderten Baculoviren (3.2.6) ermöglichen eine effiziente heterologe Genexpression in Insektenzellen. Als Vehikel für den Gentransfer wird das *Autographa californica Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcMNPV, Baculovirus) eingesetzt, das die für Expressionszwecke verwendeten Insektenzellen, wie z.B. die der Schmetterlingsart *Trichoplusia ni*, infizieren kann. Für die Konstruktion rekombinanter Viren werden Vektoren verwendet, die in *E. coli* propagiert werden können. Das zu exprimierende Gen steht meist unter der Kontrolle des starken viralen Polyhedrin-Promotors. Dieser Transfervektor wird zusammen mit infektiöser, meist linearer

Wildtyp-Virus-DNA in Insektenzellen eingebracht. Die Integration des heterologen Gens ins virale Genom erfolgt durch *in vivo*-Rekombination über virale Abschnitte im Transfervektor (Abb. 9). Vorteile bestehen in der Option, authentisches Protein mit allen eukaryotischen Modifikationen zu erhalten.

Zur Herstellung rekombinanter Baculoviren wurde der kodierende Bereich (Abb. 22, 3147 bp) des *regA*-Gens in den Transfervektor pAcSG-His-NT B (Tab. 2) kloniert, wodurch das Plasmid pAcSG-111 (Tab. 2) entstand. Mit diesem Plasmid wurde eine Transfektion (3.2.6) durchgeführt und die daraus resultierenden rekombinanten Viren einer Amplifikation unterzogen (3.1.5), bis ein ausreichender Virustiter erreicht wurde (Eschenwecker, 2000).

Zur Expression und Isolierung des RegA-HIS-Proteins wurden *High Five*<sup>TM</sup>-Insektenzellen mit den rekombinanten Viren infiziert (3.3.2.1). Als indirekte Kontrolle der Infektion und Expression wurde der Catechol-Test mit positivem Ergebnis durchgeführt (3.2.6.2). Die infizierten Zellen sollten ein RegA-Protein mit aminoterminalen His-tag produzieren. Nach deren Lyse unter nativen Bedingungen (3.3.2.3) wurde mittels Affinitätschromatographie (3.3.2.4), für die eine HiTrap NHS-aktivierte Säule mit 1 mg des gereinigten Anti-6kDa-Ak beladen wurde (3.3.2.4.1), aus dem Proteingestamtextrakt das RegA-HIS-Protein gereinigt und die Fraktionen der Elution mittels SDS-PAGE und *Western*-Analyse mit dem Anti-6kDa-Ak überprüft (Abb. 26).

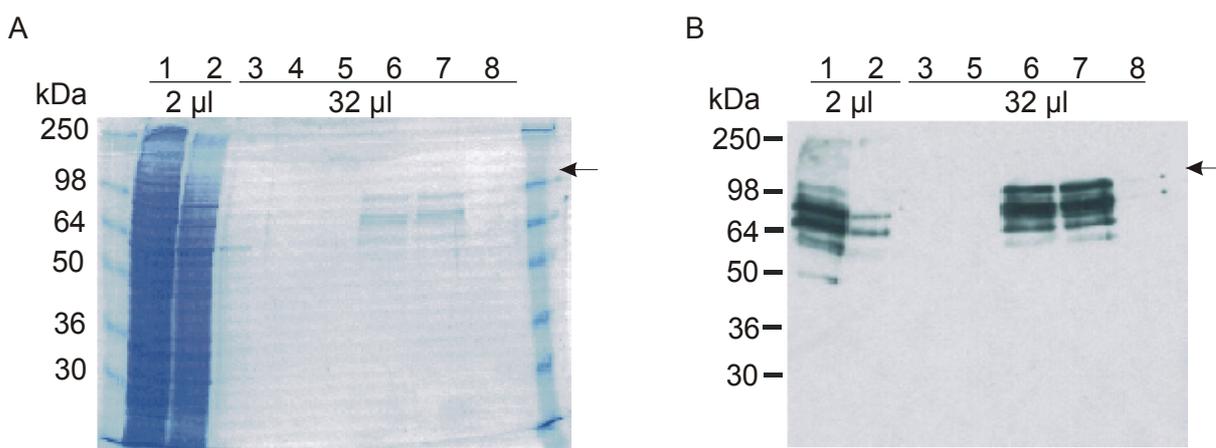


Abb. 26. **SDS-PAGE und Western blot der RegA-HIS-Reinigung mittels Affinitätschromatographie.** Die Fraktionen und aufgetragene Volumina sind angegeben. A, Fraktionen der Affinitätsreinigung: 1, Gesamtprotein; 2, Durchlauf während des Proteinauftrags; 3, 4, Waschschrte mit PBS; 5-8, Fraktionen der Elution. Pfeile: erwartete Mobilität von RegA-HIS. Links: Größenstandard. B, *Western*-Analyse von A mit Anti-6kDA-AK.

Das RegA-HIS-Protein konnte in sehr sauberer Form, wenn auch nicht vollständig von den Insektenzellen synthetisiert, gereinigt werden. Die hier beobachteten Translationsabbrüche sind meist auf die v.a. im letzten Drittel der *regA*-Sequenz auftretenden Tripletts-Wiederholungen (Prolin: CCG, Glutamin: CAA und CAG; Anhang 8.2) zurückzuführen, weil diese Tripletts in *T. ni* deutlich seltener benutzt werden als in *V. carteri* (Kane, 1995; Novy et al., 2001). Dieses Polypeptidgemisch deckte den bisher größten Teil des RegA-Proteins ab und wurde deshalb ebenfalls zur Antikörper-Herstellung verwendet.

#### 4.2.2 Herstellung von Anti-RegA-Antikörpern

Für *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen der regulatorischen Funktion von RegA wäre ein hochspezifischer Anti-RegA-Antikörper höchst wünschenswert. Eine empfindliche „Sonde“ für RegA-verwandte Proteine wäre ferner ein willkommenes Instrument zur Analyse phylogenetischer Verwandtschaften zwischen verschiedenen Spezies von *Volvox* und könnte möglicherweise Aufschluß geben über die Verbreitung des RegA-Regulationsprinzips innerhalb der verschiedenen *Volvox*-Linien (Kirk, 1998; Schmitt et al., 1998). Der zunächst hergestellte Anti-6kDa-Ak (Eschenwecker, 2000; Jakobiak, 1999) war zur Detektion rekombinant exprimierten RegA-Proteins geeignet, nicht aber zum Nachweis kleiner Mengen in *V. carteri*-Extrakten. Hier wurde daher das RegA/1-Protein (4.2.1.1.1) und durch Expression im Baculovirus-Insektenzell-System gewonnene RegA-Fragmente (4.2.1.2) als Basis für die Gewinnung spezifischer Antiseren herangezogen.

##### 4.2.2.1 Herstellung und Reinigung des Anti-RegA/1-Antikörpers

Das RegA/1-Fragment (4.2.1.1.1), wurde zur Immunisierung (Pineda Antikörper Service, Berlin) von zwei Kaninchen eingesetzt. Die eine Hälfte des RegA/1-Proteins sollte in nicht-denaturierter Form eingesetzt werden. Dazu wurde es gegen 20 mM HEPES, 500 mM NaCl und sinkenden DTT-Konzentrationen dialysiert, um das DTT in 5 mM-Schritten bis auf 5 mM abzusenken und das Ausfallen des Proteins zu vermeiden. Eine geringe Menge fiel trotzdem aus und wurde vor der Immunisierung abgetrennt. Parallel dazu wurde die andere Hälfte mit Aceton gefällt und in PBS/0,5% SDS in denaturierter Form aufgenommen. Zur Immunisierung wurde jeweils 1 mg Protein verwendet.

Die gewonnenen Rohseren wurden in *Western*-Analysen mit verschiedenen *V. carteri*-Stämmen überprüft. Die Transformante A2-12 zeichnet sich durch ca. 30 *regA*-Kopien im

Genom aus (Abb. 43), die zu 40mal mehr *regA*-Transkript in den Algen führen (Abb. 45). Somit sollte die RegA-Proteinmenge im Gesamtzellextrakt dieser Alge ebenfalls um ca. das 40fache erhöht sein. Außerdem enthalten die transgenen *regA*-Kopien einen HA-tag. Mit dessen Hilfe konnte in *Western*-Analysen die Expression und die geringere Mobilität (135 kDa statt 111 kDa) von RegA bereits gezeigt werden (Kirk et al., 1999). Das Rohserum gegen das nicht-denaturierte Antigen zeigte keine Banden in der erwarteten Größe (nicht gezeigt).

Die *Western*-Analyse mit dem Anti-RegA/1-Rohserum gegen das denaturierte Antigen zeigte, daß dieser im A2-12-Proteinextrakt eine Bande bei etwa 135 kDa erkannte (Abb. 27), die weder in der Negativkontrolle *V. carteri* 153-68- noch im wildtypischen HK10-Extrakt zusehen war. Bei den Banden unterhalb 60 kDa handelt es sich um Kreuzreaktionen des Rohserums. In der Spur RegA/1 wurde das verwendete Antigen als Positivkontrolle aufgetragen und auch erkannt.

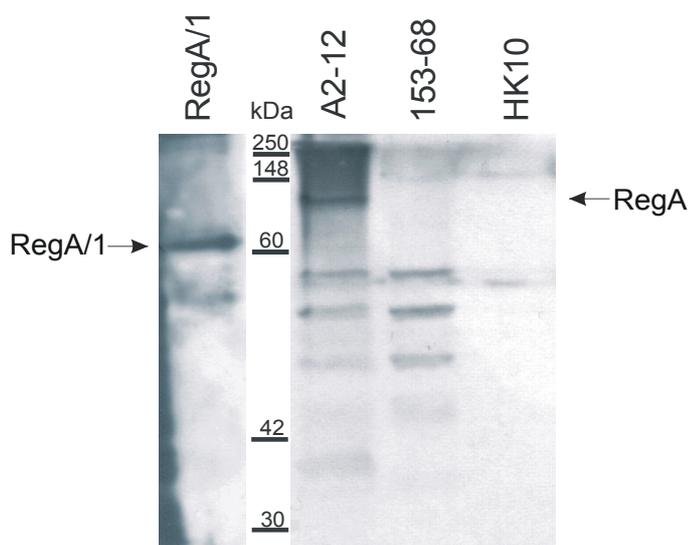


Abb. 27. **Western-Analyse mit Anti-RegA/1-Rohserum.** Die Proteingestamtextrate (jeweils 60 µg) der angegebenen *V. carteri*-Stämme und 1 µl des RegA/1 Proteins wurden zur Detektion eingesetzt. Pfeile markieren die jeweils erwarteten Größen. Der Größenstandard ist angegeben. Der Film wurde 30 min exponiert, ausgenommen Spur RegA/1, die 1 min exponiert wurde.

Der Antikörper wurde unter Verwendung des rekombinant exprimierten RegA/1-Proteins affinitätsgereinigt (3.3.3), um die kreuzreagierenden Bestandteile zu entfernen. Nach der Reinigung wurde eine *Western*-Analyse mit Proteinextrakten einiger Transformanten der AUG-Mutagenesen (4.3), sowie mit den in der *Western*-Analyse der Abb. 27 verwendeten *V. carteri*-Stämmen durchgeführt (Abb. 28). Die AUG-Transformanten entstanden durch Transformation der RegA-Mutante 153-68 mit in der 5'NTR des *regA*-Gens mutierten pVcRegA1-Plasmiden. Sie zeigten alle den WT-Phänotyp und exprimierten somit das RegA-Protein.

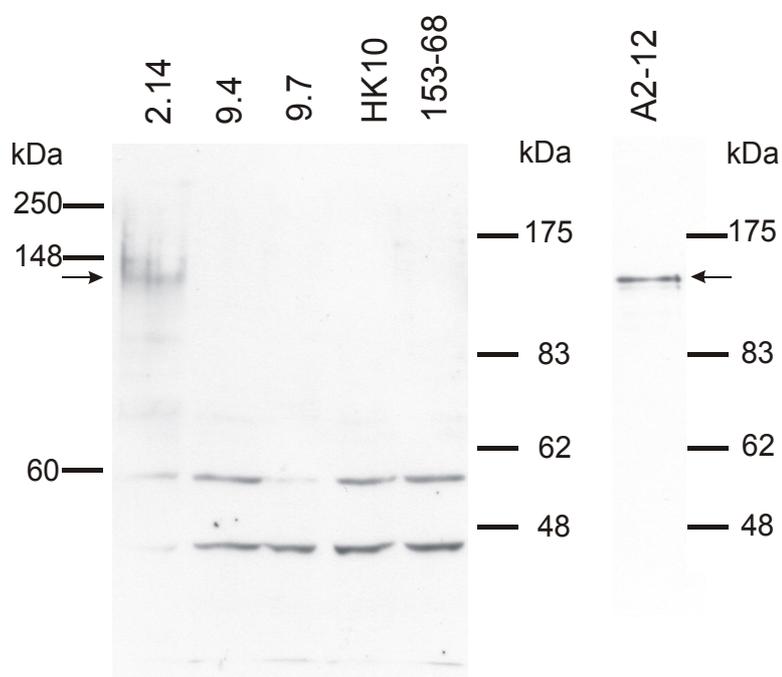


Abb. 28. **Western-Analyse zur Überprüfung des gereinigten Anti-RegA/1-Ak.** Die Proteingesamtextrakte (jeweils 60 µg) der angegebenen *V. carteri*-Stämme wurden hybridisiert. Die Pfeile markieren die erwartete Größe von RegA. Der Größenstandard ist angegeben. Der Film wurde 60 min exponiert, ausgenommen Spur A2-12, die 2 min exponiert wurde. 2.14 und A2-12 sind Transformanten mit hohen *regA*-Kopienzahlen.

Bei dieser Analyse konnte zum erstenmal außer in A2-12-Extrakten in einem weiteren Extrakt (Abb. 28/2.14) das RegA-Protein nachgewiesen werden. Allerdings konnte der Anti-RegA/1-Ak das RegA-Protein im WT-Stamm HK10 nicht detektieren. Die Kreuzreaktionen konnten zugunsten der RegA-Bande deutlich reduziert, aber nicht völlig eliminiert werden.

#### 4.2.2.2 Herstellung und Reinigung des Anti-RegA-Antikörpers

Insgesamt konnten mit dem Baculovirus-Insektenzell-System 900 µg RegA-HIS-Protein gewonnen (4.2.1.2) und zur Immunisierung von zwei Kaninchen eingesetzt (Pineda Antikörper Service, Berlin) werden. Die beiden Rohseren wurden mit verschiedenen *V. carteri*-Proteinextrakten getestet (in Abb. 29/A und B nur für ein Rohserum gezeigt).

In der Analyse konnten neben etlichen Kreuzreaktionen, die in allen Spuren in ähnlicher Weise auftraten, nur in den Spuren des A2-12-Extraktes die erwartete Bande bei ca. 135 kDa detektiert werden, nicht aber im HK10-Extrakt. Im Proteinextrakt der  $\Delta regA$ -Mutante (153-68), der als Negativkontrolle verwendete wurde, konnte, wie erwartet, keine RegA-Bande detektiert werden. Das zweite Rohserum zeigte die gleichen Eigenschaften und wird hier nicht gezeigt.

Durch eine Reinigung mittels einer Affinitätssäule (3.3.2.4) der beiden Rohseren wurde versucht, die kreuzreagierenden Antikörper zu entfernen und die gewünschten IgGs anzukonzentrieren. Die nun erhaltenen Ak-Extrakte wurden erneut zu *Western*-Analysen eingesetzt (Abb. 29/C und D).

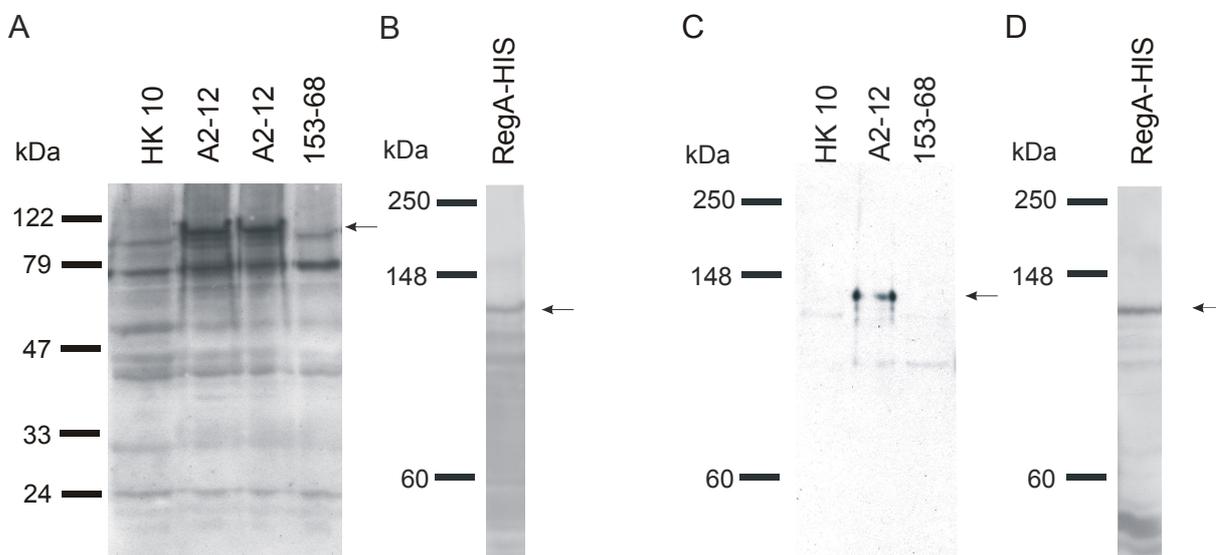


Abb. 29. **Western-Analyse zur Überprüfung des Anti-RegA-Rohserums (A und B) und des gereinigten Anti-RegA-Ak (C und D).** Es wurden jeweils 60 µg Proteingesamtextrakt der angegebenen *V. carteri*-Stämme und 1 µg RegA-HIS (4.2.1.2) eingesetzt. Die Pfeile markieren die erwartete Größe von RegA. Der Größenstandard ist angegeben.

Die Kreuzreaktionen konnten nahezu eliminiert werden. Das RegA-Protein konnte allerdings weiterhin nur im A2-12-Extrakt detektiert werden. Vermutlich ist im Zellextrakt von HK10 zu wenig RegA-Protein vorhanden, um es mit dem Anti-RegA-Ak detektieren zu können.

Somit stehen zwei polyklonale Anti-RegA-Antiköperseren (Anti-RegA/1-Ak und Anti-RegA-Ak) zur Verfügung, die, bei genügender RegA-Konzentration im Gesamtzellextrakt, RegA auch in *V. carteri*-Stämmen detektieren können.

### 4.3 Untersuchung der 5'NTR auf Kontrollelemente der *regA*-Genexpression

Der *regA*-Genlocus enthält eine 5'NTR mit (fast) fünf nicht-kodierenden Exons und vier Introns (Abb. 30). Hat diese Region eine Bedeutung für die Kontrolle der *regA*-Genexpression? Bisher ist bekannt, daß Intron 3 (wie auch Intron 5) ein *enhancer*-Element enthält, das essentiell ist für die Transkription von *regA* (Stark et al., 2001). Darüber hinaus enthält die 5'NTR acht ATG-Triplets mit drei größeren und fünf kleineren offenen Leserahmen (Abb. 31), denen eine Rolle in der Feinkontrolle der *regA*-Translation zukommen könnte. Diese offene Frage wurde mit zwei Deletionen in der 5'NTR, einer systematischen Mutagenese der einzelnen AUG-Codons und mit der Einführung von *nonsense*-Mutationen in bestimmte ORFs angegangen. Als empfindliches Testsystem diente die *in vivo*-Komplementationsanalyse eines defekten *regA*-Gens, deren Erfolg anhand der veränderten Morphologie der Kugelalge abgelesen werden konnte.

Der 12,5 kb-*regA*-Genlocus (Abb. 30) enthält 8 Exons und 7 Introns, sowie eine 940 bp-5'NTR und eine 2635 bp 3'NTR. Sein Promotorbereich ist 42 bp lang. Das 111 kDa-*regA*-Genprodukt wird in Exon 5 (3' Ende, ATG 9) bis Exon 8 kodiert. Die Zuordnung von ATG9 als Translationsstart beruht darauf, daß hier das offene Leseraster von *regA* beginnt. Die stromaufwärts positionierten Exons 1 bis 5 sind nach früheren Befunden stumm (Stark et al., 2001). Ihre potentielle Rolle in der Feinsteuerung der Translation wurde dagegen schon bald postuliert (Stark & Schmitt, 2002). Mit dem *enhancer*-Element in Intron 3 wurde der 5'NTR bereits eine zentrale Kontrollfunktion zugeordnet (Stark et al., 2001).

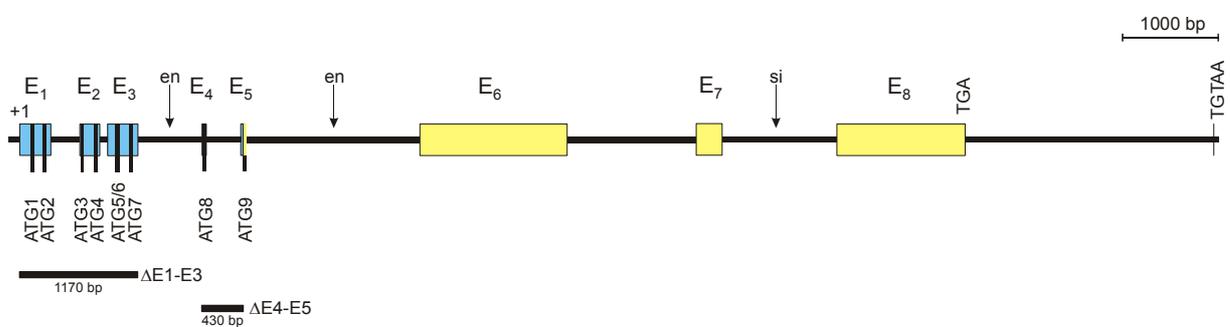


Abb. 30. Karte des *regA*-Genlocus (pVcRegA1, wie Abb. 5) mit zwei *enhancer*- (en) und einem *silencer*-Element (si) sowie den Positionen von zwei Deletionen ( $\Delta$ E1-E3;  $\Delta$ E4-E5).



