

Genetische Transformation von *Volvox* *carteri* mit einem dominant-selektiven Resistenzmarker

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

vorgelegt von

Thomas Jakobiak

aus Regensburg

November 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 26.11.2003

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

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

Erstgutachter: Prof. Dr. Rüdiger Schmitt

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Dritter Prüfer: Prof. Dr. Michael Thomm

Aller Anfang ist leicht, und die letzten Stufen werden am seltensten erstiegen.

Johann Wolfgang von Goethe

(1749 - 1832), deutscher Dichter der Klassik, Naturwissenschaftler und Staatsmann

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	6
2.1	Enzyme und Chemikalien	6
2.2	Organismen, Phagen, Plasmide und verwendete Oligonukleotide	7
2.3	Medien	12
2.4	Verwendete Puffer und Lösungen	14
2.5	Kultivierung von Organismen	18
2.5.1	Kultivierung von <i>Volvox carteri</i>	18
2.5.2	Kultivierung von Bakterien	18
2.6	Biolistische Transformation von <i>Volvox carteri</i>	19
2.7	DNA-Methoden	21
2.7.1	Isolierung von reiner Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	21
2.7.2	DNA-Präparation durch alkalische Lyse	21
2.7.3	Präparation von RNA aus <i>Volvox carteri</i>	22
2.7.4	DNA-Isolierung aus <i>Volvox carteri</i>	23
2.7.5	PCR-Amplifikation von DNA	24
2.7.6	Reverse Transkription	25
2.7.7	Synthese von cDNA ausgehend von gesamt-RNA oder mRNA	25
2.7.8	Enzymatische Spaltung von DNA	26
2.7.9	Hybridisierung und Detektion von Nukleinsäuren	26
2.7.10	DNA Sequenzanalyse und Sequenzbearbeitung	28
2.8	Gelelektrophorese	28
2.9	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	29
2.10	Protein-Methoden	29
2.10.1	Denaturierende Proteinextraktion aus <i>V. carteri</i>	29
2.10.2	Native Proteinextraktion aus <i>V. carteri</i>	30
2.10.3	Proteinanalyse	30
2.10.4	Übertragung von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen (<i>Western Blot</i>)	31
2.11	Klonierungen	31
2.11.1	Dephosphorylierung von DNA	31

2.11.2	Behandlung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Polymerase und T4-Polynukleotidkinase	32
2.11.3	Ligieren von DNA-Fragmenten	32
2.12	Transformation von <i>E. coli</i> und Transformanten-Analyse	32
2.13	Autoradiographie	33
2.13.1	Autoradiographie mittels Röntgenfilm	33
2.13.2	Autoradiographie mittels PhosphorImager	33
2.14	Test von <i>Volvox</i>-Cotransformanten auf Arylsulfatase-Aktivität	34
3	<i>Ergebnisse</i>	35
3.1	Auswahl des <i>aphH</i>-Gens als selektiven Marker	35
3.1.1	Bestimmung der natürlichen Paromomycin-Toleranzgrenze von den <i>V. carteri</i> – Stämmen 153-68 und 153-48	37
3.1.2	Wesentliche Komponenten für die Fremdexpression des <i>aphH</i> -Resistenzmarkers in <i>Volvox</i> -Zellen	37
3.1.3	Auswahl und Einsatz eines starken <i>Volvox</i> Promotors	38
3.1.4	Konstruktion von Transformationsplasmiden	40
3.1.5	Transformation der <i>Volvox</i> -Stämme 153-68, 153-48 und HK10	44
3.2	Molekulare Analyse isolierter Transformanten	48
3.2.1	Überprüfung der Integration des <i>aphH</i> -Gens ins Transformantengenom durch PCR-Analysen	48
3.2.2	Überprüfung der Integration des <i>aphH</i> -Gens ins Transformantengenom durch <i>Southern</i> -Analyse	50
3.2.3	Nachweis der Transkription des <i>aphH</i> -Gens durch RT-PCR und <i>Northern-Blot</i>	52
3.2.4	Nachweis der AphH-Proteinexpression in ausgewählten Transformanten	53
3.2.5	Resistenz und Promotorstärke	56
3.2.6	Immunfluoreszenz von Aph/Gfp-Transformanten	56
3.2.7	Kotransformation mit einem nicht-selektionierten Marker	58
4	<i>Diskussion</i>	60
5	<i>Zusammenfassung</i>	64
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	65

Abkürzungsverzeichnis

<i>aphH</i>	Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase (APH VIII)-Gen aus <i>Streptomyces rimosus</i>
<i>ars</i>	Arylsulfatase-Gen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
<i>gls</i>	<i>gonidialless</i> -Gen
<i>hsp70A</i>	Gen für Hitzeschock Protein 70A
kb	Kilobase(n)
<i>lag</i>	<i>late gonidia</i> -Gen
<i>nitA</i>	Nitratreduktase-Gen
nt	Nukleotid(e)
NTR	nicht-transkribierte Region
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pm	Paromomycin
Pm ^R	Paromomycin Resistenz
pfu	<i>plaque forming units</i>
<i>regA</i>	<i>somatic regenerator</i> -Gen
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA

TEMED	Tetramethylethyldiamin
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifuge
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
X-SO₄	5-Bromo-4-Chloro-3-indolylsulfat

1 Einleitung

Als transparentes Modellobjekt für Entwicklungsstudien an “grünen Organismen” wird die vielzellige Kugelalge *Volvox carteri f. nagariensis* seit den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts intensiv genetisch, physiologisch und molekular-biologisch studiert (Kirk, 1998). Sie wurde vor 300 Jahren von Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) entdeckt und erstmals beschrieben. Dieser scharfsichtige Beobachter bezeichnete die Alge damals als „Kugeltierchen“, weil er sie nicht in ein taxonomisches System einordnen konnte, das ein halbes Jahrhundert später erstmals von Carl v. Linné (1707-1778) aufgestellt wurde. Im Jahre 1889 erfolgte dann die erste Analyse von *Volvox* durch August Weismann (1834-1914), der anhand der Kugelalge seine Keimbahntheorie bestätigen konnte.

V. carteri ist durch einen einfachen Lebenszyklus mit klarer Arbeitsteilung zwischen nur zwei Zelltypen – somatischen und reproduktiven – ein definiertes Muster der Zelldifferenzierung, eine gastrulations-analoge Inversion, in deren Verlauf die Verschiebung von Zellkontakten die Morphogenese des adulten Organismus bestimmt, gekennzeichnet. Synchrones Wachstum der Kulturen im Licht/Dunkel-Zyklus macht die Alge zu einem geeigneten Labor-Untersuchungsobjekt (Starr, 1969; Kirk and Harper, 1986; Schmitt et al., 1992; Kirk, 1998). *Volvox* ist haploid, deshalb zeigen Mutanten in aller Regel den Mutanten-Phänotyp. Ein weiterer Vorteil dieser Alge beruht auf der sexuellen Differenzierung in männliche und weibliche Linien und der Möglichkeit zur genetischen Kreuzung. Ca. 40 Entwicklungs- und Differenzierungsmutanten, die zum Großteil bereits klassisch-genetisch auf 14 Kopplungsgruppen kartiert wurden, liegen vor (Huskey et al., 1979; Kirk & Harper, 1986; Kirk, 1990; Schmitt et al., 1992). Im Gegensatz zu Modellorganismen, wie *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* oder *Mus musculus*, ist *Volvox* mit nur zwei Zelltypen – somatischen und reproduktiven – denkbar einfach strukturiert. Die Kugelalge besitzt sowohl pflanzentypische Merkmale (Photosynthese), als auch tierische Eigenschaften (Beweglichkeit, Soma und Keimbahn). Für Kenntnisse der Alge und Studien an *Volvox* waren die Isolierung von *Volvox carteri f. nagariensis* in Westjapan (1968) und grundlegende Arbeiten von Richard Starr richtungsweisend (Starr, 1969; 1970).

Ein Sphäroid (ca. 2 mm Ø) von *V. carteri* besteht aus 16 großen, reproduktiven Zellen (Gonidien) tiefer in der Glykoprotein Matrix und aus ca. 2000 doppelt begeißelten somatischen Zellen an der Kugeloberfläche. Die somatischen Zellen entsprechen mit

Augenfleck und zwei Flagellen der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas*, während die großen (50µm Ø) Gonidien weder Augenfleck noch Geißeln tragen. An der Oberfläche eines Sphäroids liegend, sind die Somazellen in eine extrazelluläre Matrix aus mehreren Glykoprotein Strukturen eingebettet (Kirk, 1998; Hallmann & Sumper, 1998). Dieser Zelltypus ist terminal differenziert und somit nicht mehr zur Fortpflanzung fähig; er dient der Phototaxis und Bewegung der Alge. Die ca. 16 großen Gonidienzellen sind für die Reproduktion zuständig. Gonidien finden sich im posterioren Inneren der Hohlkugel in oktogonaler Anordnung. Jedes Gonidium ist Ausgangspunkt für die Genese einer neuen *Volvox*-Kugel.

Der Lebenszyklus von *V. carteri* dauert unter Laborbedingungen 48 h. Davon entfallen 11-12 h auf die Embryogenese mit 11 Zellteilungen. Nach fünf symmetrischen Teilungen werden in einer sechsten und zwei weiteren inäqualen Teilungen in der anterioren Hälfte 16 größere Gonidien-Vorläufer und 48 kleinere Soma-Vorläuferzellen gebildet (Starr, 1969; Kirk and Harper, 1986). Die somatischen Vorläuferzellen durchlaufen noch fünf oder sechs weitere symmetrische Teilungen, während sich die Gonidienvorläuferzellen nur noch ein- bis zweimal asymmetrisch teilen und dann für die nächste Generation reifen. Danach wird der Embryo in einer gastrulations-ähnlichen Inversion umgestülpt, wobei Gonidienvorläufer nach innen, somatische Zellen mit ihren Geißeln nach außen gelangen. Es entwickelt sich dann unter Synthese von extrazellulärer Glykoprotein-Matrix ein *Volvox*-Sphäroid (Ertl et al., 1989; Hallmann & Sumper 1998). Die Reifung wird mit dem Schlüpfen der Tochterkugeln abgeschlossen. Der Prozeß des Abstellens der Photosynthese in den somatischen Zellen der "Mutterkugel" (Meißner et al., 1999) und das mit dem Schlüpfen der "Tochterzellen" verbundene Altern (Seneszenz) und anschließende Absterben kann als Pedant des programmierten Zelltods gelten. Der vegetative Lebenszyklus von *V. carteri* ist in weiblichen und männlichen Linien identisch und läßt sich in drei Phasen gliedern: Zellteilung (Embryogenese), Wachstum (adulter Organismus) und Seneszenz der somatischen Zellen.