Die ersten zehn AUGs und ihre Sequenzumgebungen wurden nach den modifizierten Kozak-Kriterien bewertet und eine Reihung nach der Übereinstimmung mit dem Konsensus vorgenommen (Tab. 13). Es wurde jede Übereinstimmung gezählt. Stimmt die beiden Positionen -3 und +4 (Tab. 13, rot), wurde dies zusätzlich gewertet.

Tab. 13. **Klassifizierung der 10 ersten AUG-Codons in der *regA*-mRNA nach Sequenz-übereinstimmung mit der Kozak-Umgebung.**

Startcodon	Kozak-Sequenz	Bewertung <sup>1</sup>	ORF
	M <u>AM</u> MA <u>U</u> GC <sup>2</sup>	6++	
AUG2	<b>AGCA</b> <u>AUGGC</u> <sup>3</sup>	5+	142 AS
AUG10	<b>AGAC</b> <u>AUGCC</u>	4	1016 AS
AUG7	<b>CGUU</b> <u>AUGGC</u>	4	6 AS
AUG9	<b>CUUC</b> <u>AUGGA</u>	3+	1049 AS
AUG3	<b>AGCA</b> <u>AUGCU</u>	3	6 AS
AUG5	GC <b>AAA</b> <u>AUGUC</u>	3	23 AS
AUG6	<b>CCCG</b> <u>AUGGG</u>	2+	13 AS
AUG1	<b>AGGC</b> <u>AUGCG</u>	2	14 AS
AUG4	<b>CCUU</b> <u>AUGCC</u>	2	2 AS
AUG8	<b>ACCU</b> <u>AUGUA</u>	2	1 AS

<sup>1</sup> Zahl der Übereinstimmungen

<sup>2</sup> Konsensus; M = A oder C; rote Basen werden als 1+ gewertet

<sup>3</sup> Übereinstimmung mit Konsensus in Fettdruck

Die Liste (Tab. 13) gibt eine klare Reihenfolge der Qualität der AUG-Codons im Hinblick auf ihre Eignung als Translationsstart: AUG2 und AUG10 rangieren an der Spitze, gefolgt von AUG9. Dies sind auch die Starts mit den längsten ORFs (Tab. 13). Während AUG9 und AUG10 beide im *regA*-Leserahmen liegen, folgt auf AUG2 ein eigener 426 bp ORF (ORF2) in einem unabhängigen Raster; ORF2 überlagert ORF3 bis ORF6 (Abb. 31), die dadurch möglicherweise keine Bedeutung haben, ähnlich wie die sehr kurzen ORF7 und ORF8. Wie

die folgenden Experimente zeigen, ist diese Einschätzung gerechtfertigt, so daß AUG2 (und AUG1) das größte Gewicht in der 5'NTR zufällt.

### 4.3.1 Ein empfindlicher Komplementationstest

Extrakte von WT *V. carteri* HK10 enthalten solch geringe Mengen an RegA-Protein, daß es bisher nicht gelang, sie immunologisch zu detektieren (4.2.2). Lediglich in der Transformante A2-12 mit mehr als 30 *regA*-Kopien (Tab. 19) gelang es, sowohl das HA-markierte Protein mit Anti-HA (Kirk et al., 1999) als auch mit Anti-RegA-Antiseren (Abb. 28, Abb. 29) zu detektieren. Deshalb wurde hier ein empfindlicher biologischer Test eingesetzt (Stark et al., 2001), der auf der Komplementation des defekten *regA*-Gens (*regA*Δ; mit einer 281 bp Deletion) von *V. carteri* 153-68 (Rezipient) beruht. Die Transformation (3.2.5) dieser RegA-Mutante mit intaktem *regA* führt zum morphologisch unterscheidbaren WT; bei Transformationen mit defektem *regA* bleibt dagegen die RegA-Morphologie erhalten. Das Testsystem wird in Abb. 32 veranschaulicht.

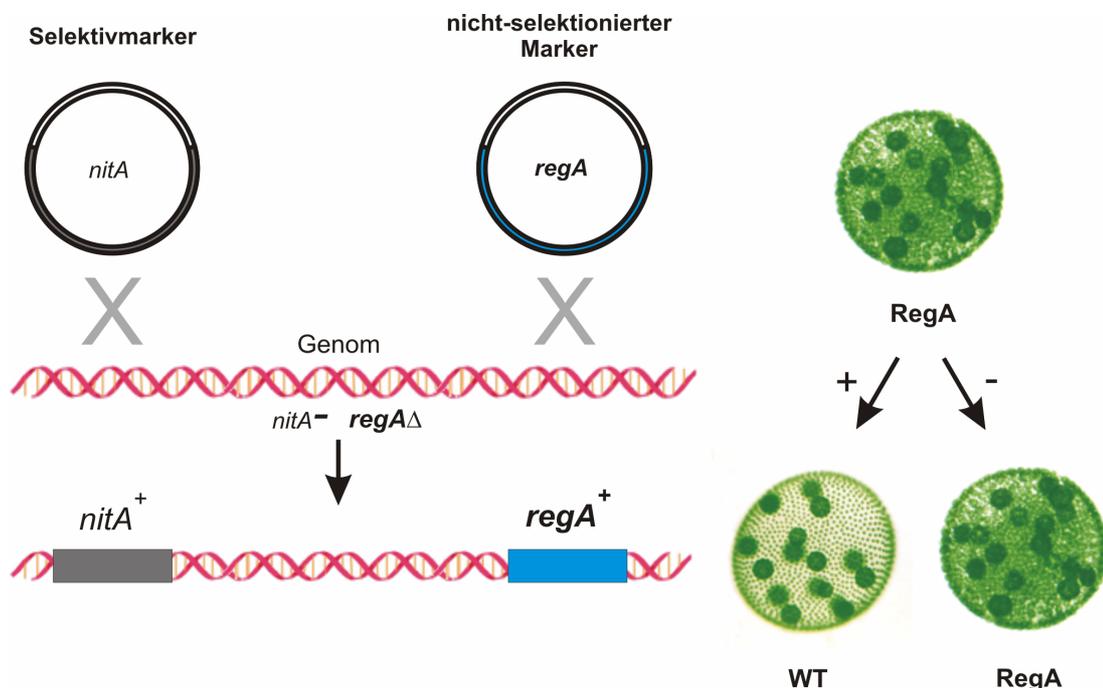


Abb. 32. **Prinzip eines Komplementationstests bei *V. carteri*.** Die *Volvox*-Mutante 153-68 (*nitA<sup>-</sup>regAΔ*) wurde mit einem selektiven (*nitA*) und einem nicht-selektiven (*regA*) Plasmid cotransformiert. Letzteres enthielt die zu testenden *regA*-Mutationen. Cotransformanten wurden durch PCR der transgenen *regA*-Sequenz bestätigt. Unter diesen determiniert das Verhältnis der Phänotypen WT/RegA die Funktionsfähigkeit (= Komplementationsfähigkeit) der transgenen *regA*-Varianten.

Unter den resultierenden Cotransformanten wurde für jedes der *regA*-Konstrukte das Komplementationsvermögen bestimmt. Die Cotransformations-Häufigkeit von unselektierten Markern, wie des klonierten *regA*-Gens, liegt zwischen 30% und 80% (Schiedlmeier et al., 1994). Ausgehend vom Plasmid pVcRegA1, das den nativen *regA*-Genlocus trägt und als Positiv-Kontrolle für alle Cotransformationen diente, wurden von M. Lichtinger Deletionen der Exons 1-3 und der Exons 4-5 (Abb. 30) sowie in dieser Arbeit elf Punktmutationen (4.3.3, 4.3.4) entweder zur Substitution von ATG-Codons (ATG → TGG) oder zur Generierung von Stopp-Codons (4.3.4, 4.3.5, 4.3.6.3) eingeführt. Mit jedem dieser Konstrukte wurden mindestens 24 unabhängige Cotransformanten hergestellt, ihre Identität mittels PCR überprüft und danach ermittelt, mit welcher Häufigkeit der Wildtyp-Phänotyp wiederhergestellt wurde. Dies gilt als quantitatives Maß für die Funktionsfähigkeit (+) bzw. -unfähigkeit (-) des eingesetzten *regA*-Konstrukts (Stark et al., 2001).

#### 4.3.2 Analyse von zwei Deletionen in der 5'NTR von *regA*

Zwei von M. Lichtinger hergestellte Deletionen, die erstens die Exons 1 bis 3 einschließlich der Introns 1 und 2 (1170 bp) und zweitens die Exons 4 und 5 (bis ATG 9) einschließlich Intron 4 (430 bp) umfaßten (Abb. 30), wurden zunächst in den Test eingesetzt. In beiden Fällen blieben das 5' Promotorende (42 bp) und Intron 3 mit seinem *enhancer*-Element intakt (Stark et al., 2001), um die normale Transkriptionsfähigkeit zu erhalten. *V. carteri* 153-68 wurde mit jedem dieser pVcRegA1-Derivate (Tab. 2) zusammen mit pVcNR15 (Tab. 2) cotransformiert und die Morphologie der Transformanten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 14 zusammengefaßt (M. Lichtinger, pers. Mitteilung).

Während das native *regA*-Gen (A1; Positiv-Kontrolle) bei 17 von 31 (55%) Cotransformanten den Wildtyp-Phänotyp wiederherstellte, waren es bei den *regA*-Deletionen (Abb. 30)  $\Delta E1-E3$  0 von 33 (0%) und bei  $\Delta E4-E5$  17 von 39 (44%). Folglich enthält die Deletion der Exons 1 bis 3 ( $\Delta E1-E3$ ) für die *regA*-Genexpression entscheidende Sequenzinformation(en), die zweite Deletion ( $\Delta E4-E5$ ) dagegen nicht.

Tab. 14. Komplementation von *regA*Δ (*V. carteri* 153-68) mit WT *regA* und zwei verschiedenen Deletionskonstrukten (Abb. 30).

	A1 <sup>1</sup>	ΔE1-E3	ΔE4-E5
WT/Gesamt <sup>2</sup>	17/31	0/33	17/39
WT-Anteil in % <sup>3</sup>	55	0	44
% A1 <sup>4</sup>	100	0	80
Komplementation	+	-	+

<sup>1</sup> WT *regA*

<sup>2</sup> Verhältnis von Cotransformanten mit WT-Charakter zur Gesamtzahl der Cotransformanten

<sup>3</sup> Anteil der Cotransformanten mit WT-Charakter an der Gesamtzahl der Cotransformanten

<sup>4</sup> Anteil der Cotransformanten mit WT-Charakter relativ zur WT-Kontrolle A1 (100 %)

### 4.3.3 Bedeutung der ATG-Triplets in der 5’NTR

Kozak (2002) postulierte, daß AUG-Codons stromaufwärts vom AUG-Translationsstart eine funktionale Rolle beim *ribosome scanning* spielen, da normalerweise das erste Startcodon auf der mRNA vom Initiationskomplex der Translation erkannt wird. Dieser Komplex erkennt nicht nur das AUG sondern auch dessen Umgebung, die Kozak-Sequenz. Je mehr Abweichung dieser Bereich von der Konsensussequenz zeigt, um so schwieriger wird es für den Initiationskomplex, das Startcodon zu erkennen. Wird ein solches *upstream* AUG überlesen, spricht man vom *leaky scanning*. Ein Vergleich der Sequenzumgebungen der 10 AUG-Codons auf der *regA*-mRNA (Tab. 13) zeigt, daß keine der Kozak-Konsensussequenz völlig entspricht und somit der Mechanismus des *leaky scanning* bei der Translationskontrolle von *regA* auftreten könnte. Das offene *regA*-Leseraster beginnt mit AUG9. Ferner könnte der sogenannte Reinitiations-Mechanismus bei der Überbrückung der 5’NTR eine Rolle spielen. Bei diesem Vorgang wird ein kurzer ORF (etwa 12 AS) translatiert (Kozak, 2002). Nach erfolgter Translation dissoziiert die 40S-Ribosomenuntereinheit nicht von der mRNA, sondern läuft weiter und kann, wenn sie erneut mit allen nötigen Initiationsfaktoren beladen wird, mit der Translation beim nächsten AUG wieder starten. Dieser Prozess kann sogar nach vier *upstream* gelegenen ORFs noch stattfinden (Wang & Rothnagel, 2004). Dieser Mechanismus könnte bei den Startcodons 1, 3, 6 und 7 (Abb. 31, Tab. 13) greifen.

Von den 8 AUG-Codons vor dem aktuellen Translationsstart AUG9 (Kirk et al., 1999) liegen 7 in den ersten drei Exons (Abb. 30). Diese Triplets ATG1-ATG7, ausgenommen ATG4, wurden zu TGG-Triplets mutiert und deren Komplementationsfähigkeit getestet, um den Einfluß jedes einzelnen AUG auf die *regA*-Translation zu untersuchen. In gut untersuchten Beispielen verbesserte das Ausschalten von *upstream* AUG-Codons und ORFs häufig die Expression der kodierten Gene (Arrick et al., 1991; Marth et al., 1988). Im *regA*-Fall sollten *leaky scanning* oder Reinitiation folglich den WT-Anteil im Vergleich wegen besserer Komplementationsraten erhöhen.

Welche Resultate wurden tatsächlich erhalten, wenn einzelne ATG-Mutationen in den Komplementationstest (Abb. 32) eingesetzt wurden? Die getesteten Konstrukte sind in Abb. 33 mit den jeweiligen Mutationen dargestellt.

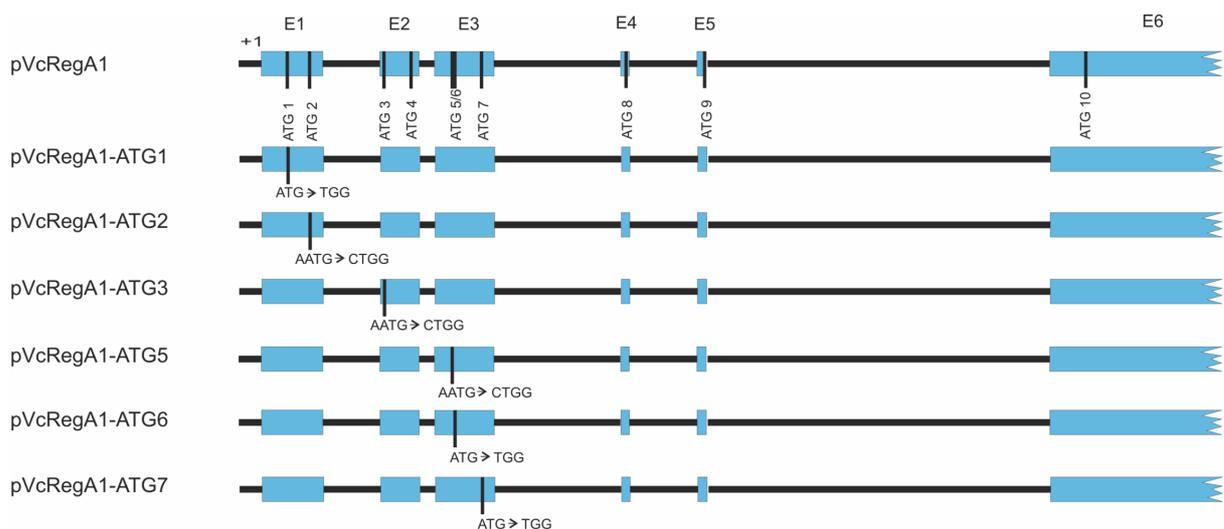


Abb. 33. Wildtyp *regA* (pVcRegA1) und 6 Punktmutationen, die auf ihre Fähigkeit zur Komplementation von *V. carteri* 153-68 (Reg) getestet wurden. Gezielte Mutationen einzelner ATG-Triplets sind angegeben. Symbole wie in Abb. 30.

Tab. 15. Komplementation von *regA*Δ (Stamm 153-68) mit einzelnen ATG-Mutationen (Abb. 33)<sup>1</sup>.

	A1	ATG1	ATG2	ATG3	ATG5	ATG6	ATG7
WT/Gesamt	17/31	3/25 (2) <sup>2</sup>	5/26	14/31	8/24 (1)	10/25	13/30 (1)
WT-Anteil in %	55	12	19	45	33	40	43
% A1	100	22	35	82	60	73	78
Komplementation	+	+	+	+	+	+	+

<sup>1</sup> Kriterien und Beschreibung wie Tab. 14

<sup>2</sup> M-Reg-Phänotypen unter den WT-Phänotypen sind in Klammern angegeben.

Die Cotransformationsexperimente (Tab. 15) ergaben folgendes Bild: Alle Konstrukte waren in der Lage den WT-Phänotyp wieder herzustellen. Allerdings trat keine Erhöhung des WT-Anteils ein, wie er bei den Mechanismen *leaky scanning* und Reinitiation erwartet worden wäre, sondern alle AUG-Mutationen riefen eine Verringerung der Komplementationsrate um 22 bis 78 % relativ zur WT-Kontrolle hervor. Die Startcodons 3 bis 7 spielten offenbar eine untergeordnete Rolle in der Regulation der *regA*-Genexpression, weil Mutationen in diesen Codons weiterhin zu 60 % bis 82 % Cotransformanten mit WT-Charakter führten. Anders dagegen Mutationen in ATG1 (22 %) und ATG2 (35 %), die in deutlicher Reduktion der Komplementationsraten resultierten, aber in keinem Fall deren völligen Verlust nach sich zogen. In wenigen Fällen trat ein modifizierter Reg-Phänotyp, der M-Reg-Phänotyp, auf, bei dem einige somatische Zellen größer wurden (Abb. 34, rechts) und vereinzelt zu Gonidien redifferenzierten (Abb. 34, links). Diese redifferenzierten Zellen unterscheiden sich von denen, die durch eine inaktivierende *regA*-Mutation entstanden, durch ihren immer noch vorhandenen Augenfleck (Kirk, 1998). Vermutlich ist dies auf eine sehr schwache Expression von *regA* zurückzuführen, die in einigen Zellen für die Aufrechterhaltung der Differenzierung nicht mehr ausreicht. Dieser Phänotyp wurde als „schwacher WT“ eingestuft, d.h., prinzipiell funktioniert die Komplementation.

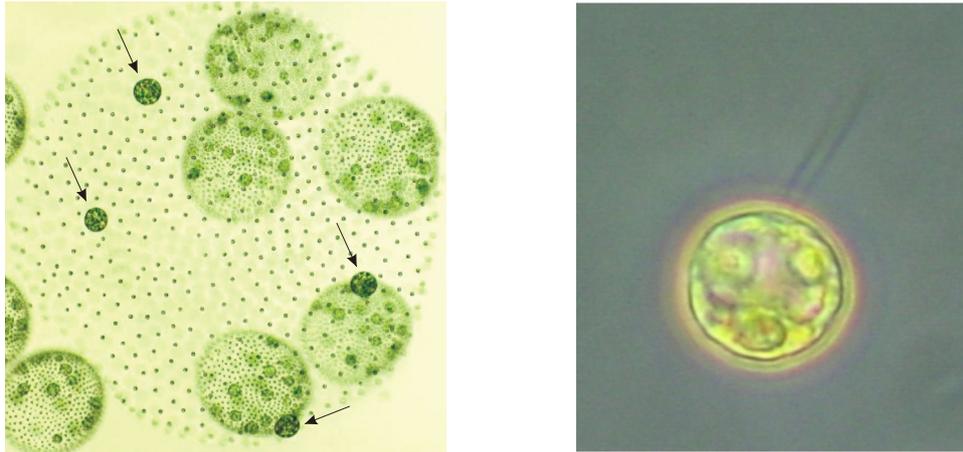


Abb. 34. **M-Reg-Phänotyp**. Links ist ein Sphäroid mit vier (↑) sich einzelnen Somazellen zuerkennen, die zu Gonidien dedifferenzieren (D. Kirk). Rechts ist eine vergrößerte, aber nicht dedifferenzierte Somazelle gezeigt, die den Augenfleck und die Flagellen behalten hat.

Mechanismen des *leaky scanning* und Reinitiation, die zur Erhöhung der Komplementationsrate geführt hätten, wurden aufgrund dieser Ergebnisse als mögliche Translationskontrollen ausgeschlossen. Von Interesse waren aber die Mutationen von ATG1 und ATG2, die deutlich hemmende Effekte auf die *regA*-Genexpression zeigten (Tab. 15). Beide liegen innerhalb der *regA*-Deletion  $\Delta E1-E3$  (Abb. 30), die zum vollständigen Verlust der Komplementationsfähigkeit führte (Tab. 14) und auch der ORF2 fällt in diese Deletion. Bevor die Bedeutung dieser Sequenzelemente für die Translation von *regA* näher untersucht wird (4.3.6), soll zunächst der Einfluß von ATG9 und ATG10 überprüft werden, Codons, die am Start und innerhalb des aktuellen *regA*-Leserasters liegen.