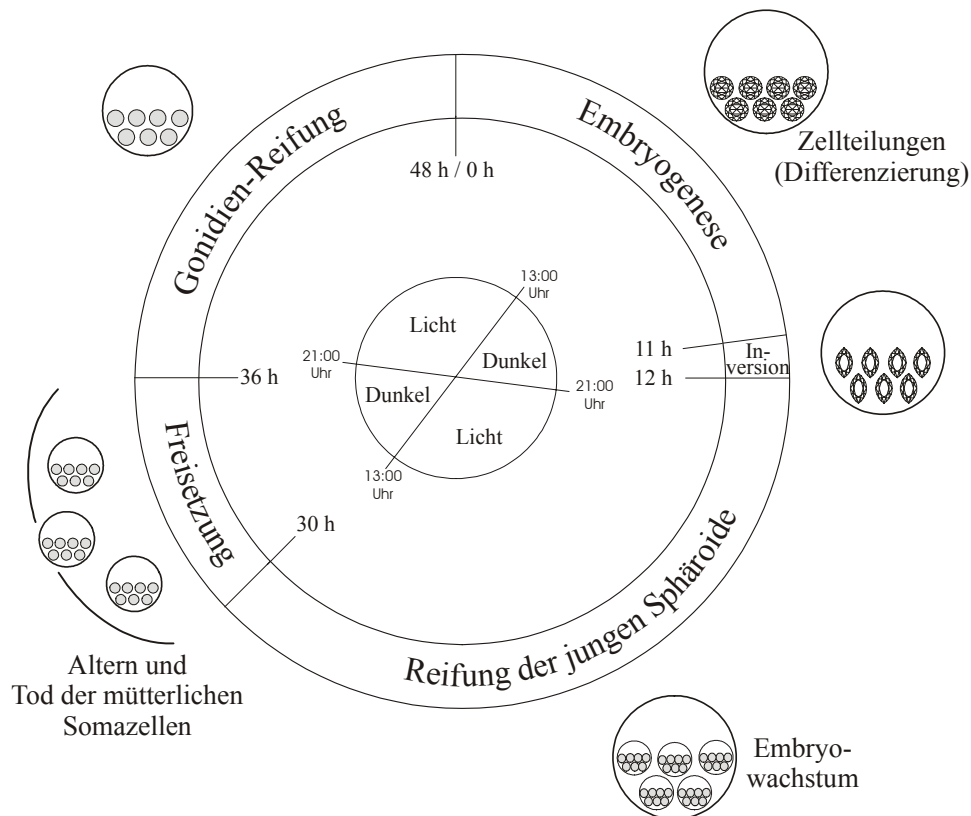


Abb. 1 Lebenszyklus von *V. carteri* unter Laborbedingungen (verändert nach Stark, 1999)

In rund 40 morphologische Mutanten von *V. carteri* ist dieser normale Entwicklungszyklus gestört. Darunter findet man drei Schlüsselgene, die entscheidenden Einfluß auf die Differenzierung in Soma- und Gonidienzellen haben. Durch Transposon-*tagging* sowie Transformationsexperimente konnten zwei dieser drei Gene auch molekular-biologisch untersucht und deren Funktion charakterisiert werden. Der *gls* (*gonidialless*) Genlocus zeigt sich verantwortlich für einen asymmetrischen Verlauf der Zellteilung. Die Bindung von GlS mit dem Hitzeschockprotein Hsp70 an den Basal-Körper resultiert in einer Verschiebung der Teilungsebene. Diese Asymmetrie kann als Ursache für die Differenzierung gesehen werden (Stark & Schmitt 2001). Das *regA* (*somatic regenerator*) Gen verhindert die Redifferenzierung von somatischen Zellen zu Gonidien (Kirk, 1988; 1990; Kirk et al., 1991), ist also für Stabilisierung und Aufrechterhaltung der End-Differenzierung zuständig. Dabei wirkt RegA als Transkriptionsfaktor und unterdrückt in dieser Form die reproduktiven Funktionen u.a. auch die Photosynthese in somatischen Zellen (Choi et al., 1996; Meißner et al., 1999). Der *lag* (*late gonidia*) Genlocus enthält bis zu 4 einzelnen Genen (Kirk et al., 1990),

deren Produkte die somatischen Funktionen in den Gonidienzellen unterdrücken. Somit ist *lag* das Gegenstück von *regA*. Der *lag*-Genlocus konnte bisher noch nicht kloniert werden.

Molekulargenetische Analysen von *regA* und *gls* wurden erst möglich durch die Etablierung eines geeigneten Transformationssystems (Schiedlmeier et al., 1994). Mit der Einführung zweier methodischer Zugänge, nämlich *transposon tagging* (Gierl und Saedler, 1992; Miller et al., 1993) zur Markierung und Isolierung solcher Genorte und einem Transformationssystem (Schiedlmeier et al., 1994) wurden die Türen zur molekularen Charakterisierung dieser Gene aufgestoßen.

Das erste Gen, das als Selektivmarker der *Volvox*-Transformation verwendet werden konnte, war das endogene Nitratreduktase-Gen, *nitA* (Gruber et al., 1992, Gruber et al., 1996). Ein Nachteil dieses Selektionsmarkers liegt darin, daß alle Rezipienten Nit-auxotrophe Mutanten sein müssen. Folglich können der Wildtyp oder andere interessante Mutanten nicht direkt mittels genetischer Transformation untersucht und für Komplementationsanalysen herangezogen werden, es mußte immer erst eine *nitA*-Mutation eingeführt werden.

Sämtliche Versuche in den 80er Jahren, Grünalgen der Gattung *Volvocales* mit heterologen Markern, also Genen aus anderen Organismen; zu transformieren, scheiterten oder ergaben keine stabilen Transformanten (Hasnain et al., 1985; Rochaix and van Dillewijn, 1982). Ein Grund für das Scheitern wurde in der strikten Codon-Auswahl von *Volvocaceen* gesehen (Schmitt et al., 1992); der rasche Abbau von Fremd-Transkripten durch RNase dürfte ebenso eine Rolle spielen.

In neueren Arbeiten konnte erstmals ein dominanter *ble*-Selektionsmarker für die Transformation von *V. carteri* (Hallmann and Rappel, 1999) verwendet werden. In diesem Fall wurde eine erfolgreiche Expression nur durch das Einbringen einer großen Zahl von Kopien des bakteriellen Resistenzgens *ble* (Zeocin-Resistenz) unter Kontrolle eines *V. carteri*-spezifischen Promotors erreicht, welche ausreichend hohe Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin bewirken. Ein Problem des verwendeten Antibiotikums Zeocin besteht in seiner Mutagenität. Das *ble*-Genprodukt hat außerdem den Nachteil, daß es in stöchiometrischer Menge das Antibiotikum bindet und daher eine starke Expression des Fremd-Gens voraussetzt.

Ziel dieser Arbeit war es, das Aminoglycosid 3'-Phosphotransferase Typ VIII codierende *aphH*-Gen von *Streptomyces rimosus* als neuen dominanten Marker in *Volvox* einzuführen

(Danilenko and Akopiants, 1997). Das *aphH*-Gen ist aufgrund seines hohen GC-Gehalts (60%), den man auch bei *Volvox* (59%) findet und einer ähnlichen *codon usage*, die sehr nah an der von *V. carteri* Genen liegt (Schmitt et al., 1992) und den erfolgreichen Einsatz bei *C. reinhardtii* (Sizova et al., 2001) als heterologer Marker ausgewählt worden. Zusätzlich zum homologen Promotor mußte das Transkript durch polyA vor Abbau geschützt werden. Die Kombination aus dem Hitze- (Hsp70A) sowie Licht-induzierbaren (RbcS) Promotorkonstrukt zeigte in Arbeiten an *C. reinhardtii* eine deutliche Erhöhung der Expression des eingesetzten Reportergens (Schroda et al., 2000). Im Gegensatz zur *nitA* Selektion wurde mit Paromomycin eine schnellere Selektion erzielt (6 gegenüber 11 Tage).

Im einzelnen wurden folgende Arbeitsziele festgelegt:

1. Herstellung von rekombinanten *aphH*-Konstrukten für die Expression in *V. carteri*
2. Bestimmung der Transformation- und Kotransformation-Effizienz
3. Bestimmung der Resistenz
4. Überprüfung der stabilen Integration der eingebrachten Konstrukte
5. Demonstration von Transkription und Translation des *aphH*-Gens
6. Molekulare Analysen von Kotransformanten

2 Material und Methoden

2.1 Enzyme und Chemikalien

Verwendete Reagenzien sind mit Angabe der Bezugsquelle in Tab. 1 aufgeführt:

Tab. 1. Verwendete Chemikalien

Reagenzien	Bezugsquelle
[α-³²P]-dCTP	Amersham Life Science (Braunschweig)
[α-³³P]-ddNTP	Amersham Life Science (Braunschweig)
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (18:1)	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Sigma (München)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Bacto Agar	Difco (Detroit, MI, USA)
Bacto Tryptone	Difco (Detroit, MI, USA)
Bacto Yeast Extract	Difco (Detroit, MI, USA)
Bromphenolblau	Sigma (München)
Cäsiumchlorid	Biomol (Hamburg)
dNTP's	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
DTT	Sigma (München)
ECLTM-Southern blotting analysis system	Amersham Life Science (Braunschweig)
EDTA	Boehringer (Mannheim)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Formaldehyd	Fluka (Neu Ulm)
Formamid	Fluka (Neu Ulm)
GFX Gel Extraction Kit	Amersham Life Science (Braunschweig)
Harnstoff	BRL (Gaithersburg, MD, USA)
HybondTM-N⁺-Membranen	Amersham Life Science (Braunschweig)
IPTG	Loewe Biochemia GmbH (Otterfing)
Oligonucleotide	MWG-Biotech (Ebersberg)

Phenol	Roth (Karlsruhe)
Qiagen™ Plasmid Mini Kit	Quiagen (Hilden)
Restriktionsenzyme und Puffer	Boehringer (Mannheim)
	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
	USB (Cleveland, OH, USA)
SDS	Serva (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Boehringer (Mannheim)
T4-DNA-Polymerase	Boehringer (Mannheim)
T4-RNA-Ligase	Boehringer (Mannheim)
Taq-Polymerase	Boehringer (Mannheim)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Tris	
X-Gal	Serva (Heidelberg)
Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel	AGS GmbH (Heidelberg)
	Merck (Darmstadt)

2.2 Organismen, Phagen, Plasmide und verwendete Oligonukleotide

Alle verwendeten Algen, Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide findet man in einer Übersicht in nachfolgenden Tabellen.

Tab. 2. Algen und Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften¹	Herkunft/Referenz
<u><i>Volvox carteri f. nagariensis</i></u>		

HK10	Wildtyp-Stamm, Japan	Starr (1969)
153-68	HK10-Derivat, <i>regA</i> , <i>nitA</i> , <i>glsA</i>	Kirk et al. (1999)
153-48	HK10-Derivat, <i>nitA</i>	Gruber et al. (1996)
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
DH 10B	<i>F⁻ araD139 Δ(ara, leu)7697 ΔlacX74 galU galK mcrA Δ(mrr⁻ hsdRMS⁻ mcrBC) rpsL decR φ80d lacZΔM15 end A1 nupG recA1</i>	Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc.
NM538	<i>F⁻ gal lacY metB hsdR supF</i>	Frischauf et al., 1983

¹Genetische Nomenklatur nach Bachmann (1990)

Tab. 3. Plasmide und (Phagen) Vektoren

Name	Marker²	Herkunft / Referenz
pBluescript SK-	<i>bla</i>	Stratagene (pSK(-))
λEMBL3-Genbank	genomische <i>V. carteri</i> -Genbank in λEMBL3, Frischauf et al. (1983)	Mages et al. (1988)
λDashII-Genbank	genomische <i>V. carteri</i> -Genbank in λDashII (Stratagene)	Kirk et al. (1999)
pVcNR15	<i>nitA</i> (cDNA + Promotor + Intron 1)	Gruber et al. (1996)
pVcRegA1	<i>regA</i> (15,3 kb genomisch aus λ7/1) in pSK(-)	Kirk et al. (1999); GenBank <i>accession number</i> AF106962
pIK2	<i>ars</i> (<i>C. reinhardtii</i> Arylsulfatase Gen + <i>Volvox</i>	Babinger et al.

pGEMTM-T	Promotor <i>β2tub</i>) <i>bla lacZ</i>	(2001)
pPmr1	<i>aphH</i> + <i>β2tub</i> -Promotor (alte Bezeichnung pTJ-4)	Promega diese Arbeit GenBank <i>accession number</i> AY429512
pPmr2	<i>aphH</i> + Hybrid-Promotor (<i>hsp70A/rbcS3</i>) (alte Bezeichnung pTJ-1)	diese Arbeit GenBank <i>accession number</i> AY429513
pTJ-2	<i>aphH</i> + Hybrid-Promotor (<i>hsp70A/rbcS3</i>)	diese Arbeit
pTJ-3	<i>aphH</i> + Hybrid-Promotor (<i>hsp70A/rbcS3</i>)	diese Arbeit
pTJ-5	<i>aphH</i> + Hybrid-Promotor (<i>hsp70A/rbcS3</i>) + IntronI (<i>rbcS3</i>)	diese Arbeit
pTJ-6	pPmr2 + pVcNR15	diese Arbeit
pTJ-9	<i>aphH</i> + Hybrid-Promotor (<i>hsp70A/rbcS3</i>) + <i>gfp</i> (GenBank <i>accession number</i> AF188479)	diese Arbeit
pPmr3	<i>aphH</i> + Hybrid-Promotor (<i>hsp70A/rbcS3</i>) + FLAG-Tag [®] (alte Bezeichnung pTJ-FT)	diese Arbeit GenBank <i>accession number</i> AY429514

²Genetische Nomenklatur nach Novick et al. (1976)

Eingesetzte Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4. Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Adapter (Frohman et al., 1988)	GAC TCG AGT CGA CAT CGA	RT-PCR
pTubNEX5'	ACC TTG CGC CTC TGC TAA GC	Konstruktion von Transformationsvektoren

pTubNEX3'	GTC ATG CCT TCC TGT CAT G	Konstruktion von Transformationsvektoren
pTubNot-5up	ATT AGC GGC CGC GGG AAC GCT CTC TAG	Konstruktion von Transformationsvektoren
pTubNcoEco-5down	ATT AGA ATT CCA TGG TTG CTG GAG GC	Konstruktion von Transformationsvektoren
pTubEco-3up	ATT AGA ATT CTA GAT TTG CGG ACT AAC	Konstruktion von Transformationsvektoren
pTubXho-3down	ATT ACT CGA GGG ATT CAA TTT CCA CG	Konstruktion von Transformationsvektoren
paph-Bam-a	ATT AGG ATC CAT GGA CGA TGC GTT GC	Konstruktion von Transformationsvektoren
DOWN (paph-Pst-b)	ATT ACT GCA GTC AGA AGA ACT CGT CC	Konstruktion von Transformationsvektoren
paph-Pst-b-II	ATT ACT GCA GTC AGA AGA ACT CGT CCA ACA GC	Konstruktion von Transformationsvektoren
paph-Bam-a-II	ATT AGG ATC CAT GGA CGA TGC GTT GCG TGC AC	Konstruktion von Transformationsvektoren
paph1	ATG GAC GAT GCG TTG CGT GCA C	Konstruktion von Transformationsvektoren
paph2	TCA GAA GAA CTC GTC CAA CAG C	Konstruktion von Transformationsvektoren
UP (pHsp-N-5')	ATT AGC GGC CGC ATA ATG GAA AGT CGT TAC	Konstruktion von Transformationsvektoren
pHsp-E-3'	ATT AGA ATT CGA ATA AAG CCT TTT GTC TTG	Konstruktion von Transformationsvektoren
prbcP-E500-5'	ATT AGA ATT CAT GGC ACG AGA TGA TTC CCA AG	Konstruktion von Transformationsvektoren
prbcP-E400-5'	ATT AGA ATT CTA CAG TTG CGA CGA AAC CTA C	Konstruktion von Transformationsvektoren
prbcP-E250-5'	ATT AGA ATT CAT CAA ATC TGC GCG TCA GAG	Konstruktion von Transformationsvektoren
prbcP-C-3'	ATT AAT CGA TAG CGG CCA TCT CTT CTC TGC	Konstruktion von Transformationsvektoren
prbc3'-C-5'	ATT AAT CGA TTA AGC ACC TGC GCG TAG CAG	Konstruktion von Transformationsvektoren

prbc3'-X-3'	ATT ACT CGA GGT TCC CCG TGT GAG GCC TTG	Konstruktion von Transformationsvektoren
pMCS1	CGA TGG ATC CAC CGG TGT CGA CAG CGC TAG CCC ATG GCT GCA GTA CGT ACC TAG	Konstruktion von Transformationsvektoren
pMCS2	CGT ACC TAG GTA CGT ACT GCA GCC ATG GGC TAG CGC TGT CGA CAC CGG TGG ATC	Konstruktion von Transformationsvektoren
ON-aphoS	CTG CAG GAA GAA CTC GTC CAA CAG C	Konstruktion von Transformationsvektoren
1 (ON-GFP1)	CTG CAG ATG GCC AAG GGC GAG G	Konstruktion von Transformationsvektoren
2 (ON-GFP2)	CTG CAG TTA CTT GTA CAG CTC G	Konstruktion von Transformationsvektoren
ON-aph-gfp-1	GGA CAA CGT GCT GCT CGA CC	Konstruktion von Transformationsvektoren
ON-aph-gfp-2	CGT GCT GCT TCA TGT GGT CG	Konstruktion von Transformationsvektoren
ON-FlagM2Nco-1	CAT GGA CTA CAA GGC CTT CGA CAA CCT	Konstruktion von Transformationsvektoren
ON-FlagM2Nco-2	CAT GAG GTT GTC GAA GGC CTT GTA GTC	Konstruktion von Transformationsvektoren
P1 (ON-RT-FT1)	GGA CAA CGT GCT GCT CG	RT-PCR
ON-FT-seq1	CGG TAT CGG AGG AAA AGC	RT-PCR
TO (Prom1IntegVkon)	GGG AAC GCT CTC TAG AGT TT	Kotransformation PCR
FRO (ONARS1N)	AAA GTT GGG CTT TTT GGT GTC	Kotransformation PCR

2.3 Medien

Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Medien zeigt Tab. 5.

Tab. 5. verwendete Medien

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

	MnCl ₂	82 mg
	ZnCl ₂	10 mg
	CoCl ₂	4 mg
	Na ₂ MoO ₄	8 mg
	H ₂ O	ad 1 l
SVM	Hepes	0,6 g
	Na-Glycerophosphat	50 mg
	KCl	50 mg
	Ca(NO ₃) ₂	118 mg
	MgSO ₄	40 mg
	Na ₂ CO ₃	20 mg
	Harnstoff	30 mg
	Thiamin	1 mg
	Biotin	2,5 µg
	Vitamin B12	1,5 µg
	Metall-Lösung	3 ml
	H ₂ O	ad 1 l
	mit 10N NaOH auf pH 8,0 einstellen autoklavieren	
SVMN	wie SVM, ohne Harnstoff	

2.4 Verwendete Puffer und Lösungen

In den Tabellen 6 - 9 sind Puffer und Lösungen, geordnet nach Anwendungsbereichen aufgeführt.

Tab. 6. Puffer für DNA-Isolierung aus *Volvox carteri*

Lysepuffer:	
Tris/Cl (pH 8.0)	50 mM
EDTA	5 mM
NaCl	100 mM
Sarkosyl	2 %

Tab. 7. Puffer für Gelelektrophorese

20x TTE	
Tris	216,0 g
Taurin	72,0 g
EDTA	4,0 g
mit H ₂ O	ad 1,0 l
10x TBE	
EDTA	9,3 g
Borsäure	55,0 g
Tris	108,0 g
mit H ₂ O	ad 1 l
Acrylamid (6%ige Stammlösung)	

19:1 Acrylamid/Bisacrylamid	150 ml
Harnstoff	420,0 g
20x TTE	50,0 ml
mit H ₂ O	ad 1 l
DNA-Gelauftragspuffer (Agarosegele)	
Glycerin	50 %
EDTA (pH 8.0)	10 mM
Bromphenolblau	0,2 %
Xylencyanol	0,2 %

Tab. 8. Puffer für die *Southern*-Hybridisierung

Denaturierungslösung	
NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M
Depurinierungslösung	
HCl	0,25 M
Neutralisierungslösung	
Tris/HCl (pH 8.0)	0,5 M
EDTA (pH 8.0)	1 mM

NaCl	1,5 M
20xSSC	
NaCl	3 M
Na-Citrat (pH 7.5)	0,3 M
Vorhybridisierungslösung (radioaktiv)	
SSC	6 x
SDS	0,5 %
Denhardt,s Lösung	5 x
Heringssperma DNA	100 µg/ml
EDTA	10 mM
Vorhybridisierungslösung (ECL)	
NaCl	0,5 mM
Blocking reagent in ECL-Gold Lösung	5 %
Denhardt,s Lösung (50x)	
Ficoll	1 %
Polyvinylpyrolidin	1 %
BSA	1 %

Tab. 9. Puffer für Proteinanalysen

SDS-Sammelgel	
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	0,33 ml
0,625 M Tris/Cl (pH 6.8)	0,40 ml
0,5 % SDS	0,40 ml
H ₂ O	ad 2 ml
TEMED	2 µl
10 % APS	10 µl
SDS-Trenngel	
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	2,0 ml
0,625 M Tris/Cl (pH 8.8)	1,2 ml
0,5 % SDS	1,2 ml
H ₂ O	ad 6 ml
TEMED	5 µl
10 % APS	30 µl
SDS-Laufpuffer	
Tris-Base	16,1 g
Glycin	72,0 g
SDS	5,0 g
H ₂ O	ad 5 l
SDS-Auftragspuffer (5x)	
Glycerin (50%)	5,8 ml
β-Mercaptoethanol	0,5 ml
Bromphenolblau (0,05%)	0,5 ml

SDS (20%)	2,5 ml
H ₂ O	ad 10 ml
PBS	
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	42,7 g
NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	8,3 g
NaCl	17,5 g
H ₂ O	ad 3 l

2.5 Kultivierung von Organismen

2.5.1 Kultivierung von *Volvox carteri*

Die Kultivierung sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten *Volvox*-Stämme, erfolgte nach der Methode von Starr und Jaenicke (1974), modifiziert von Kirk und Kirk (1986).

Das Kultivieren erfolgte - soweit nicht anders angegeben - in Standard-*Volvox*-Medium (SVM; Provasoli und Pintner, 1958) mit konstanter Belüftung bei 30°C durch Einhaltung eines 16:8 Hell-/Dunkelzyklus konnte ein synchrones Wachstum über drei Generationen hinweg erzielt werden. Zusätzlich zur konstanten Belüftung wurden die Kolben mit den Flüssigkulturen in einem Wasserbad auf 30°C gehalten. Für konstante Beleuchtung im Hellzyklus kamen 10.000 lux *Power groove* Leuchtröhren zum Einsatz, die die Kulturgefäße gleichmäßig ausleuchteten. Stammkulturen wurden in Reagenzgläsern mit jeweils 10 ml SVM oder 10 ml SVMN gehalten und nach zwei bis drei Generationen steril in frisches Medium überimpft.

2.5.2 Kultivierung von Bakterien

Escherichia coli Stämme (2.2) wurden, ausgehend von Einzelkolonien, in Flüssigmedien (2.3) oder auf Festmedien (nach Sambrook et al., 1989) bei 37°C kultiviert. Zur Transformanten selektion wurden LB₀-amp-Platten verwendet, oder LB₀-amp/X-gal/IPTG-Platten, um

zusätzlich ein "Blau-Weiß-screening" (Vieira und Messing, 1982) auf Rekombinanten durchführen zu können. Kleine Flüssigkulturmengen bis zu 5 ml wurden in einem Reagenzglasroller (HeidolphTM, Kelheim) inkubiert. Volumina bis 500 ml wurden in Erlenmeyerkolben im Schüttelwasserbad (G76, New Brunswick ScientificTM, New Brunswick, NJ, USA) inkubiert. Für die Kultivierung auf Festmedien stand ein temperaturkonstanter Brutschrank (MettlerTM) zur Verfügung. Falls erforderlich, wurde das Bakterienwachstum über die Zelldichte mittels Spektrometer (Spectronic 70, Bausch und LombTM) bei 600 nm in Flüssigkulturen verfolgt. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht etwa 8×10^8 Bakterien pro ml.

2.6 Biolistische Transformation von *Volvox carteri*

Die genetische Transformation von *V. carteri* erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden, deren Effizienzen im Verlauf dieser Arbeit miteinander verglichen wurden. Als Rezipienten wurden die *nitA*⁻-Stämme 153-48 (wt-Morphologie) und 153-68 (RegA-Phänotyp) wie auch der weibliche Wildtyp-Stamm HK10 zum Einsatz. Als Selektionsmarker dienten zum einen das *nitA*-Gen auf dem Plasmid pVcNR15 (Gruber et al., 1996) mit der Möglichkeit zur Selektion über das SVMN-Medium mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle. Im anderen Fall wurden verschiedene Konstrukte des *aphH*-Gens dominante Selektionsmarker verwendet. APHVIII verleiht Transformanten Resistenz gegen das Antibiotikum Paromomycin. Das *aphH*-Gen kann (im Unterschied zu *nitA*) in Mutanten- und Wildtyp-Stämmen verwendet werden.