#### 4.3.4 Mutationen im ATG9-Leseraster

AUG9 stellt den publizierten Translationsstart von RegA dar (Kirk et al., 1999). Es ist kein ideales Startcodon, denn seine Kozak-Sequenz weist nur drei Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz auf (Tab. 13); zwei CUGs 15 bzw. 18 bp *upstream* im selben Leseraster könnten darüber hinaus als mögliche Startcodons fungieren (Kozak, 2002). Deshalb wurde ATG9 nach TTG mutiert (4.3.3) und ferner ein Stopp (Position +4) bzw. zwei Stopps (Positionen +4 und +10) in den ORF9 eingeführt (Abb. 35). Letztere würden den Abbruch der Translation, ausgehend von AUG9 oder den CUGs nach sich ziehen. Sollte es sich bei AUG9

um den einzigen Translationsstart handeln, so würde der Komplementationstest negativ ausfallen. Die aktuellen Ergebnisse (Tab. 16) indizieren jedoch, daß die Verhältnisse komplexer sind.

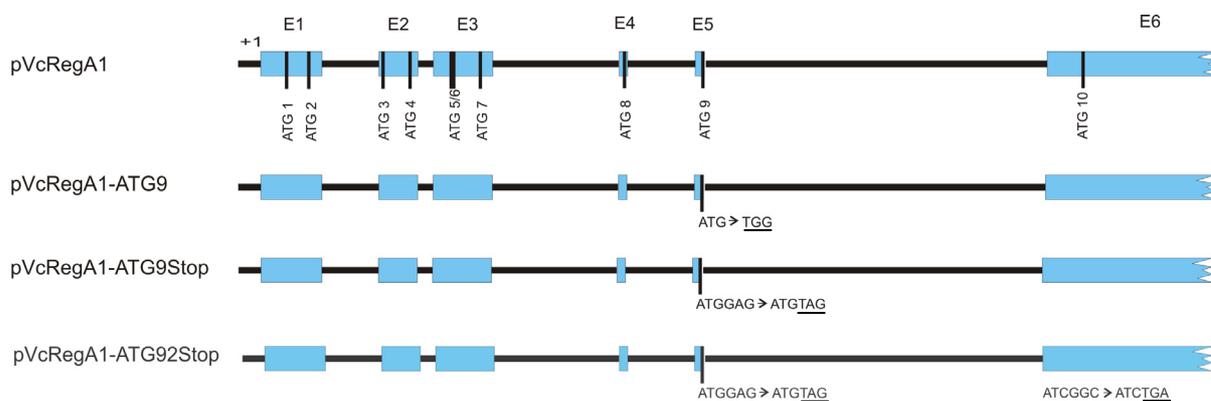


Abb. 35. Wildtyp *regA* (pVcRegA1) und drei Mutationen in ATG 9 und dem anschließenden Leseraster, die auf ihre Fähigkeit zur Komplementation von *V. carteri* 153-68 (*regA*Δ) getestet wurden. Mutierte Tripletts sind unterstrichen. Symbole wie in Abb. 33.

Tab. 16. Komplementation von *regA*Δ mit drei Mutationen im Leseraster von ATG9 (Abb. 35)<sup>1</sup>.

	A1	ATG9	ATG9Stop	ATG92Stop
WT/Gesamt	17/31	5/27	8/28	7/32
WT-Anteil in %	55	19	29	22
% A1	100	35	53	40
Komplementation	+	+	+	+

<sup>1</sup> Kriterien und Beschreibung wie in Tab. 15

Die drei Konstrukte waren in der Lage, den *regA*Δ-Defekt von *V. carteri* 153-68 bis zu ca. 50 % zu komplementieren. Dieses Ergebnis führt zu dem Schluß, daß AUG9 wichtig, aber für die Translation eines funktionsfähigen RegA nicht absolut erforderlich ist. Vermutlich reicht ein N-terminal verkürztes RegA-Protein für die Funktionsfähigkeit. AUG9 wäre danach nicht das einzige Startcodon im *regA*-Gen.

### 4.3.5 Ein Stopp-Codon im ATG10-Leseraster

ATG10 liegt im Exon 6, 33 Codons unterhalb von ATG9 (Exon 5). Beide weisen eine ähnlich bewertete Kozak-Umgebung auf (Tab. 13), die ihre Eignung für eine reduzierte Translation belegt (natives *regA* ist ein schwach exprimiertes Gen; s. 4.2.2, Abb. 29). Um die Rolle von ATG10 und des folgenden ORF mit 1016 Codons zu testen, wurde ein TAA-Stopp im vierten Codon generiert (Abb. 36) und das Konstrukt in den Komplementationstest eingesetzt. Das Ergebnis der Cotransformationsanalyse (Tab. 17) zeigt sehr deutlich, daß das Translationsprodukt unterhalb von ATG10 entscheidend wichtig für die Komplementations- und Funktionsfähigkeit des RegA-Proteins ist.

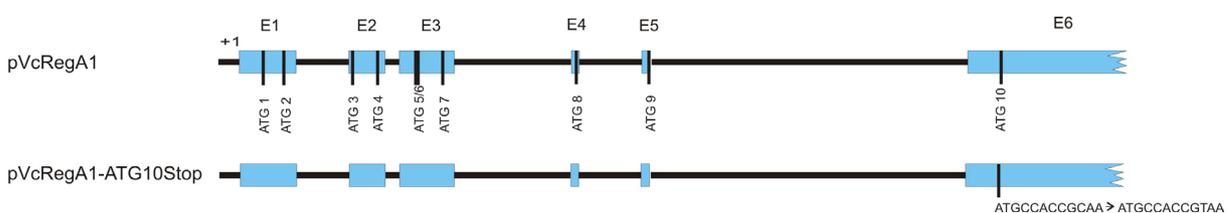


Abb. 36. Wildtyp *regA* (pVcRegA1) und eine Stopp-Mutation hinter ATG 10, die auf ihre Fähigkeit zur Komplementation von *V. carteri* 153-68 (*regAΔ*) getestet wurde. Das mutierte Triplet ist unterstrichen. Symbole wie in Abb. 33.

Tab. 17. Komplementation von *regAΔ* mit ATG10Stop (Abb. 36)<sup>1</sup>.

	A1	ATG10Stop
WT/Gesamt	17/31	1/25
WT-Anteil in %	55	4
% A1	100	7
Komplementation	+	-

<sup>1</sup> Kriterien und Beschreibung wie in Tab. 15

Lediglich eine von 25 Cotransformanten hatte WT-Charakter, möglicherweise als Folge eines *readthrough* oder einer spontanen Suppressormutation. Statistisch betrachtet, resultiert die

Einführung des TAA-Stoppcodons in einer Inaktivierung von RegA. Folglich stellt AUG10 den dominanten Translationsstart im *regA*-Gen dar. Das resultierende Protein hat 1016 AS-Reste mit einem berechneten Molekulargewicht von 107.500. ATG10 wurde damit als letztmöglicher Translationsstart für ein funktionsfähiges RegA-Protein identifiziert. Offensichtlich wird ein um 33 AS-Reste verlängertes RegA *in vivo* an ATG9 gestartet, weil dessen Inaktivierung zum 65 %igen Absinken der Komplementationsfähigkeit führt (Tab. 16). ATG9 und ATG10 repräsentieren folglich die nativen Translationsstarts im *regA*-Genlocus. Ihre nicht optimale Kozak-Sequenzen (Tab. 13) sprechen für eine gradierte Translation. Welchen Einfluß die oberhalb gelegenen ATG-Tripletts und anschließende ORFs (Abb. 31) haben, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht.

### 4.3.6 Untersuchung des ORF2

AUG2 hat im Vergleich zu allen anderen untersuchten AUGs die beste Kozak-Umgebung (Tab. 13). Allein die Position -3 (G statt A) unterscheidet sich von der für *Chlamydomonas* gemittelten Optimal-Sequenz. Der offene Leserahmen 2 (Abb. 31) ist nach *regA* der größte ORF auf der *regA*-mRNA. Er erstreckt sich von Exon 1 bis Exon 3 und kodiert nach korrektem Spleißen für ein Protein mit 142 AS-Resten (Abb. 37/-I2). Es stellte sich allerdings heraus, daß Intron 2 unter bestimmten Umständen nicht gespleißt wird (4.3.6.4) so daß der Leserahmen bereits nach 285 bp abbricht (Abb. 37/+I2; 95 AS). Die mögliche Ausdehnung von Orf2 mit und ohne Herausspleißen von Intron 2 zeigt Abb. 37.

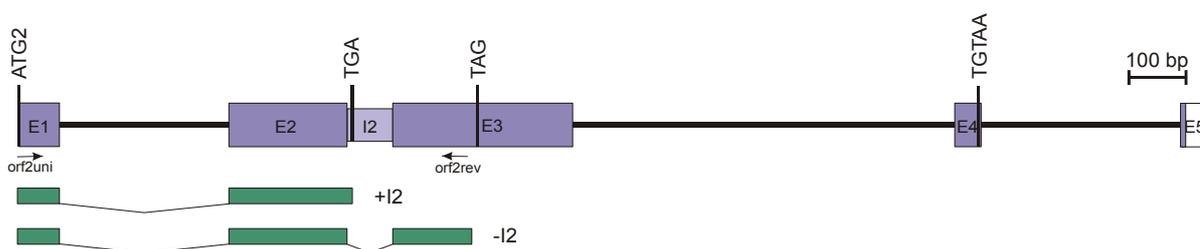


Abb. 37. **Physikalische Karte von orf2 Von ATG2 bis zum Poly-A-Polyadenylierungsstelle.** Exons sind als dunkelblaue Boxen, das Intron 2 als hellblaue Box und die restlichen Introns als schwarze Linien dargestellt. In grün sind die möglichen kodierenden Regionen (+I2 und -I2) gezeigt. Lage und Orientierung der verwendeten Primer orf2uni und orf2rev sind durch Pfeile markiert. Nummerierung und Beschriftung wie Abb. 30.

Die nahezu optimale Kozak-Umgebung von AUG2 (Tab. 13), ein anschließender ORF mit 95 (oder 142) Codons (Abb. 37) und eine 65 %ige Reduktion der Komplementationsrate durch Mutation von ATG2 (Tab. 15) wiesen diesem Teil der 5'NTR eine besondere Bedeutung für die *regA*-Genexpression zu. Daraus resultierten folgende Fragen:

- (1) Liegt dieser ORF 2 auch in anderen *Volvox*-Spezies vor und wie stark ist er konserviert?
- (2) Hat ORF 2 eine eigene mRNA?
- (3) Wird ORF 2 translatiert?

#### 4.3.6.1 Vergleich mit *V. carteri* f. *kawasakiensis*

Eine verwandte, jedoch von *V. carteri* f. *nagariensis* separate, genetisch nicht kompatible Subspezies ist *V. carteri* f. *kawasakiensis* (Kirk, 1998). Deren *regA*-Gen wurde kürzlich isoliert und sequenziert (D. Kirk, pers. Mitteilung). Ein Vergleich der ATG2-Position und der Kozak-Umgebungen der entsprechenden 5'NTR-Bereiche zeigte, daß die ORF2-Lage und Proteinsequenzen nahezu vollständig konserviert (86 %) sind (D. Kirk, pers. Mitteilung). Diese starke Konservierung zwischen den beiden Unterarten wurde mittels einer PCR (3.2.2.4) mit den Primern *orf2uni* und *orf2rev* (Tab. 3, Abb. 37) und Sequenzierung (3.2.3) der amplifizierten offenen Leseraster überprüft.

Abb. 38 zeigt den Vergleich (42 bp nach pers. Mitteilung von D. Kirk) des ca. 820 bp-Bereichs und dessen hohe Konservierung (86 % Identität). Unter der Voraussetzung, daß in beiden Fällen das Intron 2 nicht gespleißt wird (Abb. 37), beträgt die Identität der kodierenden Bereiche sogar 88 %. Das ist für die DNA-Sequenzen von zwei Arten, deren orthologe Sequenzen sich durchschnittlich um ca. 20 % unterscheiden, eine ungewöhnliche Konservierung, die auf eine selektive Erhaltung der Sequenz und folglich auf eine Funktion hinweist. Die abgeleiteten Peptidsequenzen sind in Abb. 39 vergleichend dargestellt.

```

*      20      *      40      *      60      *
HK10 : ATGGCGTATCCTTGCTACCTTGAAAATTTGCTGCTGGAACCTGGAACAACGTGGAGTATTGCGCAGTTCAAAGGTAGG : 76
kawa : ATGGCGTATCCTTGCTACCTTGAAAATTTGCTGCTGGAACCTGGGACAACGTGGAGTATTGCGCAGTTCAAAGGTAGG : 76

      80      *      100     *      120     *      140     *
HK10 : GTC AACCGGCACGCGGTCCA--TTGCACATGACTCCATTGGGCTAGCATAGTTATTTTGTATTAGGTCATGCATTG : 150
kawa : GTC AACCGGCACGCGGTCCA CATTGCACATGATTC CATTGGGCTATCACAATTATATTGTATTAGGTCATGCATTG : 152

      160     *      180     *      200     *      220
HK10 : CATATTGTAGCTCTACCGAATTTGTCTTGGCCAATTATTGGACAGGCCAAAGGACTGGTAGTCCATCCACTCCATGA : 226
kawa : AACATTGTAGCTCTACCAAAATTTGTCT-GGCCAATTAATGGACAGGCCAAAGGACTGGTAGTTCATCCACACCAATC : 227

*      240     *      260     *      280     *      300
HK10 : TAGTCAGAAATGTCCTTTAGCCTAATTCGAAATGGCGATTCTCAATCCTGTTATTATGTTAAAAAATGCTTCCTT : 302
kawa : TAGTCAGGGATGTTCT--AGCCTATTTCAAAAAGGCGATCATGATTCATATCACATTGTTAAAAAATAATCCTTCCTT : 301

*      320     *      340     *      360     *      380
HK10 : CAGCTGCAAAATGAAGCCG-TGTCCC-GCGGCCTAACTTTTGTCTGTTGTGGTAACTTTTTTGCCCTTCAGGCAGGC : 376
kawa : CCACCTGCAAAATGGAGACGCTGTCCCTCCGGCCTAAC-TATGCTGTTGTGGTAACTTTTTTGCCCTTCAGGCAGGC : 376

*      400     *      420     *      440     *
HK10 : GCTTACCACCTCAGCAATGCTCAAGAAGAAATTCCTGAAAGTTCACACAAAAAATTCAGCCTTGCCTGGCTTCTTCTG : 452
kawa : GCTTACCACCTCAGCAATGCTCAAGAAGTAATCCTGAAATTCCTCATAGAAATACAGCCTTTTTTGGCTTCTTCTG : 452

      460     *      480     *      500     *      520     *
HK10 : TGGGAAGCATTTTTCTTGGTGGGCGACGTGCCAGCAACGCCACCACCCCGTCAGAGTCCCTCTGGAGTCCATTTTC : 528
kawa : TGGGAAGCATTTTTTGGCGGGCGACGTGCCAGCAACGCCACCACCCCGTCAGAGTCCCTTTGGAGCCCATTTTC : 528

      540     *      560     *      580     *      600
HK10 : CGTCTTATGCCATAAAAAATTTAGAGAATCATTAAAAACAATTTTAAAGGTAGGCTGAGGAGACCGCGATCGCAT : 604
kawa : CATCTTATACCATGAGCATTTCAGAAAGCACATAAAA-TATTTTGAAGGTAGGCTGAGGGGCCGAGATCGCAT : 603

*      620     *      640     *      660     *      680
HK10 : GATAAAGCACGTCACGCCAAGCAACAACAGTCGCTGTGGCATTTCCTTGCAGTCAGATTCTTCAATTTATTACAA : 680
kawa : GAT-GGGGCACGTCACGCAACG-AACAACAGTCGGTGTGGCATTTCCTTGCAGTCACATTCTTCAACTAGTGATAA : 677

*      700     *      720     *      740     *      760
HK10 : GATAATTCTTTTGGTACTACTGATATACACGACAGTGCAGCAGAACTTTCACTACGGGAGGAGCAGGGCAAATGTC : 756
kawa : GATAATTACACTGTTACCATTAAATACACACAACAGTTCAGCAGGACTTTCACTTTG-AAAGAGCAAGGCAGATGTC : 752

*      780     *      800     *      820
HK10 : GCGGTCCCGATGGGCACCCTTGTCCAGATAAATCTCTGCATACAACCTTAGTTATAACGACATTTGA : 823
kawa : GCGGTCCCGATGGGCTCCACTTGTCCAGATAAATCTCTGCATACAACCTTAGTTATAACGACATTTGA : 819

```

Abb. 38. Vergleich der orthologen *orf2*-Sequenzen von *V. carteri f. nagariensis* (HK10) und *V. carteri f. kawasakiensis* (kawa). Identische Basen sind grau hinterlegt (kodierender Bereich: ca. 88 % Identität; komplett: 86 % Identität). Der kodierende *orf2*-Bereich (Exon1, Exon2 und Teil von Intron 2) ist violett unterstrichen.

		*		20		*		40		*		60		*	
HK10	:	MAYPCYLEIC	CCWNNN	VEYCAVQR	QALTTQCS	RRIP	EVPHKNC	SLACVLL	WEAF	SWWATC	QQRPP	PPSE	SSGVHF	:	76
kawa+I2	:	MAYPCYLEIC	CCWNN	WDNVEYCAV	QRQALTTQCS	RSNPE	ILHKKYS	SLFCVLL	WEAF	FWRATC	QQRPP	PPSE	SFGAHE	:	76
kawa	:	MAYPCYLEIC	CCWNN	WDNVEYCAV	QRQALTTQCS	RSNPE	ILHKKYS	SLFCVLL	WEAF	FWRATC	QQRPP	PPSE	SFGAHE	:	76
		80		*		100									
HK10	:	PSLCHK	NLENHL	KQIFK	VG*-----	:	95								
kawa+I2	:	PSLYHE	HFQKHI	KYFER*-----	:	93									
kawa	:	PSLYHE	HFQKHI	KYFESH	FLGLVIR*	:	101								

Abb. 39. Vergleich der abgeleiteten Orf2-Polypeptide (aus Abb. 38). Identische AS-Reste sind grau hinterlegt. Abgeleitete Peptidsequenzen von *orf2* aus *V. carteri* f. *nagariensis* (HK10), aus *V. carteri* f. *kawasakensis* mit Intron 2 (kawa+I2) und aus *V. carteri* f. *kawasakensis* ohne Intron 2 (kawa).

Das resultierende Orf2-Polypeptid von *V. carteri* f. *kawasakensis* inklusive Intron 2 enthält 93 AS-Reste, weil dort im Intron 2 ein Stoppcodon auftritt. Ohne Intron 2 enthält es 101 AS-Reste bis zum nächsten Stopp. Ohne Spleißen von Intron 2 sind die resultierenden Peptidsequenzen zu 74 % identisch (mit Spleißen zu 69 %). Die größte Abweichung ist im carboxyterminalen Bereich (20 %) zu finden. Diese starke Konservierung auf DNA- und auf Proteinebene unterstreicht die vermutete essentielle Bedeutung dieses DNA-Bereiches bzw. des resultierenden Proteins für die Regulation der *regA*-Genexpression.

#### 4.3.6.2 Vergleich mit verschiedenen *V. carteri*-Spezies

In eine erweiterte Analyse der ORF2-Region des *regA*-Gens wurde außer der *regA*-Mutante 153-68 *V. carteri* f. *nagariensis* Poona und *V. carteri* f. *weismannia* (Tab. 1) einbezogen. DNAs dieser Stämme ergaben mit der Primerkombination *orf2uni/orf2rev* PCR-Produkte (3.2.2.4), die kloniert und sequenziert (3.2.2.5) werden konnten. Solche Analysen führten bei entfernteren *Volvocales* nicht zum Erfolg. Vergleiche der gewonnenen Sequenzen zeigt Abb. 40.