A) Biolistische Transformation nach Schiedlmeier (1994)

Algen mit *regA*-Morphologie wurden vor der Transformation 10-fach konzentriert und die Sphäroide in einem Dounce-Homogenisator geöffnet. Bei Transformationsexperimenten mit dem Plasmid pVcNR15 wurden die Algen zusätzlich gründlich mit SVMN gewaschen, um möglichst alle Reste von Stickstoffquellen zu entfernen. Bei Algen mit wt-Morphologie war es erforderlich, in ersten Experimenten Gonidien zu isolieren, da nur diese noch reproduktive Fähigkeiten besitzen. Nach dem Aufkonzentrieren und dem Öffnen mittels Dounce-Homogenisator 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.

Pro Transformationsansatz wurden von der Plasmid-DNA je 1 µg auf 1 mg Goldpartikel gefällt. In 10 µl 70 % EtOH suspendiert wurden die Goldpartikel anschließend mit 6 Bar Heliumdruck auf die in einer Petrischale befindlichen Sphäroide (ca. 80.000 bis 100.000) bzw. isolierten Gonidien (ca. 30.000 bis 50.000) geschossen. Die Algen wurden in 30 ml SVM bzw. für das Plasmid pVcNR15 in 30 ml SVMN resuspendiert und nach spätestens 3 Tagen das Antibiotikum (10 µg/ml Endkonzentration) zugegeben. Nach weiteren 2 Tagen konnten bereits potentielle Transformanten isoliert und in frisches Medium übertragen werden.

B) Biolistische Transformation mit dem PDS-1000 He-System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Im Gegensatz zur Methode A mußten bei dieser Methode mit höherer Durchschlagskraft die Algen nicht aufkonzentriert und mit einem Dounce-Homogenisator zur Isolierung der Gonidien behandelt werden. Vielmehr wurden ganze Sphäroide als "Ziele des Bombardements" eingesetzt. Die Rezipientenstämme wurden in Flüssigkultur zu einer Gesamtzahl an Sphäroiden von etwa 10.000 bis 30.000 angezogen. Das Medium wurde im Anschluß durch Filtrieren über ein Metall-Nitex-Filter (40 µm) entfernt und ein- bis zweimal gewaschen. Die im Filter befindlichen Algen wurden zusammen mit dem Filter in frisches Medium gesetzt.

Pro Transformationsansatz wurden von der Plasmid-DNA je 1 µg auf 1 mg Goldpartikel gefällt. In 10 µl 100 % EtOH suspendiert, wurden die Goldpartikel dann auf die mitgelieferten *Microcarriers* (Bio-Rad) aufgebracht und anheftendes Ethanol bei 37°C entfernt. Für den anschließenden DNA-Transfer wurden standardmäßig 10.000 bis 30.000 Gesamt-Sphäroide auf dem Metall-Filter in einen ca. 3 cm großen Kreis konzentriert. Nach Anlegen eines Wasserstrahl-Vakuums wurden die Algen durch Bersten der *Rupture discs* bei ca. 60 Bar beschossen. Das Metallfilter wurde daraufhin wieder in das Medium getaucht, um den Algen eine Regenerationspause zu ermöglichen und sie nach Beladen des PDS-1000 Systems erneut zu beschießen. Dieser Vorgang wurde routinemäßig 5 bis 10 mal wiederholt. Nach der Transformation wurden die Algen in 8 bis 12 Petrischalen mit jeweils 30 ml SVM oder

SVMN Medium aufgeteilt. Die Selektion auf 10 µg Paromomycin wurde wie bei A durchgeführt.

2.7 DNA-Methoden

2.7.1 Isolierung von reiner Plasmid DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA wurde sowohl der Plasmid Mini Kit von Qiagen (Hilden) wie auch der Nucleospin Plasmid Kit von Macherey-Nagel (Hilden) verwendet. Dabei wurden jeweils 1,5 - 5 ml einer *E. coli* ÜK eingesetzt. Für die Plasmidpräparation wurde gemäß der Vorschrift des Herstellers verfahren, die sich aus einer alkalischen Lyse, einer anschließenden Neutralisation, dem Binden der freigesetzten DNA an spezielle Membranen und mehreren Waschschritten mit abschließender Elution zusammensetzt. Die resultierende DNA wurde mit 50 µl H₂O eluiert.

2.7.2 DNA-Präparation durch alkalische Lyse

Die Präparation von Plasmid-DNA aus 5 ml Übernachtskulturen wurde nach Sambrook et al. (1989) mittels alkalischer Lyse durchgeführt. Es wurden plasmidhaltige Kolonien in 1,5 - 5 ml LB₀-amp ÜN im Roller (37°C) angezogen. Nach Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, RT, 1 min) wurden die Zellen in 100 µl N1 Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Puffer N2 und 5 min Inkubation bei RT wurden die Zellen lysiert. Nach der Neutralisation mit Puffer N3 wurde 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert (ETZ) und der Überstand in ein neues ERG überführt. Es erfolgte eine drei-minütige Phenol/Chloroform-Extraktion und eine anschließende fünf-minütige Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm). Der Überstand wurde in ein frisches ERG überführt und zweimal mit Chloroform extrahiert, um Reste von Phenol zu entfernen. Anschließend wurde die DNA mit 2,5 Vol Ethanol (abs.) und 1/10 Vol NaAc (pH5.3) 20 min bei -20°C gefällt und sedimentiert (ETZ, 14.000 Upm, 10 min). Nachdem der Überstand verworfen und das Sediment mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet war, wurde die DNA in 60 µl H₂O resuspendiert. Es wurden noch 0,2 µg DNase-freier RNase hinzugegeben um Reste von RNA zu entfernen.

2.7.3 Präparation von RNA aus *Volvox carteri*

Aus synchronen 400 ml *Volvox carteri*-Kulturen wurde von RNA nach Kirk und Kirk (1985) mit leichten Modifikationen isoliert. Es mußte strikt darauf geachtet werden, daß keine RNase-Spuren die Puffer und Gefäße kontaminieren. Deshalb wurden alle Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vor dem Autoklavieren behandelt, bzw. mit DECP behandeltem, sterilem Wasser zubereitet. Weiterhin wurden nur bei 180°C sterilisierte Glasgefäße verwendet. Über 30 µm Nitex-Filter wurden *Volvox*-Kulturen abgeerntet und bei 1.500 Upm sedimentiert. In 5ml Lysepuffer, versetzt mit 0,075g DCC und 0,2 mg/ml Proteinkinase K, wurde das Sediment aufgenommen und 1 h bei 37°C unter regelmäßigem Schütteln auf einem Vortex-Rüttler (alle 10 min) inkubiert. Im Anschluß wurden Proteine durch Zugabe von 660 µl 2M KCL-Lösung, 15 minütiger Inkubation auf Eis und nachfolgender Zentrifugation (Sorvall™ SS34-Rotor, 10.000 Upm, 10 min, 4°C) abgetrennt. 1/3 Volumen 8 M LiCl-Lösung wurden zum Überstand gegeben und über Nacht bei 4°C gefällt. Die RNA wurde am folgendem Tag durch Zentrifugation (Sorvall™ SS34-Rotor, 15 000 Upm, 4°C, 30 min) sedimentiert und anschließend dreimal mit 4 ml einer 2 M LiCl-Lösung gewaschen. Das gewonnene RNA-Sediment wurde dann in 660 µl H₂O resuspendiert. Es folgte die Überführung in ein 1,5 ml ERG und eine weitere Fällung über Nacht bei 4°C durch Zugabe von 200 µl 8 M LiCl. Es wurde wieder sedimentiert (ETZ, 14.000 Upm, 4°C, 20 min) und erneut zweimal mit 2 M LiCl gewaschen und zuletzt in 400 µl H₂O resuspendiert. Daran schloß sich eine weitere Ethanolfällung durch Zugabe von 40 µl NaOAc (pH 5.3) und 100 µl Ethanol (abs.) bei -80°C. Das RNA-Sediment, gewonnen durch Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, 4°C, 60 min) wurde nun dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 200 µl H₂O_{DEPC} gelöst. Die gereinigte RNA wurde bei -80°C gelagert.

Der QIAGEN™ RNA easy Kit wurde bei der Aufreinigung von mRNA aus 200 µg gesamt-RNA eingesetzt. Hierzu wurden 200 µg gesamt-RNA mit 250 µl 2x Bindepuffer, 15 µl, auf 37°C erwärmte Oligotex™-Suspension und H₂O in einem Endvolumen von 515 µl vermischt. Es wurde für 2 min zentrifugiert (ETZ, 14.000 Upm) nach 3 min Inkubation bei 65°C und 10 min Inkubation bei RT. Das Sediment wurde in 400 µl Waschpuffer OW2 (Qiagen) resuspendiert, auf Reinigungssäulchen gegeben und für 30 sec zentrifugiert (ETZ, 14.000

Upm). Nach einem Waschschrift mit 400 µl Waschpuffer OW2 wurde die RNA in 40 µl, auf 70°C erwärmten Elutionspuffer eluiert.

2.7.4 DNA-Isolierung aus *Volvox carteri*

2.7.4.1 DNA Gewinnung in kleinem Maßstab

Kleinere *Volvox*-Kulturen bis zu einer Größenordnung von 100 ml wurden zur DNA-Gewinnung abzentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 1.800 Upm; RT, 10 min) und das Algensediment in 1 Vol Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach Überführung in ein Eppendorfreaktionsgefäß wurde der Ansatz mit 3 Vol 10 % igem Sarcosyl gemischt und 3 min aufgekocht. Nach 1 min-Zentrifugation wurde der Überstand mit Phenol/Chloroform extrahiert und 30 min bei -20 °C mit EtOH gefällt. Das gewaschene und getrocknete Sediment wurde in 50 bis 100 µl H₂O aufgenommen und für PCR-Analysen verwendet.

2.7.4.2 Isolierung genomischer DNA mittels CsCl-Gradienten

Volvox-Kulturen in der Größenordnung von 0,8 bis 1,5 l wurden mit Hilfe einer 30 µm Nitex-Membran geerntet und die Sphäroide ohne Beschädigung der Zellen in einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Die Sphäroid-Fragmente wurden bei 7.000 Upm und 4 °C in einer Sorvall-Zentrifuge 10 min sedimentiert. Nach Zugabe von 1 Vol Lysepuffer (50 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl und 2 % Sarcosyl) und 20 min-Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 1 h bei 12.000 Upm (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,9 g CsCl pro mg Lysat gemischt, 30 min bei -20 °C inkubiert und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (12.000 Upm, 4 °C, 30 min) mit 0,02 mg EtBr pro mg Lysat gemischt und in einer Beckman-Ultrazentrifuge sedimentiert (75 Ti-Rotor, 40.000 Upm, 17 °C, 48 h). Die unter UV-Licht abgezogene DNA-haltige Bande wurde zweimal 2 h gegen TE 10.1 dialysiert. Nach der anschließenden Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA ÜN gegen TE 10.01 dialysiert.

2.7.5 PCR-Amplifikation von DNA

Die *polymerase chain reaction* (PCR) wurde unter folgenden Standardbedingungen in einem 50 µl Ansatz durchgeführt:

- 1-100 ng *template* DNA
- 25-50 pmol *upstream* Primer
- 25-50 pmol *downstream* Primer
- 1µl dNTP-Mischung (je 10 mM)
- 1-3 mM MgCl₂
- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

Der Reaktionsansatz wurde in den Thermocycler (Biometra UnoII) eingesetzt und die DNA nach folgendem Programm amplifiziert:

Denaturierung	3 min, 95°C
Zugabe der Taq-Polymerase	
30-40 Zyklen:	
Denaturierung	1 min, 94°C
<i>primer annealing</i>	1 min, 50-67°C
Elongation	1-3 min, 72°C
Abschluß der Elongation	7 min, 72°C

2.7.6 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurden entweder 1 µg Gesamt-RNA oder 500 ng mRNA eingesetzt. Die Reaktion wurde mit *Superscript II* Reverser Transkriptase (Gibco BRL) nach folgenden Ansatz (20 µl) durchgeführt:

x µl	Gesamt-RNA bzw. mRNA
1 µl	oligodT ₁₈ -Primer
4 µl	5 x Erststrang-Puffer
2 µl	0,1 mM DTT
5 µl	dNTP's (2 mM stock)
add 18,5 µl mit H ₂ O _{DEPC}	
1,5 µl	<i>Superscript II</i> Reverse Transkriptase

Zunächst wurden RNA und Primer in einem 500 µl ERG gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden dann sofort auf Eis gestellt, und das Kondensat nach 5 min durch kurze Zentrifugation (30 s) gesammelt. Anschließend wurden Erststrang-Puffer, DTT und dNTP's auf Eis zugegeben. Hierauf erfolgte die Hybridisierung der Primer mit der RNA für 5 min bei RT, bevor die Reaktion durch Zugabe von Reverser Transkriptase gestartet und dann 1,5 h bei 42 °C (Thermocycler *UNO II*, Biometra) durchgeführt wurde. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Ansätze nach der Reaktion 15 min bei 70 °C inkubiert. Die Proben wurden mit H₂O_{DEPC} (Diethylpyrocarbonat-Zusatz zur Entfernung von RNase-Aktivität) auf 40 µl aufgefüllt und bei –20 °C gelagert.

2.7.7 Synthese von cDNA ausgehend von gesamt-RNA oder mRNA

Zusammen mit 2,5 pmol genspezifischem Primer wurden 3 µg gesamt-RNA bzw. 160 ng polyA-mRNA in einem Gesamtvolumen von 15,5 µl zunächst durch 10 min Inkubation bei 70°C und 1 min Inkubation auf Eis denaturiert. Dann wurden 2,5 µl 10xPCR-Puffer (GIBCO BRL), 2,5 µl MgCl₂ (25mM), 2,5 µl DTT (0,1 M) und 1 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM) zugegeben und für 1 min bei 42°C inkubiert. Gestartet wurde die Reaktion

dann durch Zusatz von 200 Einheiten Superscript™ *reverse transcriptase* (GIBCO BRL). Es folgten 50 min Inkubation bei 42°C und anschließender Abbruch der Reaktion durch Erwärmen auf 70°C für 15 min. Sämtliche RNA wurde durch Zugabe von 1 µl RNase Mix (GIBCO BRL) und Inkubation von 30 min bei 37°C abgebaut.

2.7.8 Enzymatische Spaltung von DNA

Analytische Restriktionsverdau von DNA wurden in 10-20 µl Ansätzen unter Einsatz von 1 bis 3 µg DNA und 3 bis 15 Einheiten Restriktionsenzym sowie 1/10 Volumen Restriktionspuffer durchgeführt. Reaktionsbedingungen bezüglich Inkubationstemperatur und Puffer richteten sich nach Angaben des Herstellers. Für präparative Restriktionsverdau wurden DNA-Mengen bis zu 10 µg eingesetzt und die Enzymmenge dementsprechend angepaßt.

2.7.9 Hybridisierung und Detektion von Nukleinsäuren

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

DNA aus Agarosegelen wurde durch Kapillartransfer (modifiziert nach Southern, 1975) auf Hybond™N⁺-Nylonmembranen (Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese zunächst 20 min in Depurinierungslösung, dann 20 bis 30 min in Denaturierungslösung und schließlich 40 bis 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.

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

RNA aus Agarosegelen wurde analog zur *Southern*-Technik (2.7.9.1) auf Hybond™N⁺-Nylonmembranen (Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Vor dem Kapillartransfer wurde das Gel 10 min in DEPC-behandeltem H₂O und 10 min in 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.

2.7.9.3 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Radioaktive Markierung von DNA wurde mit dem *Random Primed DNA-Labeling Kit* (Roche, Mannheim) durchgeführt. Dazu wurde die DNA (0,1 - 1 µg) zunächst 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Dann wurden die Desoxynukleotide dATP, dGTP, dTTP (je 25 mM Endkonzentration), sowie der Reaktionspuffer mit einem Gemisch statistischer Hexanukleotide (als unspezifische Primer) und [α -³²P]-dCTP (50 µCi, 3.000 Ci/mmol) zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 Einheiten (Units) Klenow-Polymerase gestartet und 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit STE auf ein Volumen von 70 µl gebracht und über eine NucrapTM-Säule (Stratagene, La Jolla, CA, USA) gereinigt. Dazu wurde die Säule mit 70 µl STE angefeuchtet, dann der Ansatz aufgeladen und durchgedrückt und schließlich mit 70 µl STE nachgespült. Wenn nur einzelne Sonden radioaktiv markiert werden mußten, wurde auch eine Auftragsmarkierung durch *Random Primed Labeling* (Hartmann Analytic, Braunschweig) in Anspruch genommen.

2.7.9.4 Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen der Membran

Vorhybridisierung

Zur Denaturierung der in der Vorhybridisierungslösung enthaltenen Heringssperma-DNA wurde diese 5 min auf 95°C erhitzt, anschließend abgekühlt auf 4°C und auf 60°C erwärmt. Daraufhin wurden die Filter mit gebundener DNA (2.7.9.1) unverzüglich 2-3h bei 60°C in Vorhybridisierungslösung inkubiert.

Hybridisierung

In den Vorhybridisierungsansatz wurden direkt die radioaktiv markierten Sonden gegeben. Es wurde dabei eine Menge von ca. 1×10^6 cpm/ml eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte je nach Stringenz bei 60-65°C unter leichtem Schütteln über Nacht.

Waschen der Membran

Die Membranen wurden nach der Hybridisierung gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Dazu wurde zweimal bei RT für 10 min und zweimal bei 60-65°C für 15 min mit 0,2 x SSC / 0,1 % SDS gewaschen.

Die Filter wurden im Anschluß auf Whatman-Papier getrocknet, in Folie eingewickelt und für die Autoradiographie (2.13) verwendet.

2.7.10 DNA Sequenzanalyse und Sequenzbearbeitung

Die DNA-Sequenzanalyse wurde größtenteils als Auftragssequenzierung an einem ABI 310 Sequencer von der Fa. Entelechon (Regensburg) durchgeführt.

Sequenzen wurden vor allem mit folgenden Programmen computergestützt ausgewertet:

- Zahlreiche Auswertungen wie Erstellung von Restriktionskarten und *alignments* sowie Genstrukturvorhersagen wurden mit dem GCG-Programmpaket (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.) durchgeführt.
- Zur schnellen Erstellung von *alignments* und Exon-Intron-Abgleichung diente *Dotlet* von Marco Pagni und Thomas Junier (Schweizerisches Institut für Bioinformatik; <http://www.isrec.isb-sib.ch/java/dotlet/Dotlet.html>)
- Datenbanksuchen wurden v.a. mit BLAST (Altschul et al., 1997) in den Datenbanken am NCBI durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- Für weitere Analysen wurden zahlreiche im Internet verfügbare Datenbanken und Programme benutzt.

2.8 Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Für die Auftrennung von unterschiedlichen DNA-Fragmenten einer Größe von 0,1 - 20 kb wurden Agarose-Gele verwendet. Diese enthielten, je nach Auftrennungsbereich, 0,8 - 1,6% Agarose in 1 x TBE (2.4). Für die Detektion der DNA unter UV-Licht wurden 0,5 µg/ml EtBr zugesetzt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE (2.4) verwendet. Die DNA wurde, versetzt mit 1/10 Vol DNA-Gelauftragspuffer (2.4) auf das Gel aufgetragen und anschließend elektrophoretisch

bei einer Stromstärke von 20-90 mA zwischen 1 und 5 h aufgetrennt. Durch die Fluoreszenz des interkalierenden EtBr unter einem UV-Leuchtschirm (Chromato-Vue Transilluminator, Modell C60; Ultra Violet Products Inc.) wurden die DNA-Banden detektiert. Die sichtbaren DNA-Fragmente wurden mittels einer digitalen Kamera (KappaTM CF 8/1 DX-Kamerasystem) fotografiert. Als DNA-Längenstandard diente ein parallel zu den DNA-Fragmenten aufgetragener, kommerzieller peqGOLD 1 kb DNA-Leiter Standard (250 - 10.000 bp; Peqlab, Erlangen).

2.9 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Isolierung von DNA mit dem GFXTM Gel Extraction Kit

Aus präparativen Agarosegelen (2.8) wurden unter UV-Licht die zu isolierenden DNA-Fragmente ausgeschnitten und in ein ERG überführt. Im Anschluß daran wurde die Agarose nach Zugabe von gleichem Vol *Capture*-Puffer bei 50°C unter regelmäßigem Aufschütteln aufgelöst. Nach vollständiger Auflösung der Agarose wurde die DNA abzentrifugiert und mittels einer Pipette auf GFX-Säulchen übertragen und dort 1 min bei RT inkubiert. Nach einmaliger Zentrifugation (ETZ, 14.000 Upm, 30 sec) wurde dann einmal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Die Matrix-gebundenen DNA-Fragmente wurden im Anschluß an eine 1 minütige Inkubation bei RT mit 50 µl H₂O eluiert. Davon wurden dann 4 µl als Kontrolle auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen (2.8) und die Reinheit überprüft.

2.10 Protein-Methoden

2.10.1 Denaturierende Proteinextraktion aus *V. carteri*

Proteinextrakte aus *V. carteri* für die analytische Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden durch 3 min-Aufkochen der geernteten Sphäroide bzw. Somazell- und Gonidienfraktionen in 2 Vol SDS-Extraktionspuffer (2 % SDS, 60 mM Tris/Cl pH 6,8) gewonnen. Die Proteinmenge wurde mit Hilfe des DC Protein Assay (Biorad, New York, USA) nach Angaben des Herstellers photometrisch bestimmt.

2.10.2 Native Proteinextraktion aus *V. carteri*

Die Extraktion nativer Proteine umfaßte mehrere Schritte. Nach Ernte der Algen aus 1,6 l Kulturen, wurden diese 1-3 Gefrier- und Auftaudurchläufen unterzogen. Im Anschluß daran erfolgte der Aufschluß der Sphäroide durch *French press*. Die gewonnene Zellsuspension wurde mit Protease-Inhibitoren versetzt und 1 h in der Ultrazentrifuge bei 50.000 upm zentrifugiert. Der klare, leicht grünliche Überstand aus cytosolischen Proteinen wurde dann über Centricon-Röhren mit 10 kDa Ausschlußgrenze auf etwa 1 ml eingeeengt. Die darin enthaltene Proteinmenge wurde mit dem DC Protein Assay (Biorad, New York, USA) bestimmt.

2.10.3 Proteinanalyse

Ein Proteingemisch kann aufgrund des Molekulargewichts der unterschiedlichen Proteine durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Hierfür werden Proteine für 5 min bei 100 °C vor der Auftragung auf das Gel mit 5 x SDS-Auflaufspuffer (2.4) inkubiert. In diesem ist SDS enthalten, welches die Proteine denaturiert und mit seinen aliphatischen Resten an hydrophobe Bereiche des Proteins bindet und diesem dadurch eine negative Gesamtladung verleiht.