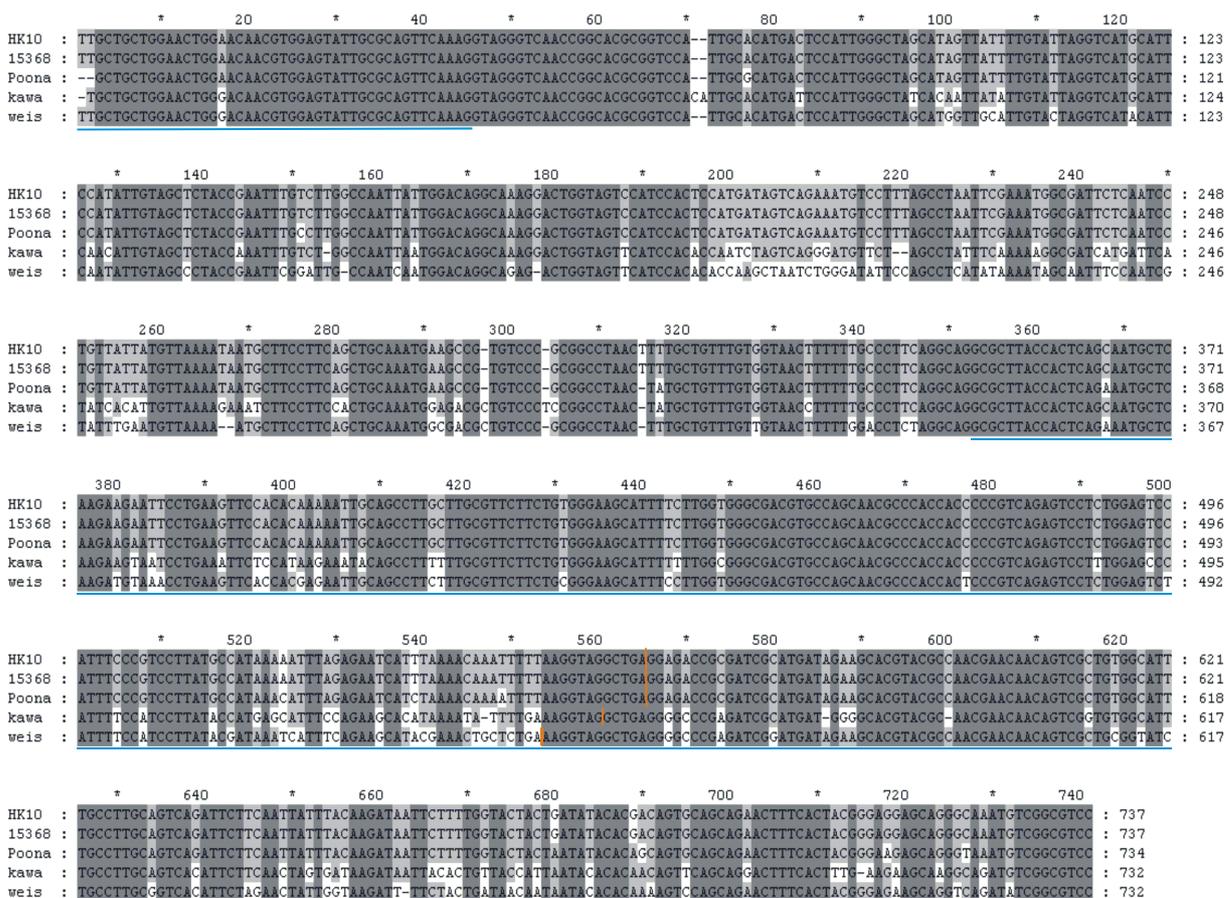


Abb. 40. Vergleich von fünf *orf2*-Sequenzen aus verschiedenen *V. carteri*-Spezies. Es wurden *Volvox carteri* f. *nagariensis* HK10 (HK10), *Volvox carteri* f. *nagariensis* 153-68 (15368), *Volvox carteri* f. *nagariensis* Pootna (Pootna), *Volvox carteri* f. *kawasakiensis* (kawa) und *Volvox carteri* f. *weismannia* (weis) verglichen. Die Exonbereiche sind blau und das Ende der Stoppcodons orange markiert. Die AS mit 100% Identität sind dunkelgrau, die mit 60% sind hellgrau hinterlegt.

In allen Fällen zeigte sich eine hohe Konservierung der *orf2*-Sequenz. Die Sequenz der *regA*-Mutante 153-68 ist identisch mit der von HK10. Pootna weist eine Identität von 98 % zu HK10 auf, *kawasakiensis* 88 % und *weismannia* 82 %. Vergleiche der abgeleiteten Proteinsequenzen (Abb. 41) ergab, 95 % Identität bei Pootna, 74 % bei *kawasakiensis* und 76% bei *weismannia*. Die abgeleiteten Polypeptide der vier Spezies haben Längen zwischen 91 und 95 AS-Resten (Abb. 41).

```

                *           20           *           40           *           60           *
HK10 : MAYPCYLEICCWNNWNNVEYCAVQRQALTTQCSRRRIPEVPHKNCSLACVLLWEAFSFWWATCQQRPPPPSESSGVHF :
Poona : -----CCWNNWNNVEYCAVQRQALTTQKCSRRIPEVPHKNCSLACVLLWEAFSFWWATCQQRPPPPSESSGVHF :
kawa : MAYPCYLEICCWNNWNNVEYCAVQRQALTTQCSRSNPEILHKKYSLFCVLLWEAFFWURATCQQRPPPPSESFGAHF :
weis : -----CCWNNWNNVEYCAVQRQALTTQKCSRCKPEVHHENCSSLACVLLWEAFSFWWATCQQRPPPLPSESSGVYF :

                80           *
HK10 : PSLCHKNLENHLKQIFKVG* :95
Poona : PSLCHKHLENHLKQNFKVG* :95
kawa : PSLYHEHFQKHIKYFER*-- :93
weis : PSLYDKSFQKHTKLL*---- :91
    
```

Abb. 41. **Vergleich der abgeleiteten Orf2-Polypeptide (aus Abb. 40).** Zu 100 % identische Aminosäuren sind dunkelgrau und zu 50% identische hellgrau hinterlegt. Abgeleitete Polypeptidsequenzen von *orf2* unter der Voraussetzung, daß Intron 2 nicht gespleißt wird. Stamm-Bezeichnungen wie Abb. 40.

Die abgeleitete Orf2-Polypeptidsequenz weist keine bekannten Sequenzmotive auf. Auffällig ist aber das gehäufte Auftreten von Prolin- und Glutamin-Resten, die bis zu 16 % des Polypeptids ausmachen.

Vier weitere Primerkombinationen (Tab. 3; *orf2degu/orf2degr*, *deg1/deg2rev*, *deg2uni/deg4*, *deg3/deg4*), deren Sequenzen anhand der bisher abgeleiteten Orf2-Polypeptide degeneriert wurden, versagten ebenso beim Versuch, *orf2*-Orthologe aus *V. obversus*, *V. aureus*, *V. africanus*, *V. tertius*, *V. gigas*, *V. rousseletti*, *V. spermatosphera*, *V. globator*, *Pleodorina californica*, *Pleodorina illinoisiensis*, *Eudorina elegans*, *Eudorina unicocca*, *Pandorina* und *Gonium* zu isolieren. Dies könnte auf stärkere Sequenzabweichungen in der *orf2*-Region oder auf eine prinzipiell andere Regulation der Zelldifferenzierung hinweisen, die nicht dem „*regA master gene*“-Schema folgt. Die letztere Erklärung könnte stichhaltig sein, weil in keiner der entfernten *Volvox*-Arten bisher Mutanten mit RegA-ähnlichen Phänotypen beobachtet wurden.

#### 4.3.6.3 Einführung zweier Stopp-Codons hinter ATG2

Die Mutation von ATG2, die damit verbundene 65 %ige Reduktion der Komplementationsfähigkeit (Tab. 15) und die hohe Konservierung der *orf2*-Sequenz (Abb. 40) ließen vermuten, daß der *orf2*-Leserahmen eine Bedeutung für die *regA*-Expression hat. Es wurden deshalb zwei Stopp-Codons in den Leserahmen integriert (Abb. 42) und eine Komplementations-

Analyse durchgeführt (Abb. 32), um die Auswirkungen eines völligen Verlustes des ORF 2 auf die *regA*-Expression zu untersuchen.

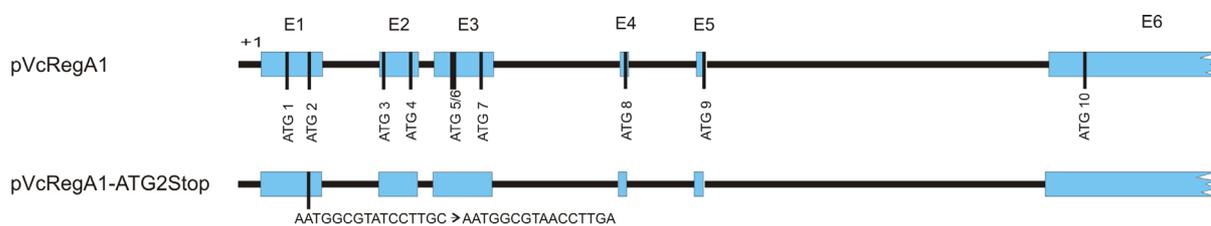


Abb. 42. Wildtyp *regA* (pVcRegA1) und eine Stopp-Mutation hinter ATG 2, die auf ihre Fähigkeit zur Komplementation von *V. carteri* 153-68 (*regA*Δ) getestet wurde. Die mutierten Triplets sind unterstrichen. Symbole wie in Abb. 30.

Tab. 18. Komplementation von *regA*Δ mit ATG2Stop (Abb. 42)<sup>1</sup>.

	A1	ATG2Stop
WT/Gesamt	17/31	2/27 (2)
WT-Anteil in %	55	7
% A1	100	13
Komplementation	+	-

<sup>1</sup> Kriterien und Beschreibung wie in Tab. 15

Wie das Ergebnis in Tab. 18 zeigt, fanden sich unter 27 Cotransformanten lediglich zwei M-Reg-Phänotypen (Abb. 34), aber keine mit echter WT-Morphologie, während die anderen 25 den RegA-Phänotyp beibehalten. Die M-Reg-Morphologie könnte durch eine extrem schwache *regA*-Expression hervorgerufen werden. Bedeutet man, daß ein intakter ORF2 im endogenen *regA*Δ-Gen des Rezipienten 153-68 vorhanden ist und dort transkribiert und translatiert werden kann (Rusch, 1999), ist zu schließen, daß ein mögliches Genprodukt von *orf2* nur in *cis* wirken kann. Das aktuelle Ergebnis war jedenfalls ein deutlicher Hinweis dafür, daß ein funktioneller ORF2 für die *regA*-Expression erforderlich ist.

Es stellte sich die Frage, ob die beiden Transformanten mit M-Reg-Morphologie (Abb. 34) eine höhere Kopienzahl des transgenen *regA* (ATG2Stop) enthielten als die Mehrzahl der Transformanten, die RegA-Morphologie, also keine Komplementation aufweisen (Tab. 18). Zur Klärung wurde eine *dotblot*-Analyse durchgeführt, in welche die DNAs von je zwei M-Reg- (TMReg9 und TMReg13) und Reg-Transformanten (TReg2 und TReg4) sowie die WT-Transformante A2-12 (Kirk et al., 1999) und der WT-Stamm HK10 einbezogen wurden. Als Sonde wurden <sup>32</sup>P-markierte Fragmente von *regA*, *orf2* und des Aktins eingesetzt, letzteres als Einzelkopie-Kontrolle (Cresnar et al., 1990) zur Normierung der jeweils aufgetragenen DNA-Mengen.

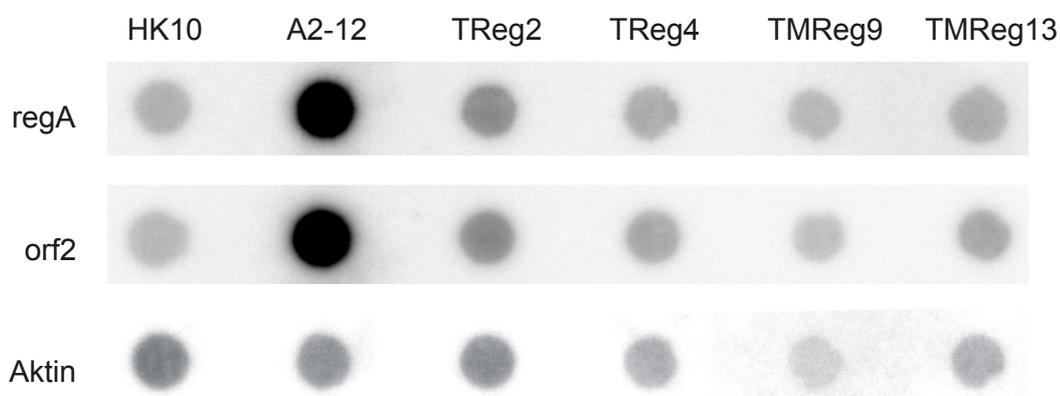


Abb. 43. **Dotblot-Analyse zur Kopienzahlbestimmung verschiedener Transformanten.** Die ATG2Stopp-Transformanten TReg2 und TReg4 zeigten den Reg-Phänotyp, TMReg9 und TMReg13 den M-Reg-Phänotyp. HK10 steht für den WT. Die Transformante A2-12 (Kirk et al., 1999) zeigt den WT-Phänotyp. Es wurden jeweils 2 µg DNA aufgetragen. Die drei Membranen wurden mit den Sonden *regA* (PCR-Produkt mit LE6/RE6), *orf2* (*regA*-cDNA von ATG2 bis Base 147 des Exons3) bzw. Aktin (PCR-Produkt mit Actin-fwd/Actin-rev) hybridisiert. Die Aktin-Hybridisierung diente der Normierung der aufgetragenen DNA-Menge.

Das *dotblot*-Muster mit den DNAs von sechs Stämmen hybridisiert gegen drei Sonden zeigt Abb. 43. Die Intensitäten wurden mit dem Programm *Optiquant* bestimmt (3.2.8.2; Originaldaten s. Anhang 8.3.1), mittels der Aktinwerte normiert und relativ zur Kopienzahl des HK10-Stammes berechnet. Die so errechneten Werte sind in Tab. 19 zusammengefaßt.

Tab. 19: Kopienzahl, errechnet aus den Intensitäten (Tab. 20) der *dot blot*-Analyse (Abb. 43).

	HK10	A2-12	TReg2	TReg4	TMReg9	TMReg13
<i>regA</i>	1	31,0	2,7	2,4	2,7	2,7
<i>orf2</i>	1	35,0	3,1	2,9	2,1	2,5
Normierungsfaktor (Aktin) <sup>1</sup>	3,74	2,80	2,85	1,62	1,00	1,66

<sup>1</sup> Faktor, mit dem die Intensitäten vor der Kopienberechnung korrigiert wurden.

Ausgehend von einer einfachen *regA/orf2*-Genkopie im WT HK10, enthielt die Transformante A2-12 31 bis 35 Genkopien. Die vier ATG2Stop-Transformanten dagegen enthielten, unabhängig von ihrem Phänotyp, zwei bis drei *regA/orf2*-Genkopien. Dieses Resultat besagt, daß die beiden M-Reg-Phänotypen TMReg9 und TMReg13 nicht aufgrund einer erhöhten Kopienzahl des ATG2Stop-Konstrukts eine modifizierte, WT-ähnliche Morphologie ausbilden konnten. Eine statistische Fluktuation bei grenzwertiger *regA*-Genexpression ist unwahrscheinlich, weil in diesem Fall die Phänotypen – weder Reg noch M-Reg – der Transformanten nicht stabil vererbt wurden, sondern aus einem der drei Phänotypen wieder alle entstehen konnten. Vielmehr ist zu vermuten, daß hier die Position der Transgene im Genom (euchromatische vs. heterochromatische Region) zu subtilen Expressionsunterschieden mit morphologischen Konsequenzen führen kann.

#### 4.3.6.4 Transkription von *orf2*

Die Beobachtungen, daß die Sequenzumgebung von ATG8 (ACCTATGTA) ein Poly-A-Signal darstellen könnte, ließ vermuten, daß *orf2* eigens transkribiert wird. Zur Klärung wurde eine RT-PCR mit HK10 mRNA durchgeführt (3.2.2.4). Nach reverser Transkription mit einem Oligo-dT-Adapterprimer (Oligo-dT+A, Tab. 3, Abb. 44) wurde mittels PCR mit dem Adapterprimer (Adapter, Tab. 3) und dem ATG-bindenden Primer NcoATG2 (Tab. 3, Abb. 44) amplifiziert.

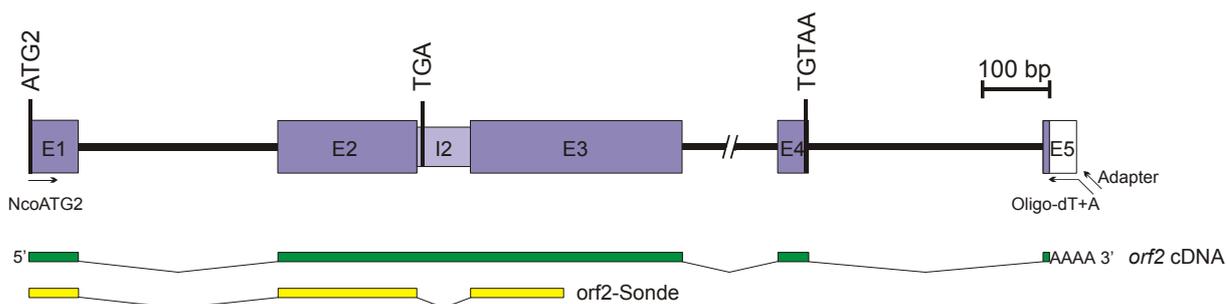


Abb. 44. **Physikalische Karte von *orf2* und seiner mRNA-analogen cDNA.** Oligo-dT+A wurde zur reversen Transkription, NcoATG2 und Adapter in der anschließenden PCR verwendet. Die Sequenz des PCR-Produkts (*orf2* cDNA, 730 bp; grün) entsprach der *orf2* mRNA von ATG2 bis zur Polyadenylierungsstelle. Die Lage der *Northern*-Sonde *orf2* ist gelb markiert. Beschriftung wie Abb. 37.

Eine Sequenzierung des klonierten PCR-Produkts (Abb. 44) zeigte, daß *orf2* eigens transkribiert wird. Im Unterschied zur (viel längeren) *regA* mRNA (Kirk et al., 1999) wurde aus der *orf2*-mRNA das Intron 2 (80 bp) nicht herausgespleißt. Die *orf2* mRNA setzt sich also aus den Exons 1 bis 5, sowie Intron 2 zusammen und hat eine Länge (ATG bis PolyA-Schwanz) von 730 nt. Wie vermutet, wurde das Poly-A-Signal bei ATG8 (ACCTAATGTAA, in Exon 4) für die Termination benutzt. Parallel dazu wurde die Region um das Intron 2 in der *regA* mRNA nochmals überprüft und RT-PCRs mit den spezifischen Primern ATG3mutu und ATG10nonr (Tab. 3) durchgeführt. Die Sequenzierung zeigte eindeutig, daß das Intron 2 in der *regA* mRNA nicht enthalten war.

Nach diesen Resultaten sollten zwei mRNAs vom *regA*-Genlocus transkribiert werden: eine kürzere, 730 nt *orf2* mRNA mit dem Intron 2 und eine lange, 6725 nt *regA* mRNA (Kirk et al., 1999) ohne Intronsequenzen. Einen unabhängigen Nachweis dieser Kombination von zwei Transkripten sollte ein *Northern blot* mit RNA der Transformante A2-12 (Kirk et al., 1999) und von HK10 (WT, Tab. 1) liefern. Dazu wurden 2,7 µg A2-12 mRNA und 8,9 µg HK10 mRNA eingesetzt. Als „*orf2*-Sonde“ (Abb. 44) wurde ein Teil der *regA* cDNA (ATG2 bis Base 147 des Exons 3) verwendet. Sollte eine zweite zu *orf2* komplementäre mRNA existieren, so wurden zwei Banden erwartet: Eine 6725 nt Bande (*regA* mRNA) und eine >730 nt Bande (*orf2* mRNA).

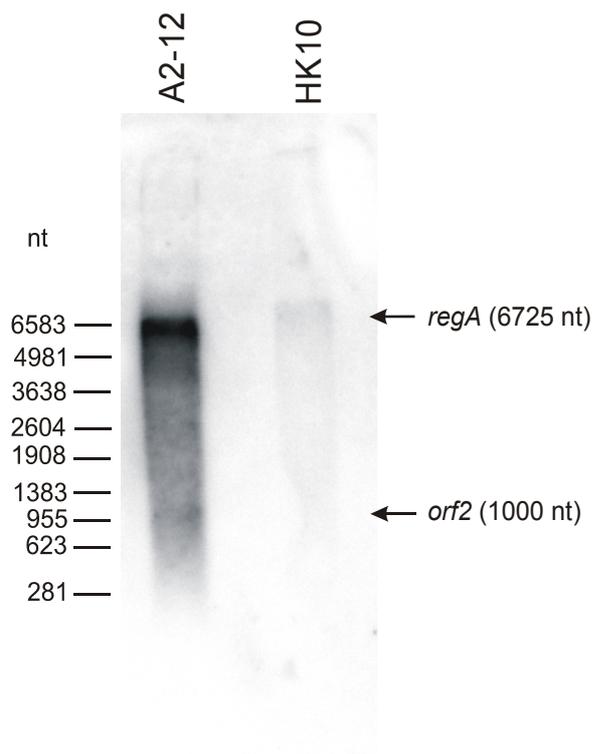


Abb. 45. **Northern-Analyse.** In Spur A2-12 wurden 2,7 µg mRNA der Transformante A2-12 und in Spur HK10 8,9 µg mRNA des WT aufgetragen und die Membran mit der Sonde *orf2* hybridisiert. Die Pfeile markieren die erwarteten Bandengrößen. Links wurde der Größenstandard gezeigt.

Die *Northern-Analyse* (Abb. 45) ergab tatsächlich zwei Banden der erwarteten Größen, die kleinere allerdings schwach und nur in der *multicopy*-Transformante A2-12 zu erkennen. Dieses Ergebnis bestätigte die RT-PCR-Daten, welche die Existenz einer zweiten *orf2* mRNA prognostizierten.

Das Mengenverhältnis der beiden mRNAs rangiert deutlich auf der Seite der langen *regA* mRNA (Abb. 45). Um eine Vorstellung von der Stöchiometrie der mRNA Spezies zu bekommen, wurden die Banden-Intensitäten densitometrisch mit dem Programm *Optiquant* bestimmt (Anhang 8.3.3). Nach Abgleich der eingesetzten RNA-Mengen betrug das Verhältnis der großen *regA* mRNA von A2-12 und HK10 ca. 42:1. Das Verhältnis *regA* mRNA zu *orf2* mRNA im Stamm A2-12 war wegen des deutlichen Rauschens (Hintergrund) im Bereich von 1000 nt nur abzuschätzen: Es lag bei mindestens 10:1. Daraus war zu folgern, daß *orf2* mRNA nur zu einem geringen Anteil transkribiert wird, daß dieser aber ein gezielter Vorgang sein muß, weil aus dieser kürzeren mRNA zwar die Introns 1, 3 und 4, aber nicht Intron 2 herausgespleißt werden.