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte in Platten-Gelen. Das Gel wurde dafür zwischen zwei absolut sauberen Glasplatten gegossen. Zunächst wurde das Trenngel bis etwa 2 cm unter den oberen Rand gegossen, nach Zugabe von APS und TEMED (2.4) und mit 500 µl H₂O überschichtet. Nach dessen Auspolymerisierung wurde das Wasser vollständig abgegossen und das Sammelgel nach Zugabe von APS und TEMED eingefüllt. Der Teflonkamm wurde zuletzt eingesetzt. Dieser wurde vor dem Lauf vorsichtig herausgezogen und die Gummidichtung zwischen den Glasplatten entfernt. Die vorbereiteten Proben wurden aufgetragen, nachdem die Platten in die Apparatur eingesetzt waren und der Laufpuffer eingefüllt worden war. Die Elektrophorese wurde dann bei 30 mA für 2-3 h durchgeführt. Als Proteinstandard diente der Multi Mark™ Multi-Colored Standard (Novex) und der See Blue™ Pre-Stained Standard (Novex). Im Anschluß an den Lauf wurden die Proteine mit Färbelösung ca. 15 min ge- und mit Entfärbelösung über Nacht entfärbt.

2.10.4 Übertragung von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen (*Western Blot*)

Für die spezifische Proteindetektion mit immunologischen Methoden wurden sowohl die denaturierend, wie auch nativ gewonnenen Proteinproben (2.10.2) über SDS-PAGE aufgetrennt und in Transferpuffer (2.4) durch elektrophoretischen Transfer (400 mA, 90 min) in einer TE 22 *Mighty Small Transphor Tank Transfer Unit* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) auf HybondTMECLTM-Nitrocellulosemembranen (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) übertragen. Antigenen wurden durch spezifische Verdünnung der primären Antikörper (Anti-Aph; Anti-FLAG[®]M2, polyklonaler Anti-FLAG, Sigma) in Blockierlösung (2.4) ÜN bei 4 °C, nachfolgende Waschschrte in TBS mit 0,2 % Tween 20 und die anschließende 1h-Inkubation mit Meerrettichperoxidase-markiertem sekundären Antikörper detektiert. Für die Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Reaktionen wurde der *ECL Western Blotting Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verwendet und die Signale auf HyperfilmTM (Amersham Biosciences, Freiburg) dokumentiert.

Quantitative Auswertungen wurden nach Digitalisierung der Filme mit Hilfe des ImageMaster 1D-Programmpaketes (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

2.11 Klonierungen

2.11.1 Dephosphorylierung von DNA

Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsverdau (2.7) linearisiert. Nach Fällung mit Ethanol und Resuspendierung in 34 µl H₂O wurde das Plasmid zu zur Verhinderung der Religation am 5' Phosphat durch Zugabe von 4 µl 10 x alkalischer Phosphatase-Puffer und 2 µl alkalischer Phosphatase (1 U/µl) dephosphoryliert. Nach 30 min Inkubation bei 34°C wurde die Vektor-DNA über präparative Agarosegelelektrophorese (2.8) und anschließender Gelextraktion (2.9) gereinigt.

2.11.2 Behandlung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Polymerase und T4-Polynukleotidkinase

Synthetische Oligonukleotide, die als Primer bei der PCR verwendet werden, tragen am 5'-Ende keine Phosphatgruppe. Außerdem hängt die Taq-Polymerase (Goldstar, DNA-Polymerase, Eurogentec, Belgien) am 3'-Ende unspezifisch ein Nukleotid an. Um nun solche PCR-Fragmente für die Klonierung vorzubereiten wurden daher zu 13 µl DNA, 4 µl 5 x T4 Polynukleotidkinasepuffer (Boehringer, Mannheim), 1 µl ATP (0,1 M) und 2 Einheiten T4 Polynukleotidkinase (Boehringer, Mannheim) gegeben und 45 min bei 37°C phosphoryliert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die DNA wurde nach zweimaliger Phenol/Chloroform-Extraktion mit Ethanol gefällt und in 30 µl H₂O resuspendiert. Um glatte Enden herzustellen, wurden die DNA-Fragmente mit 4 µl 10 x T4 DNA-Polymerase-Puffer (Boehringer, Mannheim), 2 µl BSA (1mg/ml), 2 µl 2mM dNTPs und 2 Einheiten T4 DNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) 20 min bei 12°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl 0,5M EDTA und 10 min Inkubation bei 75°C wurde diese Reaktion gestoppt. Die Reinigung der Fragmente wurde über eine präparative Agarosegelelektrophorese (2.8) und anschließender Gelextraktion (2.9) gereinigt.

2.11.3 Ligieren von DNA-Fragmenten

Vorbereitete DNA-Fragmente wurden mit Vektor-DNA in einem Verhältnis von 3:1 bei einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Zugabe von 4 µl 5 x T4-DNA-Ligase Puffer (BRL, Gaithersburg, MD, USA) und einer Einheit T4-DNA-Ligase (BRL, Gaithersburg, MD, USA) ligiert. Dazu wurde entweder über Nacht bei RT für *blunt ends* oder bei 15°C für *sticky ends* ligiert.

2.12 Transformation von *E. coli* und Transformanten-Analyse

Für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde das Verfahren von D. Alexander (ARCO Plant Research Institut, Stanford, USA) benutzt. 1 ml ÜK (*E. coli* DH10B) wurden in 100 ml LB₀-Medium angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C im Wasserbad (G76,

New Brunswick Scientific™) geschüttelt und nach Zugabe von 2 ml 1 M MgCl₂ weitere 10 min bei 37°C und anschließend 1 h in Eiswasser inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (Sorvall SS34-Rotor, 5.000 Upm, 4°C, 5 min), in 40 ml Puffer A (100 mM CaCl₂, 70 mM MnCl₂, 40 mM Na-Acetat pH5.5) aufgenommen und 1 h bei 4°C inkubiert. Die Bakterien wurden nach erneuter Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor, 5.000 Upm, 4°C, 5 min) in 4 ml Puffer B (100 mM CaCl₂, 70 mM MnCl₂, 40 mM Na-Acetat pH5.5, 15% Glycerin) resuspendiert. Bis zum Gebrauch wurden die kompetenten Zellen in 200 µl Proben bei -80°C gelagert. Transformiert wurde durch Zugabe der DNA aus dem gesamten Ligierungsansatz (2.11) zu 80 µl kompetenter Zellen, 30 min Inkubation auf Eis und 5 min Inkubation bei 37°C (Hitzeschock). Dieser Ansatz wurde auf Indikatorplatten mit Ampicillin, X-Gal und IPTG gebracht. Nach 8-12 h Inkubation bei 37°C konnten Transformanten als weiße oder blaue Kolonien durch „Blau-Weiß-screening“ (Vieira und Messing, 1982) identifiziert werden.

2.13 Autoradiographie

2.13.1 Autoradiographie mittels Röntgenfilm

Durch Exposition der in Cellofan-Folie eingepackten Membranen mit einem Röntgenfilm (Fuji™ Photo Film co., Japan oder Hyperfilm™ECL™, Amersham Biosciences, Freiburg) erfolgte die Detektion von radioaktiv-markierten Molekülen, die auf Membran fixiert waren (*Southern*-, *Northern*-, *Western*-Blot). Der Film wurde daraufhin 3 min entwickelt (Rodinal Filmentwickler, Kodak™), 5 min fixiert (Tetenal Fixiersalz, Kodak™) und nach kurzem Spülen mit H₂O an der Luft getrocknet.

2.13.2 Autoradiographie mittels PhosphorImager

Zur radioaktiven Autoradiographie wurde auch ein PhosphorImager (Cyclone™ Storage Phosphor System, Packard Instruments Co., Meriden, CT, USA) eingesetzt. Dazu wurden auf die in Cellofan-Folie eingepackten Membranen spezielle *screens* ca. 1 bis 15 h aufgelegt, die anschließend im PhosphorImager gemessen wurden. Die in digitaler Form vorliegenden Daten wurden mit der zugehörigen Software (OptiQuant V. 2.50) ausgewertet. Auf diese Weise war

eine sowohl schnelle als auch reproduzierbare quantitative Analyse der Autoradiogramme möglich.

2.14 Test von *Volvox*-Cotransformanten auf Arylsulfatase-Aktivität

Zur qualitativen Analyse von potentiellen Cotransformanten auf Arylsulfatase-Aktivität wurden ca. 100 Sphäroide in 3 ml SVM-Medium überführt und X-SO₄ (5-Bromo-4-Chloro-Indolylsulfat) zu einer Endkonzentration von 0,3 mM zugegeben. X-SO₄ wird als chromogenes Substrat von Arylsulfatase gespalten, wobei nach Oxidation durch Luftsauerstoff ein blauer Indigofarbstoff entsteht. Cotransformanten, die die exogene Arylsulfatase exprimieren, konnten deutlich anhand der nach ca. 6 h eintretenden Blaufärbung der Sphäroide identifiziert werden (Hallmann and Rappel, 1999).

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl des *aphH*-Gens als selektiven Marker

Ziel dieser Arbeiten war die Etablierung eines neuen dominanten Selektionsmarkers für die genetische Transformation von *V. carteri*. Die erforderliche Expression des eingebrachten Fremdgens in *Volvocaceae*n, wie z.B. *Chlamydomonas reinhardtii* und *V. carteri*, bringt Probleme mit sich, wie sie bereits in früheren Arbeiten beschrieben wurden (Schiedlmeier et al., 1994; Lumbreras et al., 1998). So treten *epigenetic silencing*, vermittelt durch DNA-Methylierung oder Änderungen in der Chromatin-Struktur, auf (Babinger et al., 2001). Ferner kennt man den raschen Abbau von mRNA (Cerutti et al., 1997), der durch ineffektive Translation aufgrund ungeeigneter Codons im Transkript ausgelöst wird (Quinn et al., 1993). Dieser Sachverhalt könnte auch die schwachen Expressionsraten von Fremdgenen in *C. reinhardtii* erklären, obwohl diese mit starken endogenen Promotoren fusioniert wurden (Lumbreras und Purton 1998). Eine Lösung für die auftretenden Probleme ist die Auswahl oder Synthese von Fremdgenen mit geeigneter *codon usage* und ihrer Expression unter Kontrolle von starken endogenen Promotoren und *enhancern*. Zusätzlich wird die Stabilität des Transkripts durch eine geeignete endogene 3'-nicht-translatierten Region (NTR) mit einem oder mehreren polyA-Signalen erhöht.

Ein weiteres Argument für die Auswahl eines neuen selektiven Markers für *V. carteri* ist die Tatsache, daß bis jetzt nur das bakterielle Resistenzgen *ble* (Hallmann et al., 1999) und das Gen für die Nitratreduktase *nitA* (Schiedlmeier et al., 1994) als dominante Marker zur Verfügung stehen. Das *ble*-Gen vermittelt zwar hohe Resistenz gegen das eingesetzte Antibiotikum Zeocin, hat aber den Nachteil, Mutationen zu induzieren. Des Weiteren ist es erforderlich, Zeocin in stöchiometrischen Mengen zu verwenden, weshalb trotz starker Expression des *ble*-Gens relativ geringe Dosen des Antibiotikums den praktischen Einsatz einschränken (Fuhrmann et al., 1999). Ein weiterer Nachteil ist die lange Systemzeit zwischen Transformation und Selektion resistenter Zellen, die für das *ble*-System bei 9 bis 15 Tagen (Hallmann, pers. Mit.) liegt. Dies trifft auch für die Selektion von Nit^+ -Transformanten zu, die *Nit*-auxotrophe Rezipienten voraussetzen. Auch in diesem System kann man die ersten potentiellen Transformanten erst nach ca. 11 Tagen vereinzeln und für weitere Analysen verwenden. Eingeschränkt wird das *nitA*-System insbesondere durch die Abhängigkeit von

Nit⁻-Mutanten als Rezipienten, wie z.B. vom *Volvox*-Stamm 153-48 (Nit⁻), dessen Mutation durch erfolgreiche Transformation komplementiert wird. Ein geeigneterer Marker versprach das resistenz-vermittelnde Gen *aphH* (früher *aphVIII*) aus *Streptomyces rimosus* zu sein, das eine Aminoglycosid-Phosphotransferase codiert und das Resistenz gegen das Antibiotikum Paromomycin vermittelt (Danilenko et al., 1997).

Das als neuer Selektionsmarker verwendete Gen *aphH* (60 % GC-Gehalt) hat einen ähnlichen GC-Gehalt wie *V. carteri* (59 % GC), und die Auswahl der bevorzugten Codons stimmt bei *S. rimosus* und *V. carteri* sehr gut überein (Schmitt et al., 1992; Sizova et al., 2001). Die codierende Region von *aphH* beträgt 804 bp und codiert eine 30 kDa Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs VIII (Danilenko et al., 1997). Diese Klasse zeichnet sich dadurch aus, dass es das γ -Phosphat von ATP auf die Hydroxyl-Gruppe in der 3'-Position von Aminoglykosid-Antibiotika, wie Neomycin und Paromomycin (Abb. 2) (Schroeder et al., 2000) überträgt. Das modifizierte Antibiotikum kann nicht länger an seinen Zielort am Ribosom binden, um dort effektiv die Proteinsynthese auf Translokationsebene zu verhindern. Bekannte Antibiotika, die durch APHVIII inaktiviert werden, sind Kanamycin, Neomycin, Gentamycin und Paromomycin. Der Vorteil von APHVIII liegt in dessen Möglichkeit, selbst geringe Mengen dieser Antibiotika äußerst schnell und effektiv unschädlich zu machen (Davis und Wright, 1997). Eine hohe Expressionsrate des zusammengesetzten *aphH* Gens hat keinen drastischen Effekt auf Wachstum und Entwicklung von *V. carteri*. Andererseits zeigt der Wildtyp Stamm HK10 eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Paromomycin und wird bereits bei 2 μ g/ml vollständig im Wachstum gehemmt.

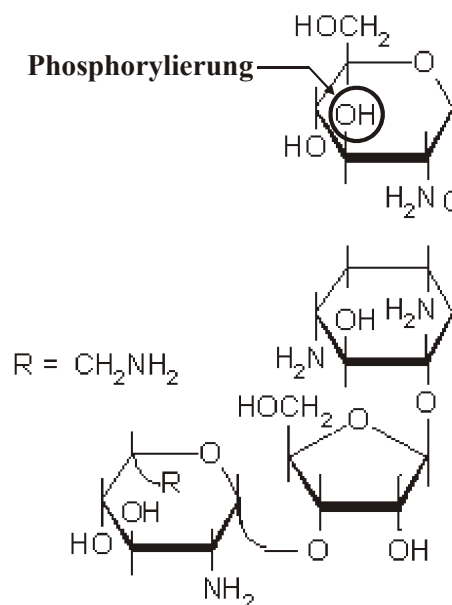


Abb. 2 Das Antibiotikum Paromomycin und seine Inaktivierung durch 3'OH-Phosphorylierung (nach Schroeder et al., 2000).

3.1.1 Bestimmung der natürlichen Paromomycin-Toleranzgrenze von den *V. carteri* – Stämmen 153-68 und 153-48

Für die Transformationsexperimente in dieser Arbeit wurden die drei *Volvox*-Stämme HK10, 153-48 (*nitA*) sowie 153-68 (*nitA*, *regA*) verwendet. Da in vorausgegangenen Arbeiten ebenfalls die Stämme 153-48 und HK10 (Hallmann and Rappel 1999; Schiedlmeier et al., 1994) zum Einsatz kamen, sollten sie in dieser Arbeit unter vergleichbaren Bedingungen transformiert werden. Der *Volvox*-Stamm 153-68 ist gekennzeichnet durch zwei unterschiedliche Mutationen. Die erste Mutation inaktiviert das Nitratreduktasegen (*nitA*), was sich dadurch äußert, dass dieser Stamm andere Stickstoffquellen als Nitrat für sein Wachstum benötigt. Die zweite Mutation im sogenannten *regenerator*-Gen (*regA*) bewirkt bei diesem Stamm eine Redifferenzierung aller somatischen Zellen (Kirk et al., 1999; Stark and Schmitt, 2000), wodurch sich die Zahl der reproduktiven Zielzellen für die Transformation auf 400 - 600 erhöht. Aus diesem Grund wurden erste Transformationsexperimente mit *V. carteri* 153-68 durchgeführt. Für die Bestimmung der natürlichen Grundresistenz dieser Ausgangsstämme gegenüber Paromomycin, wurden jeweils ca. 200 Sphäroide in einzelne Schalen einer Kulturplatte überführt, die Endkonzentrationen von 0; 1; 2; 3; 5; 10; 15 und 20 µg/ml des Antibiotikums in SVM enthielten. Paromomycin bewirkt nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen das Ausbleichen nicht-resistenter Algen. Mit diesem Test konnte die natürliche minimale Hemmkonzentration (MHK) der verwendeten Stämme bestimmt werden, die bei 2 µg/ml Paromomycin liegt, d.h. keiner der drei Stämme untransformierter Algen überlebte Konzentrationen von ≥ 2 µg/ml Paromomycin. Für die Selektion von Transformanten wurde deswegen immer eine Konzentration von 10 µg/ml Paromomycin eingesetzt, um so das Anwachsen nicht-resistenter Ausgangsstämme auszuschließen. Bei den Stämmen 153-68 und 153-48 konnten keine spontanen Pm^R-Revertanten unter 10⁷ reproduktiven Zellen gefunden werden.

3.1.2 Wesentliche Komponenten für die Fremdexpression des *aphH*-Resistenzmarkers in *Volvox*-Zellen

Um einen neuen Selektionsmarker für *V. carteri* zu entwickeln, ist es erforderlich, das resistenz-vermittelnde Gen in einen für *Volvox* spezifischen Kontext zu bringen. Ein für diesen Zweck geeignetes Konstrukt benötigt einen endogenen Promotor, der in *Volvox* durch

verschiedene Faktoren aktiviert bzw. reguliert werden kann. Die Stärke der Expression und die dadurch vermittelte Resistenz werden durch die Auswahl und Zusammensetzung von verschiedenen Promotorsequenzen wesentlich beeinflusst (Schroda et al., 2000). Aus diesem Grund war es das primäre Ziel bei der Konstruktion von Transformationsplasmiden, einen starken Promotor zu finden.

Bei den anschließenden Konstruktionen wurden zwei unterschiedliche Promotoren verwendet. Dabei handelte es sich um den endogenen *Volvox* β 2-Tubulin-Promotor (Harper & Mages, 1988) sowie einen Kombinationspromotor aus Teilen der *V. carteri* *rbcS3*-Promotorregion (GenBank Accession Number AY205158) und des *V. carteri* *Hsp70A*-Promotors (Miller, persönliche Mitteilung), welche für die Transformation eingesetzt wurden. Bei der Auswahl geeigneter Promotorregionen ist zu beachten, dass es nicht ohne weiteres möglich ist, Promotoren zwischen den nahe verwandten Algen *V. carteri* und *C. reinhardtii* auszutauschen. So bewirkt zwar der *Volvox* β 2-Tubulin-Promotor in *C. reinhardtii* eine effektive Expression aber andererseits funktionieren *Chlamydomonas* und *Volvox* *nit-1* bzw. *nitA* Promotoren nicht im jeweils verwandten Organismus, was auch für Argininosuccinatlase gilt (O. Heinrich, 1999 Dissertation Uni-Regensburg). Deswegen wurde der von Schroda et al. (2000) für *C. reinhardtii* entwickelte, starke, konstitutive Promotor aus Hitzeschock (*Hsp70A*)- und Rubisco (*RbcS3*)-Elementen aus *Volvox*-eigenen Sequenzen aufgebaut. Weitere Komponenten für die Konstruktion waren die endogenen 3' Regionen mit polyA-Signal. Es handelte sich um die jeweils zum eingesetzten Promotor korrespondierende 3'-NTR. So wurde im Fall des β 2-Tubulin-Promotors auch die 3'-NTR dieses Gens verwendet und im Fall des Kombinationspromotors aus *hsp70* und *rbcS3* die 3'Region des *rbcS3*-Gens eingesetzt, um so die transkribierte mRNA gegen Abbau zu schützen. Zusätzlich zu diesen Komponenten wurde in einem weiteren Konstrukt eine *aphH/gfp*-Fusion unter Verwendung des künstlichen *gfp*-Gens (Fuhrmann et al., 1999) hergestellt. Mit Hilfe dieses Konstruktes sollte es möglich sein, die Expression des Fusionsproteins durch Fluoreszenz nachzuweisen.

3.1.3 Auswahl und Einsatz eines starken *Volvox* Promotors

Untersuchungen an der einzelligen Grünalge *C. reinhardtii* zeigten, dass eine Kombination aus dem Promotorbereich des Hitzeschockgens *hsp70* und der Promotorregion der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase (*rbcS*) einen starken Promotor ergibt

(Schroda et al., 2000), der es ermöglicht, die Gen-Expression zu erhöhen. Zur Herstellung eines analogen *Volvox*-Promotors wurden die drei bekannten *rbcS*-Gene (*rbcS1-rbcS3*) von *V. carteri* (Jakobiak, Diplomarbeit Uni-Regensburg) kloniert und sequenziert (Abb. 3A). Da es sich bei diesen um äquivalente Kopien handelt, war zu testen, ob eine der drei und welche die stärkste Expression aufweist. Mittels *Northern-Blot*-Analyse (Abb. 3B) wurde gezeigt, daß der Promotor der dritten *rbcS*-Kopie (*Prbc3*) am stärksten exprimiert wird. Deshalb wurde der *rbcS3*-Promotorbereich für die anschließenden Konstruktionen weiter eingengt und dann eingesetzt.

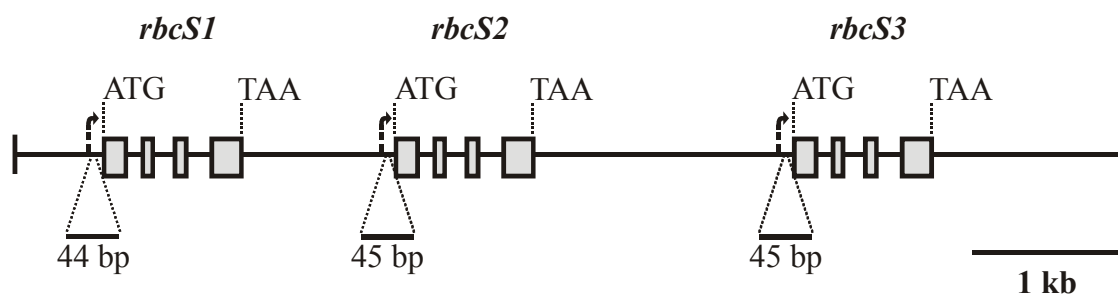


Abb. 3A Tandem-Anordnung der drei bekannten Rubisco-Gene im *V. carteri*-Genom

Die Transkriptionsstarts der einzelnen Kopien sind mit gebrochenen Pfeilen gekennzeichnet. Die drei unterschiedlichen Sequenzbereiche zwischen +1 und dem jeweiligen ATG-Start-Codon sind markiert; sie wurden als Sonden für die *Northern-Blots* verwendet.

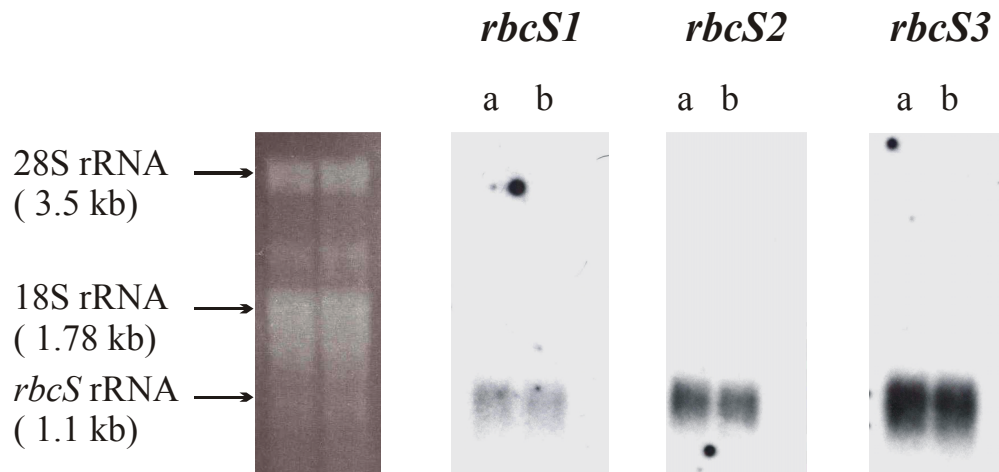


Abb. 3B Northern-Blot-Analyse der drei *rbcS*-Kopien von *V. carteri* (Abb. 3A)

Gleiche Mengen an Gesamt-RNA (15 µg) wurden in jeder Spur aufgetragen. Die Spuren (a, b) repräsentieren unabhängige RNA-Präparationen aus unsynchronisierten Algen. 5'-NTR Sequenzen (Abb. 3A) der drei Gene dienten als radioaktiv-markierte Sonden, um so spezifische Signale der einzelnen Kopien zu gewährleisten.