4.3.6.5 Produziert *orf2* ein eigenes Protein?

Nachdem ich zeigen konnte, daß *orf2* ein eigenes Transkript hat, war es naheliegend, nach seiner autonomen Translation zu fragen. Für die Untersuchung wurde am 5'Ende von *orf2* auf dem Plasmid pVcRegA1Δ*BamHI* hinter ATG2 im Raster ein dreifacher HA-tag eingefügt (Tab. 2, Abb. 46/A), zur verstärkten Produktion des HA-Epitops, gegen das ein monoklonaler Antikörper vorlag. Mit dem Plasmid wurden sowohl der *V. carteri*-Stamm 153-68 (*regA*Δ) als auch der Stamm 153-48 mit WT-Morphologie transformiert.

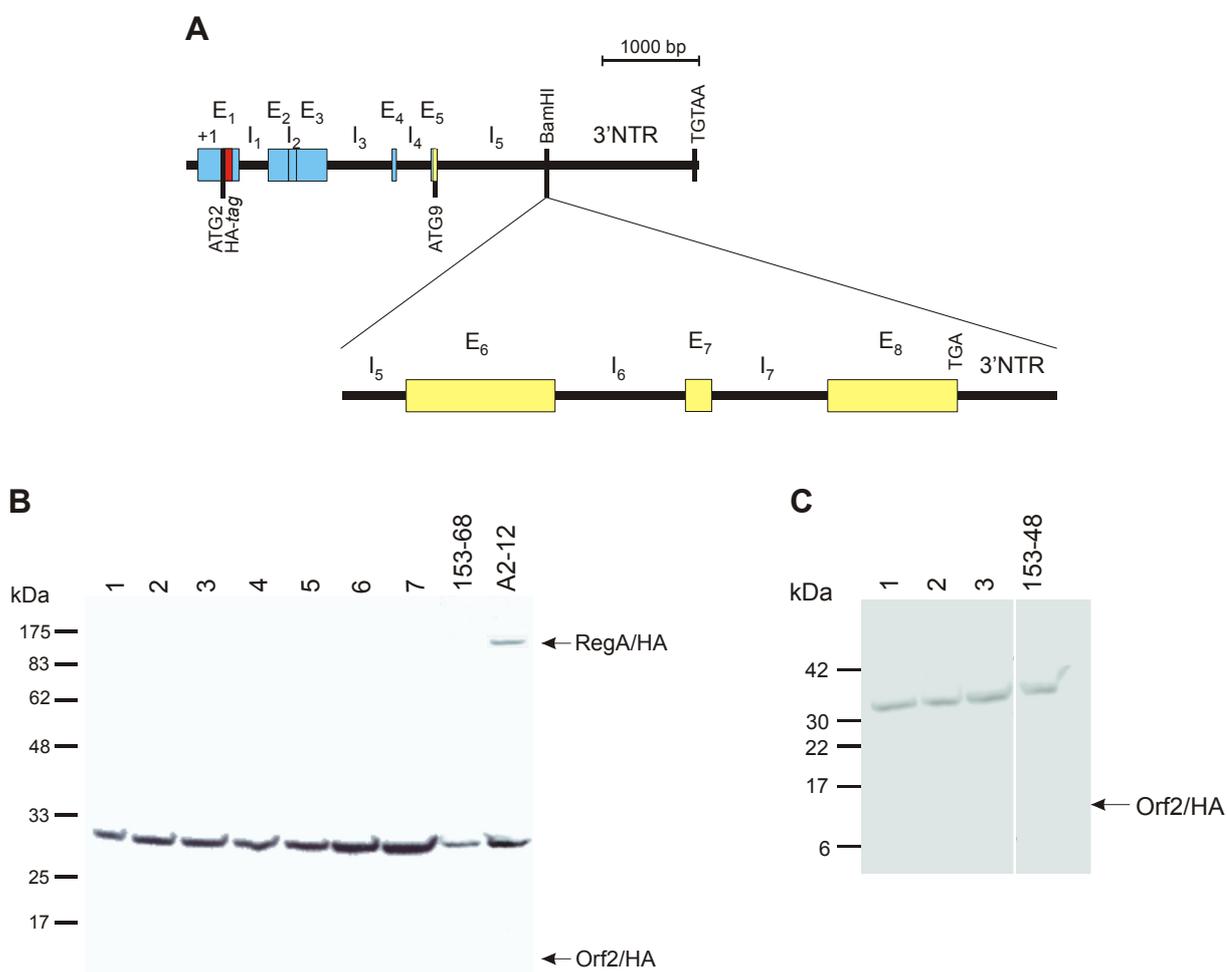


Abb. 46. Karte von pVcRegA1Δ*BamHI*+HA und Western-Analyse mit Anti-HA-Ak. In A ist oben der in den pSK-Vektor klonierte Teil des *regA*-Gens inklusive des HA-tag (rot) gezeigt, unten der deletierte Teil. Symbole wie Abb. 5. In B wurden die Proteingesamtextrakte der Cotransformanten des *regA*Δ-Stammes (1-7; jeweils 80 µg) sowie der nur mit pVcNR15 transformierten Kontrolle (153-68; 40 µg) und der Transformante A2-12 (40 µg) mit dem Anti-HA-Ak (1: 200) getestet. Die Pfeile markieren die jeweils erwarteten Signale. Der Größenstandard ist angegeben. In C wurden die Proteingesamtextrakte (jeweils 80 µg) der Cotransformanten des WT-Stammes 153-48 (1-3) und der nur mit pVcNR15 transformierten Kontrolle (153-48) mit dem Anti-HA-Ak (1:200) getestet. Der Pfeil markiert die erwartete Größe. Der Größenstandard ist angegeben.

Von dem *regA* $\Delta$ -Rezipienten wurden sieben und vom WT-Stamm drei Cotransformanten erhalten. Deren Extrakte wurden in *Western*-Analysen (Abb. 46/B und C) eingesetzt und mit Anti-HA-Ak (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von W. Seufert) getestet.

Bei Transformanten des *regA* $\Delta$ -Rezipienten 153-68 (Abb. 46/B) wurde, außer einer Kreuzreaktion bei ca. 32 kDa keine Bande detektiert. Eine spezifische Reaktion des Ak wurde anhand des A2-12-Extraktes belegt (Abb. 46/B Spur A2-12). Auch Transformanten des WT-Rezipienten 153-48 zeigten keine HA-spezifische Bande (Abb. 46/C), wohl aber die Kreuzreaktion bei 32 kDa. Eine Translation von *orf2* konnte mit diesem Experiment nicht nachgewiesen werden. Angesichts der geringen Menge an *orf2* mRNA (Abb. 45) wären im Translationsfall nur winzige Mengen des Orf2-Proteins zu erwarten. Es ist daher fraglich, ob die Empfindlichkeit des Anti-HA-Ak ausreicht, um Spuren eines solchen HA-markierten Orf2 zu detektieren.

Zweifellos ist die Komplementation von *regA* $\Delta$  der empfindlichere Test für die regulierenden Elemente in der 5'NTR. Die Tatsache, daß ein mutiertes ATG2 (Abb. 33, Tab. 15) und v.a. zwei *nonsense*-Mutationen in ORF2 (Abb. 42, Tab. 18) die Komplementationsfähigkeit dieser Konstrukte auf 35 % bis 7 % reduzieren, ist der stärkste Hinweis dafür, daß diese hochkonservierte Region für das Funktionieren der Translationsmaschinerie von wesentlicher Bedeutung ist. Eine sinnvolle Erklärung wird im Lichte neuer Erkenntnisse über die Regulation der Translation in eukaryontischen Systemen (Yueh & Schneider, 2000) diskutiert (5.3).

## 5. Diskussion

Von den drei Schlüsselgenen, *gls*, *lag* und *regA*, welche die Zelldifferenzierung der Kugelalge *Volvox* steuern, war das letztere, bestuntersuchte (Kirk et al., 1999; Stark et al., 2001) Gegenstand dieser Arbeit. Das *regA*-Gen ist ausschließlich in den kleinen somatischen Zellen aktiv, in denen es das reproduktive Potential – vornehmlich die Photosynthese (Meissner et al., 1999) – unterdrückt. Neuere Untersuchungen (Schmidt, 2004) sprechen dafür, daß RegA die Synthese von Sac1 (eines Sensors für Sulfatmangel) stimuliert; Sac1 wiederum unterdrückt die Expression photosynthetischer Gene (Wykoff et al., 1998). Das *regA*-Transkript tritt erstmals 12 h nach der ersten Zellteilung, das RegA-Protein jedoch erst 4 h später in Somazellen auf (Kirk et al., 1999); folglich muß zusätzlich zur zellspezifischen Transkription (Stark et al., 2001) die Translation von *regA* reguliert werden. Untersuchungen in dieser Arbeit zielten darauf ab, erstens die von RegA ausgeübte Genkontrolle und zweitens die Regulation der Translation des *regA*-Gens selbst besser zu verstehen. Mit diesen Vorgaben wurden (1) das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) von *V. carteri* charakterisiert und rekombinant exprimiert, (2) ausführliche Versuche zur heterologen Expression und Reinigung von RegA und spezifischen Antiseren unternommen und (3) Kontrollelemente der Translation in der 5'NTR von *regA* identifiziert.

### 5.1 Das *tbp*-Gen von *V. carteri*

Der ubiquitäre Transkriptionsfaktor TBP bindet sowohl an die DNA im Bereich der TATA-Box-Sequenz als auch an andere Proteine, die TAFs (TBP-assoziierte Faktoren). Es ist denkbar, daß auch RegA durch Bindung an das TBP-Protein seine regulatorische Funktion wahrnimmt. Das *tbp*-Gen von *V. carteri* (Anhang 8.1) setzt sich aus 6 Exons und 5 Introns zusammen. Die universelle hochkonservierte Kernregion (Abb. 14) beginnt in Exon 1 (Base 91 des kodierenden Bereichs), reicht bis in Exon 6 (Base 564 des kodierenden Bereichs) und umfaßt 159 AS-Reste. Insgesamt ist das Genprodukt 340 AS-Reste lang (36,8 kDa) und hat einen isoelektrischen Punkt von 10,1. Das *tbp*-Gen liegt als Einzelkopie-Gen im *Volvox*-Genom vor. Dafür sprechen *Southern*- und *Northern*-Analysen (Abb. 19);

auch in den *Chlamydomonas*- und *Volvox*-Datenbanken (Genomprojekte; JGI, Walnut Creek, CA, USA) sind keine Hinweise auf eine zweite Genkopie zu finden. Eine heterologe Expression von *tbp*-cDNA im *E. coli*-System war ohne Schwierigkeiten möglich. Das Protein konnte in homogener Form ausreichend gewonnen werden, so daß es für die Bindestudien und Antikörperproduktion einsetzbar ist.

Alle bekannten TBPs sind durch eine hochkonservierte Kernregion gekennzeichnet, in der zwei Kopien eines 62-Reste-Polypeptids für die DNA-Bindung liegen (Abb. 14, Abb. 15). Anders als tierische Sequenzen haben die *V. carteri* und *C. reinhardtii* Orthologen nur einen kurzen N-terminalen „Vorlauf“, aber eine lange (120 AS-Reste) C-terminale Domäne, eine Eigenart der *Volvocida*-TBPs, die bisher einzigartig ist. Obwohl diese Region zwischen den beiden Grünalgen-Orthologen deutlich variabler ist als der konservierte TBP-Kern, weisen diese doch interessante Übereinstimmungen auf (Abb. 20). Es zeigte sich, daß die Glutamine zwischen Position 249 bis Position 264, das AAAXMMPPPP-Motiv (Position 277 bis Position 282) und die Sequenz ab Position 321 (Positionsangaben wie in Abb. 20) konserviert sind (Abb. 47). Wahrscheinlich dient diese Region, wie die N-terminale Region bekannter tierischer TBPs, der Wechselwirkung mit regulatorischen Proteinen. Bei tierischen TBPs zeichnet sich die nicht-konservierte Region durch Glutamin-Reichtum aus, wie es ähnlich im C-terminalen Bereich der *V. carteri* und *C. reinhardtii* TBPs zu finden ist. Pflanzen-TBPs haben diese variable Region nicht (Anhang 8.1.3). Domänenverwandtschaften zwischen den beiden *Volvocida*-TBPs und Ähnlichkeiten mit zwei tierischen TBPs sind in Abb. 47 schematisch dargestellt. Sollte diese Region tatsächlich bei den Grünalgen ähnliche Funktionen erfüllen wie die der Tiere, so ist das *Volvocida*-TBP auf funktioneller Ebene den Tieren ähnlicher als den Pflanzen.

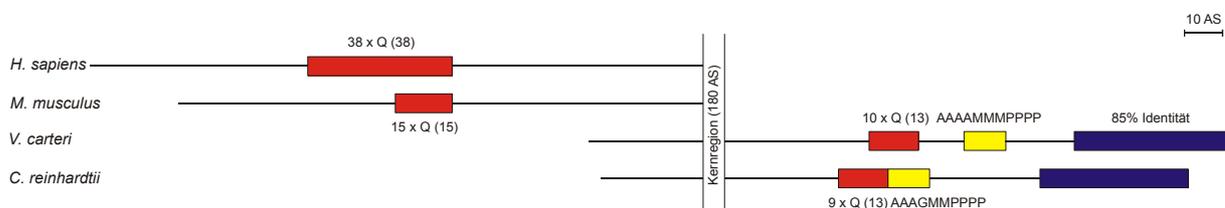


Abb. 47. **Schematische Darstellung nicht-konservierter Regionen von verschiedenen TBP-Proteinen.** Glutamin-reiche Regionen (in Klammern Gesamtlänge angegeben) sind rot, das AAAXMMPPPP-Motiv gelb und der konservierte C-Terminus blau markiert.

Die phylogenetische Einordnung der *Volvocida*-TBPs über ein *multiple alignment* (Anhang Abb. 54) resultierte in interessanten Verwandtschaftsbeziehungen. Zur Berechnung des Stammbaums wurden die Kernregionen der TBP-Proteine verwendet, da die nicht-konservierten Bereiche nicht bei allen Spezies vorhanden sind.

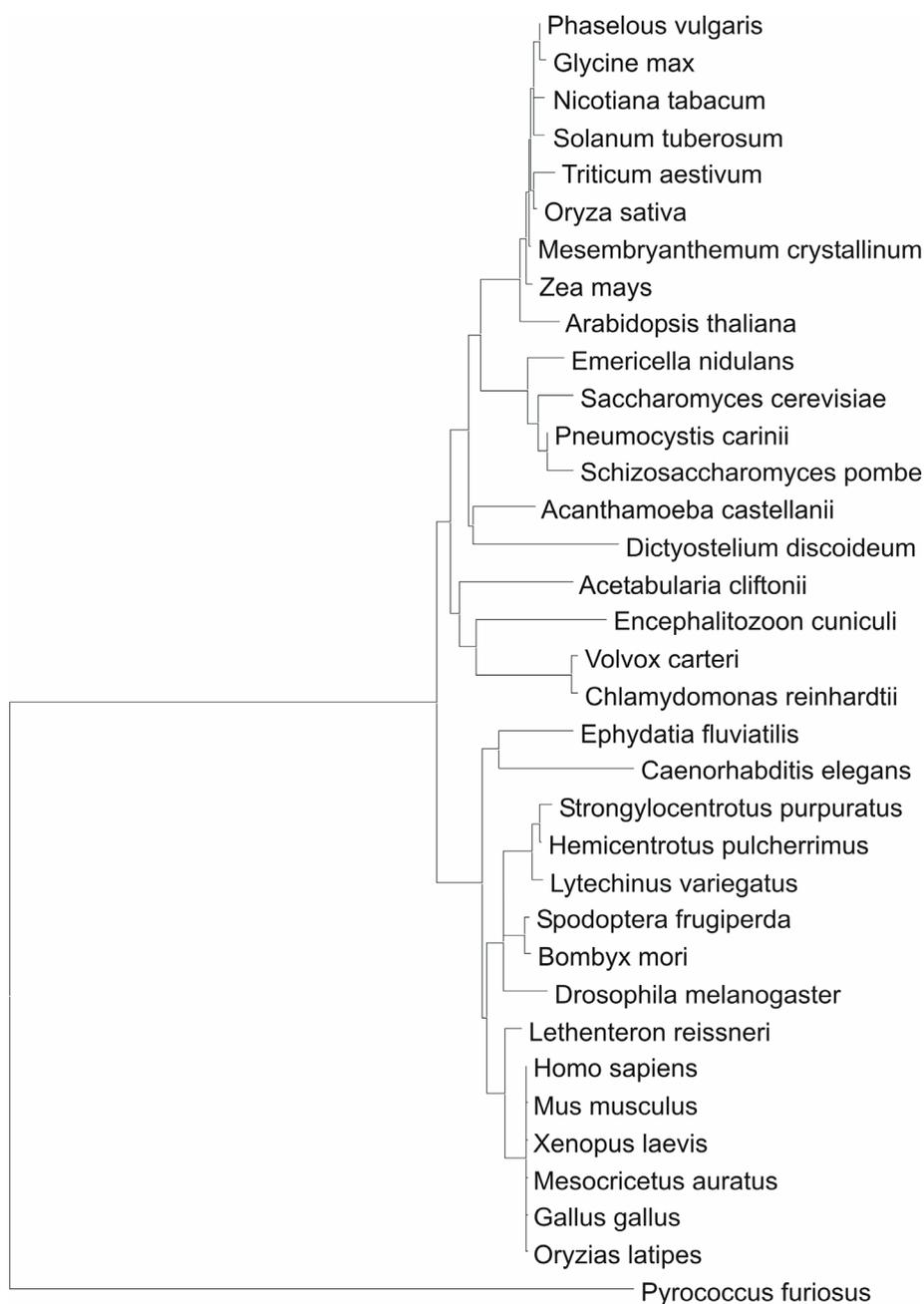


Abb. 48. **Phylogenetisches Dendrogramm der konservierten Kernregion von TBP-Proteinen aus 35 Spezies.** Das Dendrogramm wurde durch Vergleiche der konservierten Regionen (Position 173 bis Position 351; Anhang Abb. 54) mit dem Programm *PILEUP* (GCG-Paket) erstellt. *P.furiosus* diente als Außengruppe.

Wie das Dendrogramm (Abb. 48) zeigt, liegen die *V. carteri* und *C. reinhardtii* TBPs zwar auf der Pflanzen-Linie, aber als tiefe Abzweigung nahe der Tier-Pflanzen-Aufspaltung zusammen mit dem Mikrosporidium *Encephalitozoon cuniculi* und der großen einzelligen Alge *Acetabularia*. Mikrosporidien sind obligate Parasiten; sie werden als primitivste Eukaryonten eingestuft, weil sie (wie Bakterien) 70S Ribosomen enthalten, andererseits aber Kern und eine Golgi-ähnliche Röhre besitzen (Weiss, 2001). Die Tatsache, daß die *Volvocida* eine zentrale Komponente der Transkription mit deutlicher Verwandtschaft zu denen der einfachsten Eukaryonten enthalten, wirft eine interessantes Licht auf die Evolution dieser Grünalgen. Obwohl die Evolution der kolonialen und differenzierten *Volvocida* vor vergleichsweise kurzer Zeit, nämlich innerhalb der letzten 50 Mio. Jahre stattgefunden hat (Larson et al., 1992; Rausch et al., 1989), weist die hier abgeleitete TBP-Ähnlichkeit auf einen Ursprung wichtiger Komponenten nahe der Aufspaltung in Tiere und Pflanzen vor 1,2 Mrd. Jahren hin. Vorausgesetzt, daß nicht ein späterer horizontaler Gentransfer (durch einen Parasiten) im Spiel ist, würde dieser Befund auf eine sehr lange Linie des gemeinsamen (einzelligen) Vorfahren der *Volvocida* hindeuten. Dafür sprechen übrigens auch die Verwandtschaftsbeziehungen der Histon-Gene von *Volvox* und *Chlamydomonas* (Schmitt et al., 1998).

## 5.2 Rekombinante Expression von RegA und Herstellung von Anti-RegA-Antiseren

Intensive Bemühungen, das intakte RegA-Protein rekombinant zu exprimieren, hatten nur begrenzten Erfolg. Die Standard-Wirte, *E. coli* und *S. pombe*, waren nicht in der Lage, RegA vollständig zu produzieren. Fehlende Übereinstimmungen in der *codon usage*, aber auch Unverträglichkeiten, die zum Absterben der Wirtskulturen führten, waren Gründe für das Scheitern dieser Versuche. Einzig in einem eukaryontischen System, nämlich in Insekten-Zellkulturen, infiziert mit gentechnisch veränderten Baculovirus-Vektoren, konnten minimale Mengen eines Proteins der erwarteten Größe (Abb. 26) exprimiert werden. Aber auch hier traten definierte, verkürzte Polypeptide auf, die auf unvollständige *regA*-Translation im heterologen System schließen ließen. Ursachen dürften u.a. Inkompatibilitäten in der Benutzung in *T. ni* seltener Codons wie CCG (Prolin), CAA und CAG (Glutamin) sein (Kane, 1995; Novy et al., 2001), die im *regA*-Transkript häufig auftreten (Anhang 8.2). Deshalb wurden ein im *E. coli*-System exprimiertes RegA-Teilfragment, RegA/1 (393 AS-Reste; Abb. 22), und eine Mischung der RegA-Translationsprodukte aus dem Insektenzell-System (Abb. 26) zur Immunisierung von Kaninchen herangezogen. Die gereinigten Ak zeigten auch deutliche Spezifität für RegA (Abb. 28, Abb. 29); Kreuzreaktionen waren aber nie ganz zu eliminieren. Immerhin konnte RegA deutlich in Extrakten zweier Transformanten mit hohen Kopienzahlen detektiert werden (2.14, A2-12; Abb. 28). Leider war die Empfindlichkeit der Antiseren nicht hoch genug, um auch RegA-Protein, das von der endogenen Einzelkopie des *regA*-Gens produziert wird, in WT-Extrakten (Abb. 28) zu detektieren.

Das wäre v.a. für phylogenetische Untersuchungen von großem Wert gewesen, Analysen, welche die Verbreitung von RegA in verschiedenen *Volvocida*-Linien angezeigt hätten. Ergebnisse auf der Grundlage von 18S und 28S rRNA-Sequenzen (Larson et al., 1992; Rausch et al., 1989) haben einerseits gezeigt, daß die Familie der *Volvocales* eine kohärente einheitliche Gruppe bildet, die eng mit *C. reinhardtii* verwandt ist, andererseits aber Spezies wie *V. aureus*, *V. powersii* oder *V. capensis* eigene Linien bilden, das Genus *Volvox* also mehrmals polyphyletisch evolviert ist (Schmitt et al., 1998, Abb. 49).

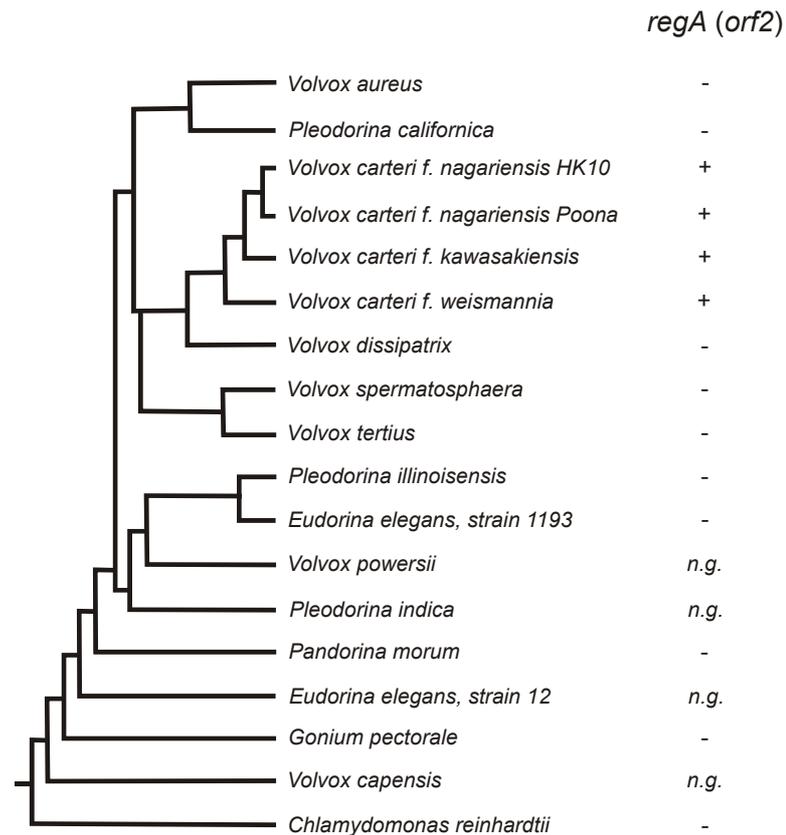


Abb. 49. Dendrogramm, der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen 18 *Volvocida* (modifiziert nach Schmitt et al., 1998). Grundlage sind rRNA- und Klasse II-Intron-Sequenzvergleiche. Ergebnisse des *regA(orf2)*-screening (4.3.6.1, 4.3.6.2) sind gezeigt: +, *orf2*-Sequenz vorhanden; -, *orf2*-Sequenz nicht vorhanden; n.g., nicht getestet.

Vor diesem Hintergrund sind zwei Fragen zur Klärung von Prinzipien der molekularen Evolution von großem Interesse:

1. Folgen diese unabhängigen *Volvox*-Evolutionen dem gleichen molekularen Muster, indem sie die Keimbahn-Soma-Dichotomie unter die Kontrolle eines RegA-ähnlichen „master regulator“ stellen?
2. Gibt es Vorläufer oder wenigstens Einzeldomänen des RegA-Proteins bei den einfachen kolonialen Verwandten, einen Regulator, der in dieser Form erst für die Zelldifferenzierung bei *Volvox* erforderlich ist?

Beide Fragen könnten mit hochspezifischen Anti-RegA-Antisera einer Lösung zugeführt werden. Immerhin wurde, auch ohne hochempfindliche spezifische Ak, auf einem anderen Weg eine Teilantwort auf die erste Frage gefunden: Eine hochkonservierte DNA-Sequenz, *orf2*, im *regA*-Gen von *V. carteri f. nagariensis* wurde benutzt, um mittels konservierter und

degenerierter Primer entsprechende Sequenzen aus anderen *Volvox*-Spezies zu amplifizieren und anhand der gewonnenen Sequenzen Rückschlüsse auf die Präsenz des *regA*-Gens in diesen Vertretern der *Volvocida* und dem Grad der Verwandtschaft zu ziehen. Dabei stellte sich heraus, daß diese Sequenz nur in den *V. carteri*-Vertretern auftritt (4.3.6.1, 4.3.6.2, Abb. 49). Daraus ist zu folgern, daß molekulare Variationen in der Evolution zur Kugelalge mit Zelldifferenzierung auftraten, deren Aufklärung und Vergleich mit bereits Bekanntem hochinteressante Konsequenzen für unser Verständnis der molekularen Grundlagen der Zelldifferenzierung haben würde.

### 5.3 Die 5' nicht-translatierte Region von *regA* und ihre Bedeutung für die *regA*-Translation

Die 5'NTR (940 bp; Abb. 31) von *regA* enthält acht ATG-Triplets als potentielle Elemente der Translationskontrolle von *regA* (Kozak, 2002). ATG9 und ATG10 können als Translationsstarts für die RegA-Proteinsynthese fungieren; allerdings komplementiert die kürzere Variante (-33 AS-Reste) ein defektes *regA* $\Delta$  deutlich schlechter. Gezielte Substitutionen von ATG1 bis ATG7 (durch TGG) hatten jeweils eine reduzierte Komplementationsrate zwischen 22 % und 78 % der WT-Kontrolle zur Folge; gravierende Effekte zeigten allein die Mutationen von ATG1 (22 %; Abb. 33, Tab. 15) und ATG2 (35 %; Abb. 33, Tab. 15). ATG2 ist durch eine nahezu perfekte Kozak-Sequenz (Tab. 13) und den längsten offenen Leserahmen (ORF2, 426 bp) in der 5'NTR ausgezeichnet. Die Einführung eines Doppelstopps in diesen Leserahmen resultiert in 2/27 M-Reg-Kolonien entsprechend einer Teilkomplementation von 7 % (Tab. 18). Diese Daten weisen ATG2 eine besondere Rolle in der *regA*-Translationskontrolle zu. Es ist ungewiß, ob ein schwaches *orf2*-Transkript inklusive Intron 2, das weniger als 10 % der *regA* mRNA ausmacht (Abb. 45), oder dessen mögliche, aber nicht nachzuweisende Translation zu einem 95 AS-Reste Polypeptid eine Rolle in der Translationskontrolle des *regA*-Gens spielen. Signifikanter erscheint die extreme Konservierung von 82 % bis 98 % der Nukleotidumgebung von ORF2 zwischen den Orthologen von vier *V. carteri*-Spezies. Welche Schlüsse lassen sich aus den experimentellen Daten ziehen?

Den AUGs in längeren, nicht-kodierenden 5'Regionen einer eukaryontischen mRNA wird in der Regel die Rolle von „Ribosomenfängern“ beim *leaky scanning* zugeordnet (Kozak, 2002). Dem AUG mit der besten Kozak-Sequenz (4.3) fällt dann häufig die Funktion des Translationsstarts zu. Im *regA*-Transkript weist AUG2 die beste Kozak-Umgebung auf (Tab. 13), aber den eigentlichen Start markieren AUG9 bzw. AUG10 (Abb. 30). Deshalb muß AUG2 samt ORF2 hier eine andere Funktion zufallen. Ferner impliziert der Mechanismus des *leaky scanning*, daß jedes AUG oberhalb AUG9 einen Teil der Translations-Initiationskomplexe „einfängt“ und an ihrer eigentlichen Funktion in der Proteinsynthese hindert. Die Elimination jedes *upstream* AUGs (mittels Substitution durch TGG) sollte daher die Translationsrate erhöhen (Wang & Rothnagel, 2004) und nicht die Komplementationsfähigkeit wie hier (Tab. 15) erniedrigen. Folglich können die Daten durch *leaky scanning* nicht erklärt werden. Welche weiteren Mechanismen der Translationskontrolle

kommen in Frage? Drei Mechanismen, die in der Literatur zur Translationsregulation diskutiert werden, sind (1) Reinitiation, (2) IRES (*internal ribosome entry site*) und (3) das *ribosome shunting*.

(1) Reinitiation tritt in mRNAs auf, die kurze offene Leserahmen nahe dem 5'Ende besitzen. Nach der Translation des ersten *upstream* gelegenen ORF dissoziiert vermutlich die 60S-Ribosomenuntereinheit ab, während die 40S-Untereinheit an der mRNA gebunden bleibt, das *scanning* wieder aufnimmt und am nächsten AUG die Translation erneut initiiert. Damit dies möglich ist, muß die 40S-Untereinheit wieder mit der Met-tRNA beladen werden (Kozak, 2002). Dieser Vorgang kann unter optimalen Bedingungen fünfmal stattfinden (Wang & Rothnagel, 2004). Mit den mRNAs von z.B. GCN4 (Hefe; Gaba et al., 2001) und FGF5 (Mensch; Bates et al., 1991) konnte dieser Mechanismus gezeigt werden. Auch hier fungieren die offenen Leserahmen als „Ribosomenfänger“. Mutationen, die die Translation solcher ORFs verhindern, sollten die Translationseffizienz, analog dem *leaky scanning*, erhöhen, statt wie hier erniedrigen (Tab. 15, Tab. 18).

(2) IRES (Hellen & Sarnow, 2001) treten in langen, nicht-kodierenden Regionen von Virus-mRNAs, aber auch bei zellulären mRNAs, wie z.B. bei GTX aus Maus (Hu et al., 1999), auf. Die IRES-enthaltenden 5'NTRs umfassen einige hundert Nukleotide und können ausgeprägte Sekundärstrukturen aufweisen. Ein Merkmal für virale IRES ist die Folge von vielen Pyrimidin-Nukleotiden in relativ kurzem Abstand vor dem Start-AUG (Hellen & Sarnow, 2001). An die Pyrimidin-reichen Abschnitte binden zelluläre Proteine, die wiederum die Anlagerung aller Initiationsfaktoren, analog zur Initiation an der *5'cap*, ermöglichen. Ähnlichkeiten zwischen den zellulären IRES verschiedener Gene und Spezies sind kaum zu erkennen (Hellen & Sarnow, 2001), so daß mit diesen Kriterien kein solches Element in der 5'NTR von *regA* ausgemacht werden konnte. Wie beim Mechanismus des *leaky scanning* würde man im Falle von IRES-vermittelter Translationsinitiation, die unabhängig von *upstream* AUG-Codons ist, normale Translation erwarten. Eine Abwandlung von ATG1 und ATG2 durch gezielte Mutationen (Tab. 15, Tab. 18) sollte nicht, wie in der 5'NTR von *regA*, zur Verringerung der Translationsraten führen (Hellen & Sarnow, 2001; Pelletier et al., 1988). Deshalb wurde ein weiterer Mechanismus der Translationskontrolle, das *ribosome shunting*, als zutreffendes Konzept zur Klärung der Verhältnisse beim *regA*-Gen von *V. carteri* herangezogen.

(3) Anhand gut untersuchter Beispiele, wie der 35S mRNA des *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV; Futterer et al., 1993), späten adenoviralen mRNAs (Yueh & Schneider, 1996; Yueh

& Schneider, 2000) und der humanen *hsp70* mRNA (Yueh & Schneider, 2000), wurde folgende Vorstellung zum Prozess des *ribosome shunting* entwickelt (Xi et al., 2004): Der Translations-Initiationskomplex bindet, wie auch beim *5' ribosome scanning*, an die *5'cap* der mRNA und beginnt mit dem *scanning*. Dabei kann, wie bei der 35S mRNA von CaMV, die Translation eines kurzen Leserahmens notwendig sein (Pooggin et al., 2000). Trifft der Komplex auf eine stabile Sekundärstruktur in der mRNA, wird er am Fortschreiten gehindert. Der 40S-Komplex dissoziiert von der mRNA und wandert zu einer definierten Bindungsstelle unterhalb des Sekundärstruktur-Blocks. Ob eine gerichtete Bewegung oder Diffusion und zufälliges „Andocken“ stattfindet, ist unbekannt. Komplementäre Sequenzen zum 3'Ende der 18S rRNA stellen vermutlich die Ribosomen-Bindestelle auf der mRNA dar (Yueh & Schneider, 2000). Nach der Versetzung nimmt der 40S-Initiationskomplex sein *scanning* wieder auf, bis er ein geeignetes AUG-Startcodon für die Translationsinitiation erreicht.

Was spricht für die Gültigkeit dieses Mechanismus bei der *regA*-Translation?

Abb. 50/B zeigt als Graphik eine berechnete Sekundärstruktur der 5'NTR von *regA*, die laut dem Programm *mfold* (Zuker, 2003) die höchste freie Enthalpie (-268 kcal/mol) und somit die größte Stabilität aufweist. Eine komplexe Struktur aus mehreren Haarnadelschleifen liegt im Bereich von AUG2, wie aus einer Korrelation mit der linearen Darstellung (Abb. 50/A, Positionen 215-277) zu entnehmen ist.

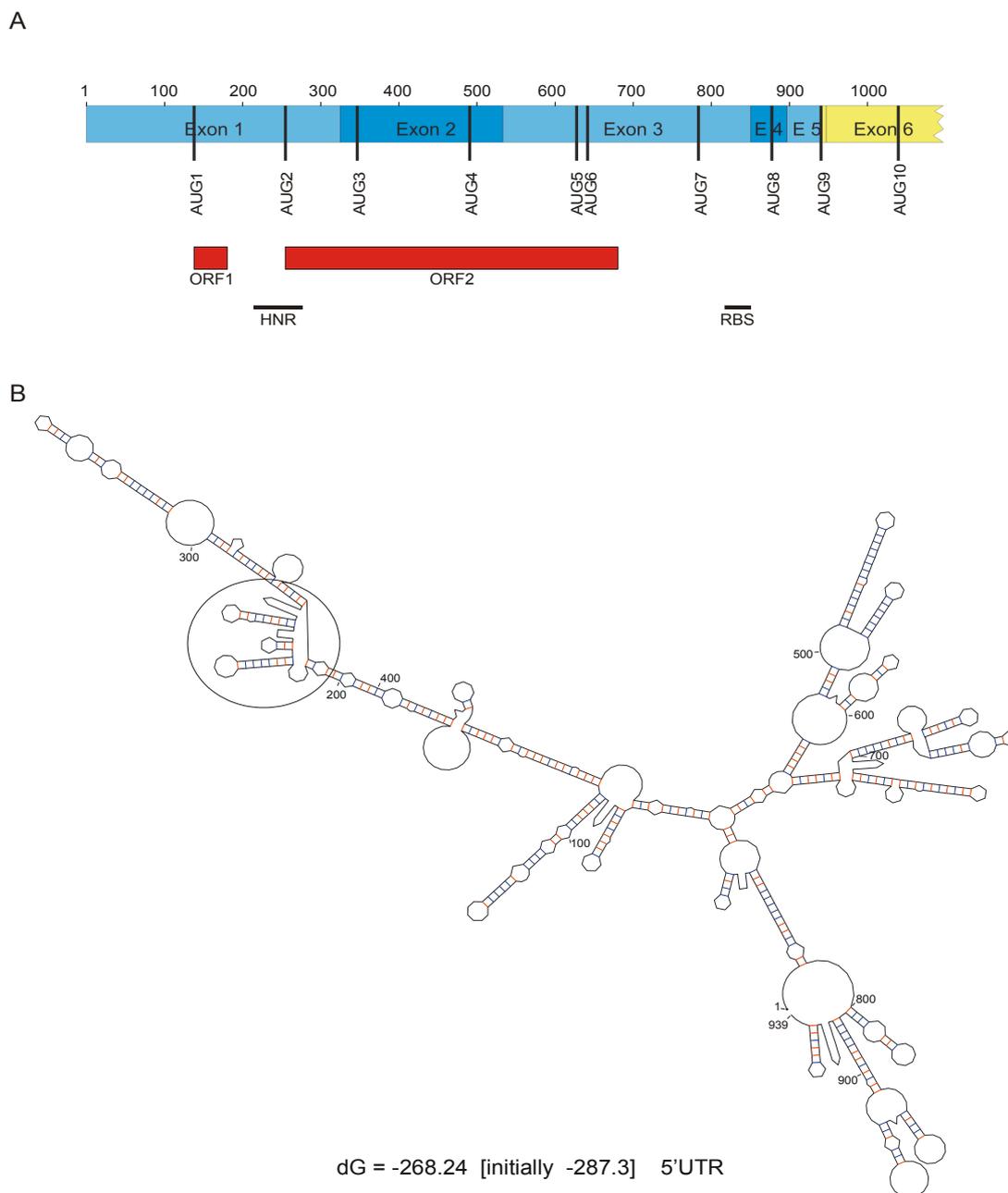


Abb. 50. Transkript der 5'NTR von *regA* (wie Abb. 31, mit nt-Nummerierung und Positionen der *ribosome shunting*-Elemente; **A**) und mRNA-Sekundärstruktur der gesamten 5'NTR (**B**). HNR, Haarnadelstruktur-Region; RBS, Ribosomen-Bindestelle. Die in B gezeigte Struktur wurde mit Hilfe des Programms *mfold* Version 3.1 (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003) erstellt. Die freie Enthalpie ( $\Delta G$ ) beträgt -268 kcal/mol. Die Basenpaarungen sind durch farbige Linien gekennzeichnet (rot: 3 Wasserstoffbrücken, blau: 2 Wasserstoffbrücken). Die Nummerierung entspricht der in A.

Diese komplexe Sekundärstruktur in der mRNA ähnelt sehr den zitierten Translationshemmenden Strukturen in der adenoviralen mRNA (*tripartite leader*-Sequenz; Yueh &

Schneider, 2000), die durch RNA-Helikase (eIF4A) nicht ohne weiteres zu öffnen sind, und wäre damit ein potentieller Kandidat für den Block. Dieses Strukturelement enthält in der dritten Haarnadelschleife die Positionen der ATG2- (Tab. 15) und der Doppelstopp-Mutation (Tab. 18), wie in einer vergrößerten Graphik (Abb. 51) gezeigt.

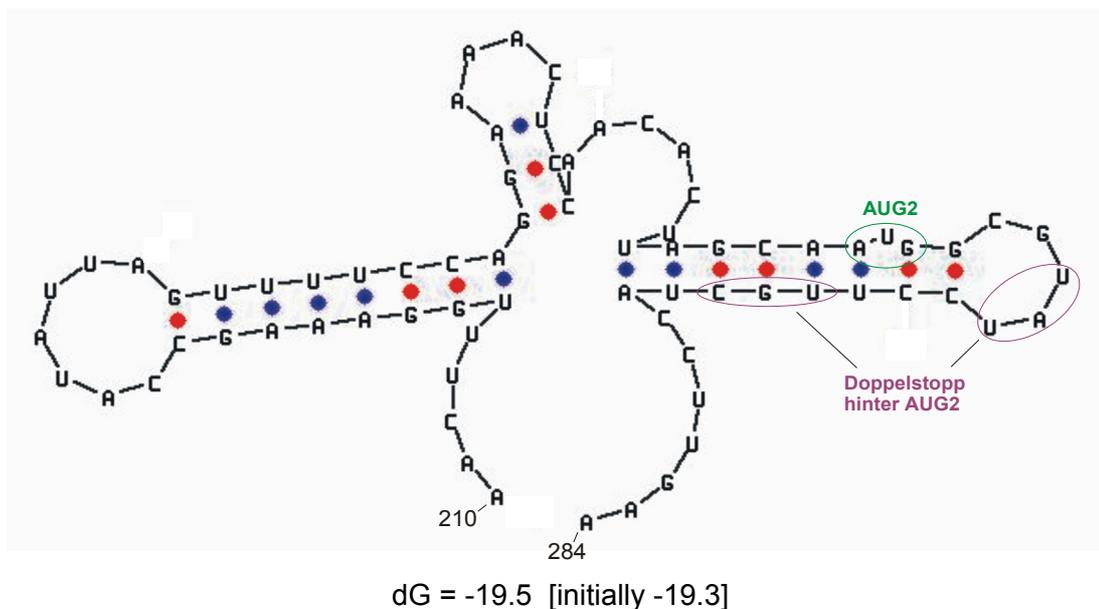


Abb. 51: **Vergrößerte Darstellung der Haarnadelstruktur aus Abb. 50/B (Base 210 bis Base 284 der *regA*-mRNA)**. Die Struktur wurde mit Hilfe des Programms *mfold* Version 3.1 (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003) erstellt. Die freie Enthalpie ( $\Delta G$ ) dieser Struktur beträgt etwa -20 kcal/mol. Die Basenpaarungen sind durch farbige Punkte gekennzeichnet (rot: 3 Wasserstoffbrücken, blau: 2 Wasserstoffbrücken). Die Position von AUG2 ist grün und die des Doppelstopps violett markiert.

Diese Mutationen, sowohl ATG2 als auch ATG2Stop, verändern diesen Bereich, so daß die Haarnadelstruktur und damit eventuell der Translations-Block verloren geht (Abb. 52). Ferner könnten spezielle Initiationsfaktoren, die für das *ribosome shunting* und den Transfer des 40S-Komplexes erforderlich sind, an eine bestimmte Haarnadelstruktur gebunden und adaptiert sein, so daß Veränderungen der Struktur nicht toleriert werden.

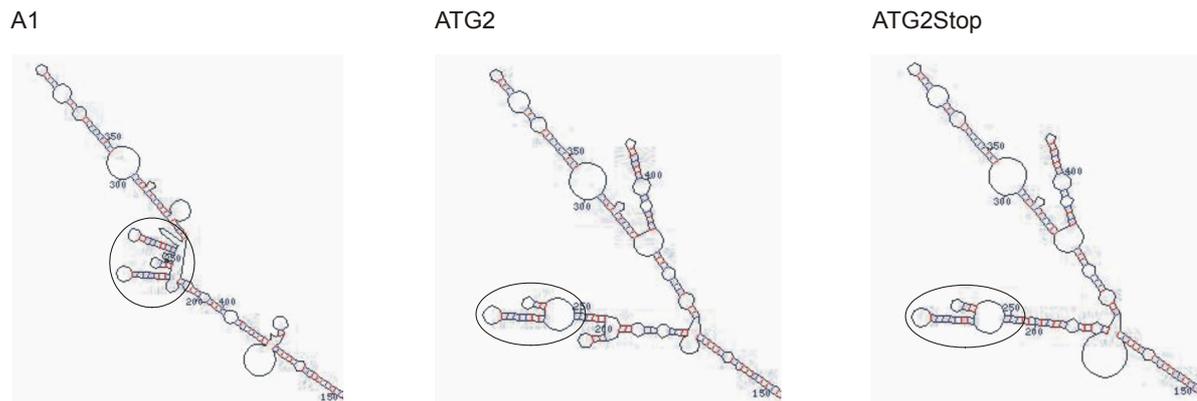


Abb. 52. Vergleich der Sekundärstrukturen der *regA* mRNA von WT *regA* (A1), mit der ATG2-Mutation (ATG2) und dem Doppelstopp hinter ATG2 (ATG2Stop). Gezeigt ist der Bereich, der sich durch die Sequenzänderung verändert hat. Der Bereich der Haarnadelstruktur von Abb. 51 ist jeweils markiert.

Für den Mechanismus des *ribosome shunting* ist neben der Sequenz des Translations-Blocks (Abb. 50/B, HNR) noch eine zweite Region, nämlich ein komplementärer Bereich zum 3'Ende der 18S rRNA, wichtig (Yueh & Schneider, 2000). Solche Sequenzbereiche sind für ein effizientes *ribosome shunting* bei Adenoviren und dem humanen *hsp70*-Gen notwendig. Es wird vermutet, daß sie für die erneute Ribosomenbindung an die mRNA verantwortlich sind. Werden sie verändert, funktioniert dieser Mechanismus nicht mehr (Yueh & Schneider, 2000). In der 5'NTR des *regA*-Gens konnte eine entsprechende Sequenz am 3'Ende von Exon 3 (Base 816 – Base 849 der Abb. 50/A; Abb. 53) lokalisiert werden, die zum 3'Ende der 18S rRNA von *V. carteri* (Rausch et al., 1989) komplementär ist und in Größe und Komplementarität bisher bekannten Beispielen entspricht (Yueh & Schneider, 2000).



Abb. 53. Schema der beiden komplementären Bereiche zwischen der 3'Haarnadelstruktur der 18S rRNA (Base 1748-Base 1788) von *V. carteri* und dem 3'Ende von Exon 3 des *regA*-Gens (Base 816-Base 849 der cDNA). Komplementäre Bereiche sind durch | gekennzeichnet. In blau wurden die möglichen komplementären Boxen markiert, die in ähnlicher Form in der *tripartite leader*-Sequenz (Adenovirus) und der 5'NTR des *hsp70*-Gens (Mensch) vorkommen. N, maximaler komplementärer Bereich zwischen *tripartite leader*-Sequenz und 18S rRNA, der jeweils aus den drei vorkommenden Wiederholungen dieser Boxen zusammengefasst wurde (vgl. Yueh & Schneider, 2000), N, komplementärer Bereich zwischen *hsp70* 5'NTR und 18S rRNA

Wie könnte man sich das *ribosome shunting* im Falle der *regA* mRNA vorstellen?

Der Translationsvorgang startet mit der Bindung des Translations-Initiationskomplexes an die 5'cap der mRNA und trifft auf AUG1. ORF1 wird in ein 14 AS-Reste langes Polypeptid übersetzt. Die Translation eines derart kurzen ORF mit anschließender Reinitiation ist beim CaMV von großer Bedeutung für die Translation des Zielgens (Pooggin et al., 2000). Dies würde den dramatischen Effekt der Mutation von ATG1 (Tab. 15) erklären. Der Komplex trifft 30 nt *downstream* auf die blockierende Haarnadelstruktur (Abb. 50) und setzt den Prozess des *ribosome shunting* in Gang. Vorausgesetzt, daß bestimmte Proteine, eventuell Zellzyklus-abhängig, zur Verfügung stehen müssen, um den Block zu überwinden, wäre dies der Punkt, wo die beobachtete Translationsverzögerung von 4 h (Kirk et al., 1999) gesteuert werden könnte. Ferner kann hier die Translationsrate von *regA* durch Dosierung der 40S-Komplexe, die den Block erfolgreich durch *ribosome shunting* (positiv für *regA*-Translation) oder durch ihre Helikase-Aktivität (negativ für *regA*-Translation) passieren, kontrolliert werden. Schließlich macht dieses Modell verständlich, warum Mutationen in ATG1, ATG2 und ORF2 *cis*-dominant wirken, ohne kompensierende Wirkung der nicht mutierten mRNA des endogenen *orf2*.

## 5.4 Ausblick

Zwei weitere Experimente könnten zur Stützung des vorgeschlagenen Modells der *regA*-Translation beitragen:

1. Eine Deletion des Bereichs der 18S-Komplementarität in der 5'NTR müßte zu einer signifikanten Reduktion der Komplementationsrate führen, weil das *ribosome shunting* nicht funktioniert.
2. Eine extrem stabile Haarnadelstruktur, wie z.B. der „Kozak-stem“ (Futterer & Hohn, 1991; Kozak, 1989), sollte im Bereich der Base 290 der mRNA (Abb. 50) zusätzlich eingefügt und getestet werden. Bei Komplementationsanalysen dürfte das Komplementationsvermögen dann nicht verloren gehen, weil durch *ribosome shunting* diese Struktur überwunden werden kann.

## 6. Zusammenfassung

Die grüne Kugelalge *Volvox carteri* zählt mit nur zwei Zelltypen – somatischen und reproduktiven – zu den einfachsten Modellorganismen für das Studium der Zelldifferenzierung. Diese wird von drei Genorten – *gonidialess (gls)*, *late gonidia (lag)* und *somatic regenerator (regA)* – gesteuert; *gls* und *regA* wurden bereits isoliert und charakterisiert. Das Produkt des *regA*-Gens unterdrückt in Somazellen die Expression reproduktiver Funktionen, vornehmlich die Transkription von Genen für Chloroplasten-Proteine, und erhält damit den Differenzierungszustand somatischer Zellen. Die Transkription von *regA* selbst findet ausschließlich in Somazellen statt und setzt nach Abschluß der Embryogenese, 12 h nach der ersten Zellteilung, ein. Sie wird durch zwei *enhancer*- und ein *silencer*-Element kontrolliert. Erst 4 h später wird RegA-Protein synthetisiert; folglich muß zusätzlich zur Transkription die Translation von *regA* einer Regulation unterliegen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Translationskontrolle(n) von *regA*, eines Schlüsseligens der *Volvox*-Differenzierung, zu analysieren und aufzuklären. Experimenten für die Durchführung von *in vitro*-Untersuchungen mit rekombinantem RegA zur Herstellung empfindlicher Anti-RegA-Antikörper waren, u.a. wegen der Größe des 111 kDa-RegA-Proteins, nur Teilerfolge beschieden. Mittels systematischer Komplementations-Analysen mit definierten *regA*-Mutationen konnte dann *in vivo* demonstriert werden, daß Kontrollelemente in der 5' nicht-translatierten Region (5'NTR) des *regA*-Gens die Translation regulieren. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Als Basis für Bindestudien von RegA wurde das *Volvox*-Gen *tbp* für das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) isoliert und rekombinant exprimiert. Das *single-copy* Gen erstreckt sich über einen genomischen Bereich von ca. 4 kb, enthält sechs Exons und fünf Introns und kodiert für ein Protein mit 340 AS-Resten. Das Transkript wird durch zwei verschiedene PolyA-Signale terminiert und ist ca. 2250 (erstes PolyA-Signal) bzw. 2350 bp (zweites PolyA-Signal) lang. Ein Vergleich mit bekannten TBP-Proteinen zeigte, daß die Kernregion hochkonserviert ist und Verwandtschaft zu TBPs einfachster Eukaryonten (Mikrosporidien) aufweist. Als Novum gegenüber tierischen und pflanzlichen TBPs trägt es eine 120 AS-Reste lange C-terminale Domäne mit prominenten Glutamin-, Alanin- und Prolin-Clustern, die auf eine regulatorische Funktion (ähnlich den

N-terminalen Domänen tierischer TBPs) hindeuten. Die heterologe Expression von *tbp* cDNA im *E. coli*-System und die Reinigung von rekombinantem TBP verlief problemlos.

2. Die heterologe Expression von *regA* cDNA im *E. coli*- oder Insektenzell-System bereitete dagegen Probleme wegen Inkompatibilitäten von *codon usage* und (toxischen) Expressionsprodukten mit dem Wirtsorganismus. Im *E. coli*-System gelang aber die Expression eines 393 AS-Reste langen N-Terminalen Fragments (RegA/1) des 1049-Reste RegA-Proteins. Ferner wurde mit dem Baculovirus-Insektenzell-System geringe Mengen von RegA und eine Serie von C-terminal verkürzten Fragmenten gewonnen, die auf unvollständige Translation von *regA* zurückgeführt wurden. Gegen RegA/1 und gegen die Mischung von verkürzten RegA-Fragmenten wurden spezifische Antikörper hergestellt und gereinigt. Diese waren genügend empfindlich, um rekombinantes RegA und das RegA-Protein in Überexpressions-Stämmen, nicht aber im WT-*Volvox*-Stamm HK10, zu detektieren.
3. Der 12,5 kb-Genlocus von *regA* enthält acht Exons, sieben Introns, eine 940 bp 5'NTR und eine längere 3'NTR mit PolyA-Signal. Das *regA*-Transkript ist 6725 nt lang und kodiert für ein 1049-Reste RegA-Protein. Vier nicht-kodierende Exons in der 5'NTR enthalten acht ATG-Triplets (ATG1-ATG8); mit ATG9 am Ende des Exons 5 beginnt der offene Leserahmen von *regA* (*regA* ORF). Die Bedeutung der ATG-Triplets für die Translation des *regA*-Transkripts wurde mittels Komplementation mit ATG nach TGG-Mutationen im *Volvox*-Stamm 153-68 getestet, der ein defektes *regA*-Gen (*regA*Δ) enthält. Der Erfolg eines Komplementations-Experiments wurde durch Wechsel von der *regenerator*- (*Reg*<sup>-</sup>) zur WT-Morphologie festgestellt. Aus diesen Analysen resultierten folgende Ergebnisse:
  - (a) ATG9 oder ATG10 können als Translationsstart für funktionelles RegA dienen; das um 33 AS-Reste verkürzte Protein (ATG10 Start) komplementiert allerdings nicht so effizient wie die längere Variante (ATG9 Start).
  - (b) Gezielte Substitutionen von ATG1 bis ATG7 durch TGG resultierten alle in reduzierten Komplementationsraten von 22 % bis 78 % der WT-Kontrolle. Gravierende Effekte zeigten aber nur die ATG1- (22 %) und ATG2-Mutationen (35 %).

- (c) ATG2 ist durch eine nahezu optimale Kozak-Sequenzumgebung als Translationsstart ausgezeichnet (gefolgt von ATG10). *Downstream* von ATG2 folgt ein offener Leserahmen (ORF2, 142 AS-Reste). Tatsächlich resultiert die Einführung von zwei *nonsense* Codons (Doppelstopp) in einer weiteren Reduktion der Komplementationsrate auf 13 % und die beiden einzigen positiven Kolonien werden durch einen Mischphänotyp zwischen WT und  $\text{Reg}^-$  (M-Reg) gekennzeichnet. Das weist ORF2 eine besondere Bedeutung in der *regA*-Translationskontrolle zu.
- (d) Tatsächlich wurde ein sekundäres 730bp-Transkript (< 10 % des *regA*-Transkripts) identifiziert, das an einem PolyA-Signal (Exon 4) mit Polyadenylierungsstelle (Exon 5) endet. Interessanterweise enthält dieses Transkript (anders als das *regA*-Transkript) das Intron 2, während Intron 1, Intron 3 und Intron 4 herausgespleißt werden. Dadurch endet der kodierende Bereich von *orf2* bereits bei einem Stopp im Intron 2 nach 95 Codons. Ein Orf2-Protein wurde – auch nach Markierung mit einem (HA)<sub>3</sub>-Epitop - nicht detektiert.
- (e) Im Vergleich mit den Sequenzen aus drei *V. carteri*-Vertretern (*V. carteri* f. *nagariensis* Poona; *V. carteri* f. *kawasakiensis* und *V. carteri* f. *weismannia*) weist die ORF2-Region eine erstaunliche Konservierung der DNA-Sequenzen zwischen 98 % und 82 % auf. Dies ist ein starkes Indiz für die Signifikanz der Nukleotidsequenzen von DNA und RNA dieser Region (und nicht der eines potentiellen Translationsprodukts). Eine computergestützte Analyse ergab eine komplexe Haarnadelstruktur in diesem Bereich, wie sie in einigen anderen Systemen beim *ribosome shunting* auftritt. Die Kontrolle der konservierten ORF2-Sequenz über die *regA*-Translation wird daher modellhaft durch dieses Regulationsmodell am besten erklärt.

## 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.

**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.

**Arrick, B. A., Lee, A. L., Grendell, R. L. & Derynck, R.** (1991). Inhibition of translation of transforming growth factor-beta 3 mRNA by its 5' untranslated region. *Mol Cell Biol* **11**: 4306-4313.

**Bachmann, B. J.** (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**: 130-197.

**Bates, B., Hardin, J., Zhan, X., Drickamer, K. & Goldfarb, M.** (1991). Biosynthesis of human fibroblast growth factor-5. *Mol Cell Biol* **11**: 1840-1845

**Choi, G., Przybylska, M. & Straus, D.** (1996). Three abundant germ line-specific transcripts in *Volvox carteri* encode photosynthetic proteins. *Curr Genet* **30**: 347-355.

**Cowell, I. G.** (1994). Repression versus activation in the control of gene transcription. *Trends Biochem Sci* **19**: 38-42.

**Cresnar, B., Mages, W., Muller, K., Salbaum, J. M. & Schmitt, R.** (1990). Structure and expression of a single actin gene in *Volvox carteri*. *Curr Genet* **18**: 337-346.

**Dobell, C.** (1932). Antony van Leeuwenhoek and his "little animals". Bale, Sone and Danielsson, London

**Eschenwecker, K.** (2000). Heterologe Expression des *regA*-Gens von *Volvox carteri* in Insekten- und *Chlamydomonas*-Zellen und Reinigung des rekombinanten Proteins. Diplomarbeit. Universität Regensburg.

**Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poustka, A. & Murray, N.** (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**: 827-842.

**Futterer, J. & Hohn, T.** (1991). Translation of a polycistronic mRNA in the presence of the cauliflower mosaic virus transactivator protein. *Embo J* **10**: 3887-3896.

**Futterer, J., Kiss-Laszlo, Z. & Hohn, T.** (1993). Nonlinear ribosome migration on cauliflower mosaic virus 35S RNA. *Cell* **73**: 789-802.

- Gaba, A., Wang, Z., Krishnamoorthy, T., Hinnebusch, A. G. & Sachs, M. S.** (2001). Physical evidence for distinct mechanisms of translational control by upstream open reading frames. *Embo J* **20**: 6453-6463
- Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Roeder, R. G. & Chua, N. H.** (1990). *Arabidopsis thaliana* contains two genes for TFIID. *Nature* **346**: 390-394.
- Green, K. J. & Kirk, D. L.** (1981). Cleavage patterns, cell lineages, and development of a cytoplasmic bridge system in *Volvox* embryos. *J Cell Biol* **91**: 743-755.
- 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. & Kirk, D. L.** (2000). The developmentally regulated ECM glycoprotein ISG plays an essential role in organizing the ECM and orienting the cells of *Volvox*. *J Cell Sci* **113 Pt 24**: 4605-4617.
- Hallmann, A. & Sumper, M.** (1994). Reporter genes and highly regulated promoters as tools for transformation experiments in *Volvox carteri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11562-11566.
- Hanna-Rose, W. & Hansen, U.** (1996). Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet* **12**: 229-234.
- Hellen, C. U. & Sarnow, P.** (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**: 1593-1612.
- Hernandez, N.** (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* **7**: 1291-1308.
- Horikoshi, M., Bertuccioli, C., Takada, R., Wang, J., Yamamoto, T. & Roeder, R. G.** (1992). Transcription factor TFIID induces DNA bending upon binding to the TATA element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1060-1064.
- Horikoshi, M., Yamamoto, T., Ohkuma, Y., Weil, P. A. & Roeder, R. G.** (1990). Analysis of structure-function relationships of yeast TATA box binding factor TFIID. *Cell* **61**: 1171-1178.
- Hu, M. C., Tranque, P., Edelman, G. M. & Mauro, V. P.** (1999). rRNA-complementarity in the 5' untranslated region of mRNA specifying the Gtx homeodomain protein: evidence that base-pairing to 18S rRNA affects translational efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1339-1344
- Huskey, R. J.** (1979). Mutants affecting vegetative cell orientation in *Volvox carteri*. *Dev Biol* **72**: 236-243.

- Huskey, R. J. & Griffin, B. E.** (1979). Genetic control of somatic cell differentiation in *Volvox* analysis of somatic regenerator mutants. *Dev Biol* **72**: 226-235.
- Huskey, R. J., Griffin, B. E., Cecil, P. O. & Callahan, A. M.** (1979). A preliminary genetic investigation of *Volvox carteri*. *Genetics* **91**: 229-244.
- Ikeda, K. & Miyasaka, H.** (1998). Compilation of mRNA sequences surrounding the AUG translation initiation codon in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**: 2457-2459.
- Ish-Horowicz, D. & Burke, J. F.** (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989-2998.
- Jakobiak, T.** (1999). Untersuchungen zur Verbreitung des *regA*-Gens in der Familie Volvocaceae und Charakterisierung der *rbcS*-Gene aus *Volvox carteri*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Jakobiak, T., Mages, W., Scharf, B., Babinger, P., Stark, K. & Schmitt, R.** (2004). The bacterial paromomycin resistance gene, *aphH*, as a dominant selectable marker in *Volvox carteri*. *Protist* **155**: 381-393.
- Kane, J. F.** (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**: 494-500.
- Kirk, D. L.** (1988). The ontogeny and phylogeny of cellular differentiation in *Volvox*. *Trends Genet* **4**: 32-36.
- 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.** (1994). Germ cell specification in *Volvox carteri*. *Ciba Found Symp* **182**: 2-15.
- Kirk, D. L.** (1997). The genetic program for germ-soma differentiation in *Volvox*. *Annu Rev Genet* **31**: 359-380.
- Kirk, D. L.** (1998). *Volvox: Molecular Genetic Origins of Multicellularity and Cellular Differentiation*. Cambridge University Press, Cambridge
- Kirk, D. L.** (2001). Germ-soma differentiation in *volvox*. *Dev Biol* **238**: 213-223.
- Kirk, D. L., Birchem, R. & King, N.** (1986). The extracellular matrix of *Volvox*: a comparative study and proposed system of nomenclature. *J Cell Sci* **80**: 207-231.
- Kirk, D. L., Kaufman, M. R., Keeling, R. M. & Stamer, K. A.** (1991). Genetic and cytological control of the asymmetric divisions that pattern the *Volvox* embryo. *Dev Suppl* **1**: 67-82.
- Kirk, D. L. & Nishii, I.** (2001). *Volvox carteri* as a model for studying the genetic and cytological control of morphogenesis. *Dev Growth Differ* **43**: 621-631.

- 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., Ransick, A., McRae, S. E. & Kirk, D. L.** (1993). The relationship between cell size and cell fate in *Volvox carteri*. *J Cell Biol* **123**: 191-208.
- 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.
- Kozak, M.** (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* **196**: 947-950.
- Kozak, M.** (1989). Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* **9**: 5134-5142.
- Kozak, M.** (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol* **115**: 887-903.
- Kozak, M.** (1995). Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7134.
- Kozak, M.** (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **299**: 1-34.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
- Larson, A., Kirk, M. M. & Kirk, D. L.** (1992). Molecular phylogeny of the volvocine flagellates. *Mol Biol Evol* **9**: 85-105.
- Lichtinger, M.** (2000). Marker von Seneszenz und Zelltod der somatischen Zellen von *Volvox carteri*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Lissin, N. M., Venyaminov, S. & Girshovich, A. S.** (1990). (Mg-ATP)-dependent self-assembly of molecular chaperone GroEL. *Nature* **348**: 339-342.
- Lottspeich, F. & Zorbas, H.** (1998). Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- 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.
- Marth, J. D., Overell, R. W., Meier, K. E., Krebs, E. G. & Perlmutter, R. M.** (1988). Translational activation of the *lck* proto-oncogene. *Nature* **332**: 171-173.
- Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner, D. H.** (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* **288**: 911-940.

- Meissner, M., Stark, K., Cresnar, B., Kirk, D. L. & Schmitt, R.** (1999). *Volvox* germline-specific genes that are putative targets of RegA repression encode chloroplast proteins. *Curr. Genet.* **36**: 363-370.
- 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.
- Nishii, I. & Ogihara, S.** (1999). Actomyosin contraction of the posterior hemisphere is required for inversion of the *Volvox* embryo. *Development* **126**: 2117-2127.
- Nishii, I., Ogihara, S. & Kirk, D. L.** (2003). A kinesin, *invA*, plays an essential role in *volvox* morphogenesis. *Cell* **113**: 743-753.
- 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.
- Novy, R., Drott, D., Yaeger, K. & Mierendorf, R.** (2001). *inNovations* **12**: 1-3.
- Nozaki, H., Mita, T. & Kuroiwa, T.** (1989). *Pleodorina japonica* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyta) with bacteria-like endosymbionts. *Phycologia* **28**: 252-267.
- Pelletier, J., Flynn, M. E., Kaplan, G., Racaniello, V. & Sonenberg, N.** (1988). Mutational analysis of upstream AUG codons of poliovirus RNA. *J Virol* **62**: 4486-4492
- Pommerville, J. & Kochert, G.** (1982). Effects of senescence on somatic cell physiology in the green alga *Volvox carteri*. *Exp Cell Res* **140**: 39-45.
- Pommerville, J. C. & Kochert, G. D.** (1981). Changes in somatic cell structure during senescence of *Volvox carteri*. *Eur J Cell Biol* **24**: 236-243.
- Pooggin, M. M., Hohn, T. & Futterer, J.** (2000). Role of a short open reading frame in ribosome shunt on the cauliflower mosaic virus RNA leader. *J Biol Chem* **275**: 17288-17296.
- Pringsheim, E. G.** (1946). The biphasic or soil-water culture method for growing algae and flagellata. *J. Ecol.* **33**: 193-204.
- 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.
- Rausch, H., Larsen, N. & Schmitt, R.** (1989). Phylogenetic relationships of the green alga *Volvox carteri* deduced from small-subunit ribosomal RNA comparisons. *J Mol Evol* **29**: 255-265.

- Rusch, A.** (1999). Komplementation *cis*-aktiver Elemente des *regA*-Genlocus und *trans*-aktiver Domänen der RegA-Proteins aus *Volvox carteri*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 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.
- Schmidt, K.** (2004). Gonidien- und somazell-spezifisch exprimierte Gene bei *Volvox carteri*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Schmitt, R.** (2003). Differentiation of germinal and somatic cells in *Volvox carteri*. Curr Opin Microbiol **6**: 608-613.
- 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. in: Horizontal Gene Transfer (Syvanen, M. & Kado, C.). Chapman & Hall, London, pp.338-48.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**: 503-517.
- Stark, K.** (1996). Klonierung und Charakterisierung des *regA*-Genlocus von *Volvox carteri*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- 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, D. B. & Hawley, D. K.** (1991). TFIID binds in the minor groove of the TATA box. Cell **67**: 1231-1240.
- Starr, R. C.** (1968). Cellular differentiation in *Volvox*. Proc Natl Acad Sci U S A **59**: 1082-1088.
- 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.** (1970). Control of differentiation in *Volvox*. Symp Soc Dev Biol **29**: 59-100.

**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.

**Sumper, M. & Hallmann, A.** (1998). Biochemistry of the extracellular matrix of *Volvox*. Int Rev Cytol **180**: 51-85.

**Tam, L. W. & Kirk, D. L.** (1991). Identification of cell-type-specific genes of *Volvox carteri* and characterization of their expression during the asexual life cycle. Dev Biol **145**: 51-66.

**Tan, S.** 1999, posting date. TBP/DNA. <http://www.bmb.psu.edu/faculty/tan/lab/gallery/tbpdna.jpg> [Online.]

**Viamontes, G. I. & Kirk, D. L.** (1977). Cell shape changes and the mechanism of inversion in *Volvox*. J Cell Biol **75**: 719-730.

**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.

**Viitanen, P. V., Lubben, T. H., Reed, J., Goloubinoff, P., O'Keefe, D. P. & Lorimer, G. H.** (1990). Chaperonin-facilitated refolding of ribulosebiphosphate carboxylase and ATP hydrolysis by chaperonin 60 (groEL) are K<sup>+</sup> dependent. Biochemistry **29**: 5665-5671.

**Wang, X. Q. & Rothnagel, J. A.** (2004). 5'-untranslated regions with multiple upstream AUG codons can support low-level translation via leaky scanning and reinitiation. Nucleic Acids Res **32**: 1382-1391.

**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.

**Weiss, L. M.** (2001). Microsporidia: emerging pathogenic protists. Acta Trop **78**: 89-102

**Wykoff, D. D., Davies, J. P., Melis, A. & Grossman, A. R.** (1998). The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol **117**: 129-139.

**Xi, Q., Cuesta, R. & Schneider, R. J.** (2004). Tethering of eIF4G to adenoviral mRNAs by viral 100k protein drives ribosome shunting. Genes Dev **18**: 1997-2009.

**Yueh, A. & Schneider, R. J.** (1996). Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells. Genes Dev **10**: 1557-1567.

**Yueh, A. & Schneider, R. J.** (2000). Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. Genes Dev **14**: 414-421.

**Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res **31**: 3406-3415.

## 8. Anhang

### 8.1 *tbp*-Sequenzen

#### 8.1.1 Genomische *tbp*-Sequenz

```

1 tctagaggtg cactatattga agtcaacgat gtaagtcctc gtgaggataa cccaaacgac
61 ttacaaacaa cccacagccg gaaagcaatc gacaatccgc aatttggtga aggtagctga
121 tctgcggtat agccacaata attacttaaa ttgagcaaaa taaactagta ttagacaatt
181 agcatcaacc tgagcgaagc catcctgtta cggcagcgtc aaatacggca tggttaaccc
241 gatgcagaac ccgtaaattg agaagagtct aagtgttttg ataaggcaat taaggatctt
301 tggattggtt cgttttcttt tgcgaagcgg tgacttgctc tgagagccac atctggcgcc
361 gactgtactc ctccatcaag tgtggattgc ctgtatctcc gaatccaggt tgtcgtttta
421 cagccaaatt gaagccagc agtaggcctg ttttgtgagc tgcttttccg cctactgagc
481 aacccgcag ccttctctgg gccaggccag ccttcttcaa caacatctta aacggtgaac
541 tggctcggcc cattgcataa agtgtttctt gcagttcatc tttaggcctc cgtgacaaaa
601 tggcgtaaac tagcaccgac ccagcacctc ctggtgcaac gccaccattg acagctgcaa
661 atggtgaagc tgagatggcc gcacatgtat ctggtattac accacagctg cagaacgtag
721 tggctactgt gaatctgggc acaaagctag acttgaagga gattgctatg cacgcgcgca
781 acgctgagta taatcccaag gtaggcttcg agtagccttg tagtgggtgtg aggggcagca
841 gcgggggggtc tcgaacggtt caaattcacc tatgtgtggt tgctttgcag cgtttcgccg
901 ccgtcattat gcgtattaga gagccaaaga cgaccgact aatttttgcg tccgggaaga
961 tggtaagtct cacgagattc atggacagtc ccacgccatg gacgtaacct caggtctgta
1021 catggctggg tctgaacacg gtccgctgta caagtatgcc cgtcacctgg caggtctgta
1081 ctgggagcga gagcgagyac gactcgagga cagcggccag acgtgtgagt attcttttgg
1141 agcccagcgt taacgcctgg gtgtaccccg gttaaaaagc ttcgtgcaaa gtgtcacggt
1201 atgaagtcgt ccctttcaca cgaaggggtg attgtgctcg tctttagtga atgacgtcag
1261 tctgtccagt ggtccgctct cattacattg ttgtcccgtg ggtcgcgaag cgcgatttat
1321 atctcacgat tgctcctcta gatccagtgc tgtgctcgc agtccagctc caggacatca
1381 tgggcccttg ccgcataaag tcgctcggag ctgatgctgt tgggatacct gaggatgtca
1441 gaagtctggt gaacctgttt cgcttgccta tctgcccga ggatatgaag gtgcacagtg
1501 caacaaaaat cctgcgagaa gaattctcct gacgacaggc aaaatggatg tcagacaata
1561 ttttaacatg cagtctgttc gtcttccgct ttgcagtacg ccaagatcgt gcaaaagctg
1621 ggcttcccgg ccacgttcaa ggagttcaaa atccaaaata ttgtggggtc gtgtgacgct
1681 aagttcccta ttcgcttggg aggccttgcg tatgcgcaaa gccttttccg aagcgtgagt
1741 aatggcggga taaggttcca ggtcgcgcc tgtgctggtg gtccgcgggc ggacgcggac
1801 acacgtaggt tgtgtttttt cgcacgctag tgggcgacac gcagatgggg tacctcgcac
1861 ccgctatcct cctgcgtgtc taggatggtt cctagtcggg gttatggagt cacctgccgc
1921 cgtcctgctt gcctcgcgat gctggggccg cagtacgagc cggagctctt tccggggctt
1981 atctatcgga tgaagcagcc caagatcgtg ctgctcatct ttgtgctggg caaggtggtc
2041 ctgacgggta agcccgggcg atatactgtt ccacacgtgg atatatatt atgttatat
2101 gtacaataga gtagcgcctg ttagtgtctc agggcagatg aggtcctagg cgggtgcca
2161 gcgctggggtc tgcaggaccg actgcacatg caagtcggtg aacggtagcg gttccggcaa
2221 cccgtagatt cataaactta tgtggtgtgc acggggcgcg gcgtggaggc cgtgccactg
2281 caactggcgc tgatcaggac gttacccgcg gatcccagtg gcttaggaac ccgcgtatgc
2341 ggaggcacct tcgtgcatgt gttacagcac agagtccgt cgggtgcatc cttgtgaggt
2401 gtcttttatt gaatgatggg tttgctttct gattgcaacg gcaagaggca ttgccgatgc
2461 tttcgcttgc atcaatgtca tgtgccgtgc cacctgcccg ctttgatagg cgctaagacg
2521 cgctacgaga tctaccaggc ctacatgaat atctaccca cactgattca gtacaagaaa
2581 ggagacgcag cctgcccggc gctgcccggc gcgaatctaa tgcccggcc gcgtgacta
2641 ccacctgccc ggcaggccgg gcagccagat ggatcggcgg agcatatgga acagcagcag
2701 cagcagcccc aacaccatca gcagcagcaa attccgcagc cagtccagca ccccggtcgc
2761 gcggcagcgg cggcggcaat gatgatgccg ccgccgccga cccttcagc agcaccgacg

```





8.1.3 Multiple alignment von TBP-Proteinsequenzen verschiedener Spezies

Multiple alignment of TBP protein sequences from various species, showing positions 20, 40, 60, 80, 100, and 120. Species include Volvox carteri, Chlamydomonas reinhardtii, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Mesocricetus auratus, Gallus gallus, Ephydatia fluviatilis, Spodoptera frugiperda, Bombyx mori, Lytechinus variegatus, Hemientrotus pulcherrimus, Caenorhabditis elegans, Acanthamoeba castellanii, Drosophila melanogaster, Dictyostelium discoideum, Arabidopsis thaliana, Triticum aestivum, Zea mays, Glycine max, Mesembryanthemum crystallinum, Acetabularia cliftonii, Emmericella nidulans, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Encephalitozoon cuniculi, and Pyrococcus furiosus.

Multiple alignment of TBP protein sequences from various species, showing positions 140, 160, 180, 200, 220, and 240. Species include Volvox carteri, Chlamydomonas reinhardtii, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Mesocricetus auratus, Gallus gallus, Ephydatia fluviatilis, Spodoptera frugiperda, Bombyx mori, Lytechinus variegatus, Hemientrotus pulcherrimus, Caenorhabditis elegans, Acanthamoeba castellanii, Drosophila melanogaster, Dictyostelium discoideum, Arabidopsis thaliana, Triticum aestivum, Zea mays, Glycine max, Mesembryanthemum crystallinum, Acetabularia cliftonii, Emmericella nidulans, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Encephalitozoon cuniculi, and Pyrococcus furiosus.

Multiple alignment of TBP protein sequences from various species, showing positions 260, 280, 300, 320, 340, 360, and 380. Species include Volvox carteri, Chlamydomonas reinhardtii, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Mesocricetus auratus, Gallus gallus, Ephydatia fluviatilis, Spodoptera frugiperda, Bombyx mori, Lytechinus variegatus, Hemientrotus pulcherrimus, Caenorhabditis elegans, Acanthamoeba castellanii, Drosophila melanogaster, Dictyostelium discoideum, Arabidopsis thaliana, Triticum aestivum, Zea mays, Glycine max, Mesembryanthemum crystallinum, Acetabularia cliftonii, Emmericella nidulans, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Encephalitozoon cuniculi, and Pyrococcus furiosus.

Multiple alignment of TBP protein sequences from various species, showing positions 400, 420, 440, 460, 480, and 500. Species include Volvox carteri, Chlamydomonas reinhardtii, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Mesocricetus auratus, Gallus gallus, Ephydatia fluviatilis, Spodoptera frugiperda, Bombyx mori, Lytechinus variegatus, Hemientrotus pulcherrimus, Caenorhabditis elegans, Acanthamoeba castellanii, Drosophila melanogaster, Dictyostelium discoideum, Arabidopsis thaliana, Triticum aestivum, Zea mays, Glycine max, Mesembryanthemum crystallinum, Acetabularia cliftonii, Emmericella nidulans, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Encephalitozoon cuniculi, and Pyrococcus furiosus.



←

Abb. 54. **Multiple alignment von TBP-Proteinsequenzen verschiedener Spezies.** Es wurde mit dem Programm *PILEUP* (GCG) erstellt. Positionen, die bei mehr als 95 % der Spezies identisch sind, wurden schwarz hinterlegt, die mehr als 50% identisch sind dunkelgrau und die mehr als 10 % identisch sind hellgrau. Außer die Sequenz von *V. carteri*, die in dieser Arbeit gewonnen wurde, und die von *C. reinhardtii*, die aus dem *C. reinhardtii* Genomprojekt (JGI, Walnut Creek, CA, USA) stammt, wurden alle Sequenzen aus der GenBank-Datenbank isoliert. Dieser Sequenzvergleich diente zur Generierung degenerierter Primer (4.1.1) und zur Erstellung eines Dendrogramms (Abb. 48). Nachfolgend die Liste der Spezies mit der Angabe der *GenBank Accession No.*:

<i>Volvox carteri</i>	AY787798	<i>Drosophila melanogaster</i>	P20227
<i>Homo sapiens</i>	P20226	<i>Dictyostelium discoideum</i>	P26355
<i>Mus musculus</i>	AAH50136	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P28147
<i>Xenopus laevis</i>	I51648	<i>Triticum aestivum</i>	CAA42531
<i>Mesocricetus auratus</i>	P53360	<i>Zea mays</i>	CAA62224
<i>Gallus gallus</i>	O13270	<i>Glycine max</i>	AAA91948
<i>Ephydatia fluviatilis</i>	BAB78514	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	P48511
<i>Spodoptera frugiperda</i>	P53361	<i>Acetabularia cliftonii</i>	CAA82267
<i>Bombyx mori</i>	O45211	<i>Emericella nidulans</i>	AAB57876
<i>Lytechinus variegatus</i>	AAC35362	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P13393
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	ABO74420	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	P17871
<i>Caenorhabditis elegans</i>	P32085	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	NP584829
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	CAA44843	<i>Pyrococcus furiosus</i>	P62001

## 8.2 Verteilung der überdurchschnittlich häufig repräsentierten Codons im *regA*-Gen

Im *regA*-Gen von *V. carteri* werden einige Codons deutlich häufiger kodiert als in *T. ni-*Genen. Dies kann zum Abbruch der Translation oder zu Rasterverschiebungen führen (Kane, 1995; Novy et al., 2001). Nachfolgend sind Proline (CCG-Codon) rot, alle Glutamine (Codons CAA und CAG) grün im RegA-Protein markiert.

```

1                               10                               20
M E I G F R K E D S D I A P V A E T Q Q
S P Q P E Q Q E Q K D Q D M P P Q P Q L
Q P Q A L Q L A A Q Q H L Q Q S A Q Q P
R P L E Q M A L D Q N T E L A S A A T P
A G G S N G G Y D A V K P L S H I R V Q
S P G R G S T P L A L R P I L Y S M T V
R N A D G T P Q T A R Q L P S I S A P C
S A L S A Y G P V T S G E L P Y D E S I
E P P L T S V A A Y P R S G R V G G S S
G G G A A G P N G E D D G L S Q G S P S
E P E L R P A T T A T L Q S A I G S L M
V T E G P A T S T A G G E L L G A D L P
S N E G V Q Q Q Q Q I K Q Q E E Q Q E E
Q Q E E Q Q E E Q Q E K Q Q E K Q Q E E
Q E Q Q D Q Q R L A G P H S A S P P E A
V A V S A V S D S E E E V G R G S V S S
G T A R P Q P S S P T A A E V T G E A I
E V A A V P P V Q P Q N I Q E Y Q S S P
P P P A L P Q Q S P P P P G Q P K R A S
A G Q S P E A S D D A V Q P N E N A G Q
G A G G S S A D G G D V A G A N T T D T
C A E A P G Q P N Q D L A Q N L E E L V
A A L P P G P I Q V T V A V R V G A G G
R R P R G G G S R V P E E D T R S G Y M
R G H A C G V F D V P R Y L A G R D C I
H N G S K W M S R S Q F E K V G G S K M
A K W Y R S I R V L P D L E P L G E W L
E R H G M P V T K G P A R R S R K R A A
E S G D G E E Q Q G Q G A E Q E G V A A
S P D D V Q G Q G V A D P T A A L P A V

```

P P G P P P P P P P P S Q V P Q A R R A  
L S G M A L P N G A R V R R V E P S E S  
A A L D P A S A G F G A V A S A A T R S  
A A A A A A A T A G G P P P R Q E R R L  
P P P L P S A P L Q Q A S A L V L D A A  
T L A R G L A A L Q S L D V A G G G L S  
G H S R D H L T R T P A S V L N Q Y L G  
Q S Y T G Q R R Y R P H A P E P E H I S  
A S G D L G Y G R S D T Y H G E G S R R  
A A A S N A A T A A A A A A S L R R R  
R R P W E D E E E E D E A E E E E D V W  
R Q R E S V C E A P S R F L P R L P A E  
L K P N L L Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q L P  
H K R Q R L G E G E C Q P P F P Q L N G  
H D P I D V D P Y T V R Q H M A R L Q D  
P P P S M L L Q Q Q H R R R A H A V F A  
A A A D E L G E D D E H Q E G E E E E E  
E E E E E G G G V A E Y W A D D T R R H  
A Y R S G F N A V G D A K G E H P Q V P  
P L A M S L P A V A A R R P A Y Y T P Q  
R P V M A A N R E G A A S S W R R P R G  
G P V L Q G E S Q G R R T D W P Q Q A R  
R S G D D S L S D \*



### 8.3.3 Auswertung der *Nothern*-Analyse mittels *Optiquant*

In Tab. 21 sind die Original-Daten der *Nothern*-Analyse (Abb. 45), die mit dem Programm *Optiquant* erhalten wurden, gezeigt.

Tab. 21. Intensitäten der *regA*-Banden in der *Nothern*-Analyse.

	A2-12 (2,7 µg)	HK10 (8,9 µg)
<i>regA</i> (Net DLU/mm <sup>2</sup> )	2.021.327,3	160.098,7

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.

Vielen Dank auch an meinen ehemaligen Laborleiter **Dr. Klaus Stark**, der zu Beginn meiner Arbeit mit seiner Erfahrung und zahlreichen Ratschlägen sowohl die Arbeit als auch den Computer betreffend eine große Hilfe war. **Monika Lichtinger** möchte ich für die Vorarbeiten zu dieser Arbeit und die Überlassung der Ergebnisse danken.

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 ihrer Vorgängerin **Ursula Zeiser**. Nicht vergessen darf ich auch die Praktikanten, die alle ihren kleinen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: **Madeleine Leisner, Michael Gerg** und **Karin Schmidt**.

Danke auch meinen ehemaligen „*Volvox*-Kollegen“ **Dr. Thomas Jakobiak, Rebekka Köppl, Monika Lichtinger, Petra Pickl, Karin Schmidt, Alexander Sigrüner, 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** und dem Rhizobien-Labor unter der Leitung von **Dr. Birgit Scharf**, die in zahlreichen Diskussionen Anregungen für diese Arbeit gaben.

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

Zuletzt aber möchte ich vor allem **meinen Eltern** und **meinem Ehemann Patrick** 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 Februar 2001 bis Februar 2005 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.

.....  
Karin Babinger