3.1.4 Konstruktion von Transformationsplasmiden

Da der Promotor des $\beta 2$ -Tubulins bisher als einziger starker *Volvox*-spezifischer Promotor eingesetzt wurde, fand er für die Konstruktion des Plasmids pPmr1 Verwendung (Abb. 4). Ein 0.5 kb-Fragment aus der 5'-NTR des *V. carteri* $\beta 2$ -Tubulin-Gens (Harper & Mages, 1988), das den gesamten Promotor enthält, wurde vor das *aphH*-Gen kloniert. Um die mRNA dieses Konstrukts zu stabilisieren, wurde es am 3'-Ende mit der 3'-NTR des *V. carteri* $\beta 2$ -Tubulin-Gens fusioniert. Mit diesem Vektor wurden orientierende Transformationsexperimente mit dem *Volvox*-Stamm 153-68 durchgeführt und Transformationsraten von ca. 5×10^{-5} erzielt.

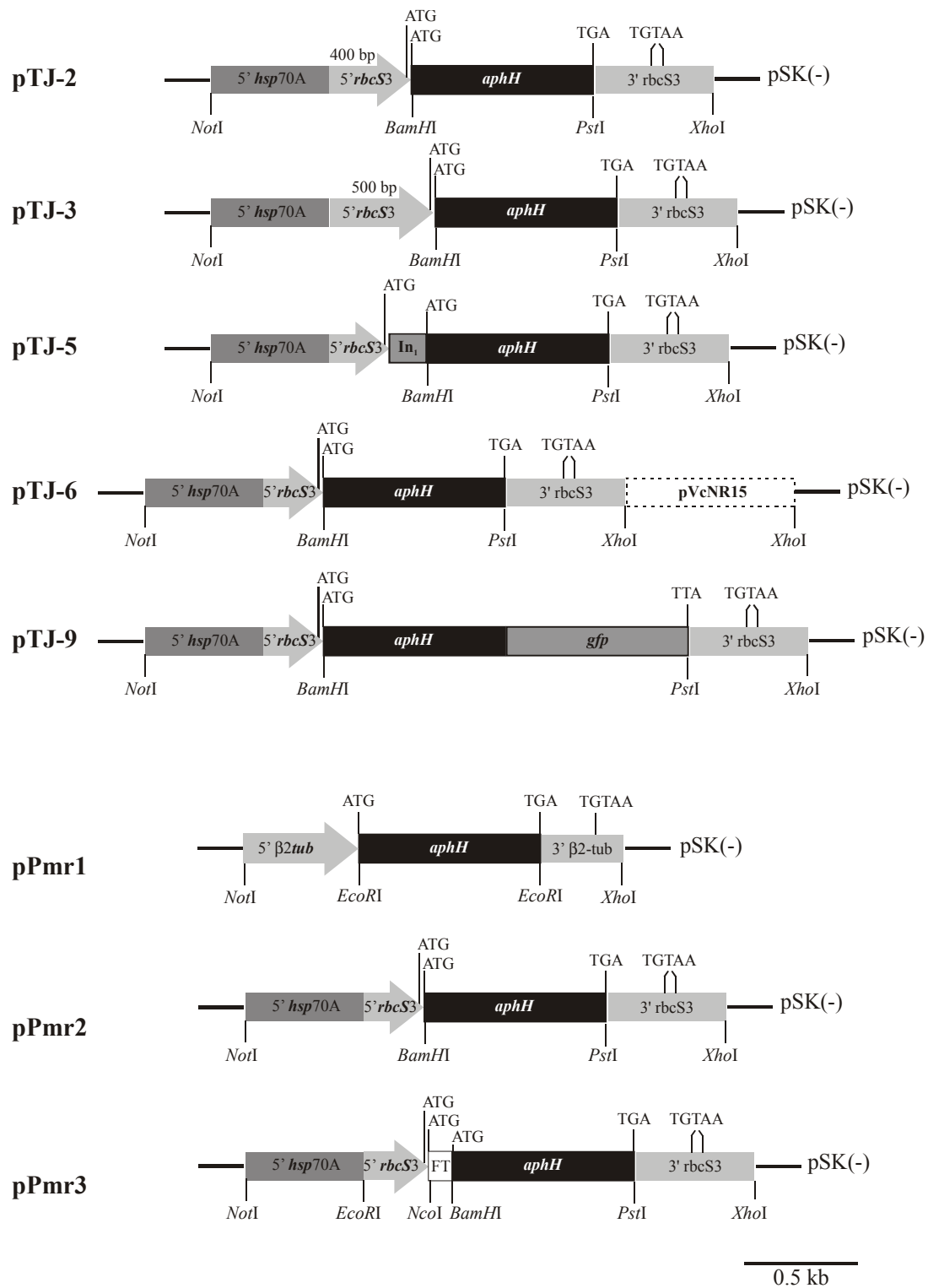


Abb. 4 Physikalische Karte der chimären Konstrukte, eingesetzt in den *E. coli* pBluescript Vektor pSK(-)

In₁, Intron 1 des *rbcS3*-Gens; FT, 27 bp langes FLAG[®]-Epitop; *gfp*, synthetisches *gfp*-Gen (GenBankAccession AF188479); pVcNR15, vollständiges Plasmid (7572 bp); Translations-Start (ATG)

und Stop (TGA) Codons und Polyadenilierungs-Signale (TGTA) sowie essentielle Schnittstellen sind mit Strichen markiert.

Eine Möglichkeit, die beobachtete Transformationsrate (5×10^{-5}) zu erhöhen, war der Einsatz des *Volvox*-spezifischen, stärkeren Hybridpromotors aus *hsp70A* und *rbcS3* Elementen. Die Konstruktion dieser Vektoren ist in Abb. 5 dargestellt. Ein 0.5 kb *NotI/EcoRI*-Fragment des *V. carteri*-eigenen *hsp70*-Gens wurde vor das *aphH*-Gen kloniert. Im Anschluss wurden drei unterschiedlich lange Promotorregionen (0.25 kb; 0.4 kb; 0.5 kb) des *V. carteri rbcS3*-Gens über PCR mit spezifischen Schnittstellen (*EcoRI* und *BamHI*) an beiden Enden amplifiziert. Diese Fragmente wurden C-terminal an den *hsp70*-Promotor und vor das *aphH*-Gen (mittels PCR-Reaktion mit den Schnittstellen *BamHI/PstI* versehen) kloniert. An das 3'-Ende des *aphH*-Gens wurde noch ein 0.5 kb *PstI/XhoI*-Fragment der 3'-NTR mit PolyA-Signal des *V. carteri rbcS3*-Gens ligiert, um die RNA zu stabilisieren (Plasmide pPmr2, pTJ-2 und pTJ-3; Abb. 4). Mit dieser Auswahl an Plasmiden wurden weitere Transformationsexperimente durchgeführt.

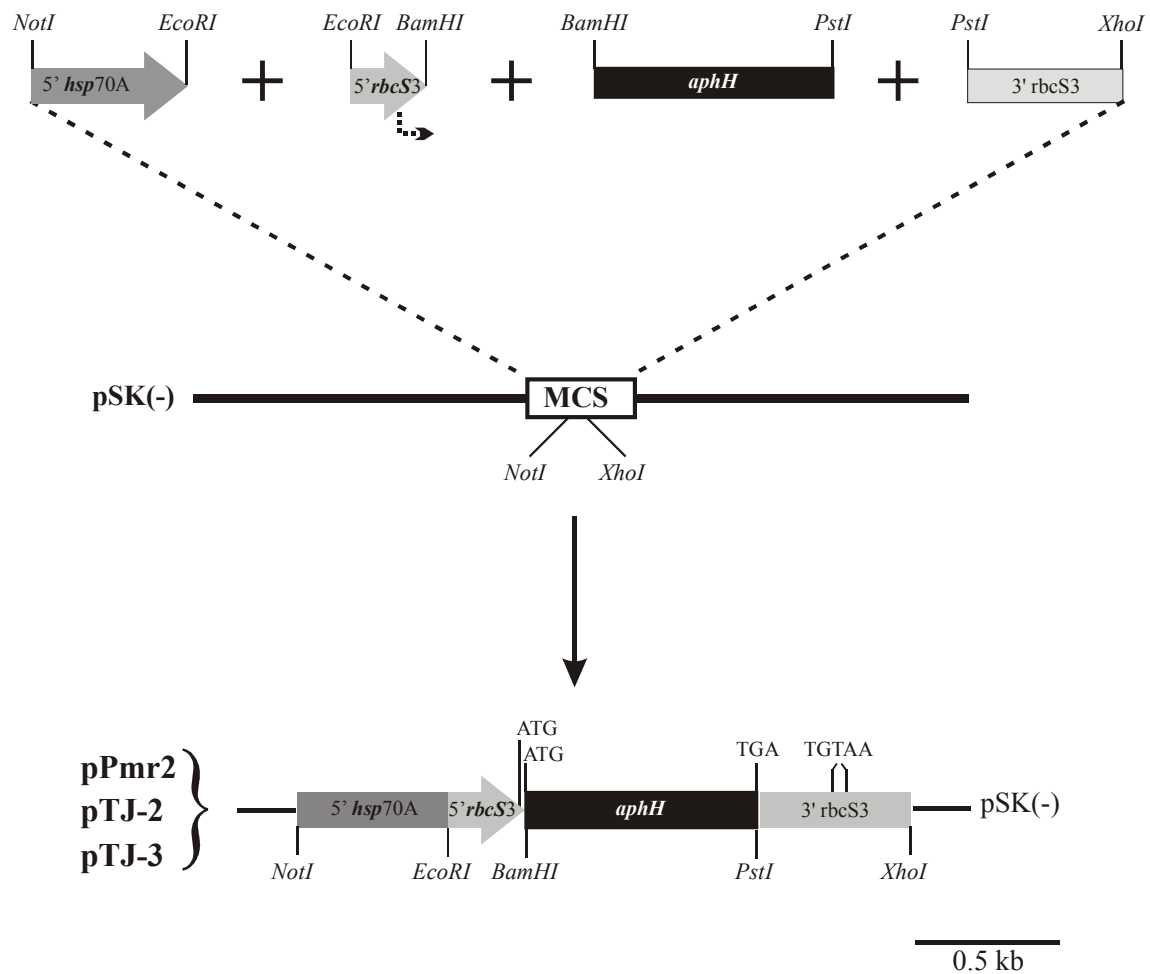


Abb. 5 Fließdiagramm der Konstruktion von pPmr2, pTJ-2 und pTJ-3

MCS, *multiple cloning site*; die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen sind wie folgt abgekürzt; B, *BamHI*; E, *EcoRI*; N, *NotI*; P, *PstI*; X, *XhoI*; *aphH*-Gen von *Streptomyces rimosus* (804bp); restliche Beschriftung wie in Abb. 4.

Das Plasmid pPmr3 ist ein Derivat von pPmr2 und beinhaltet als Zusatz ein neun Aminosäuren langes Epitop, das sogenannten FLAG-Tag (Knappik and Pluckthun, 1994). Dieses bietet die Möglichkeit, das Genprodukt mit Hilfe eines anti-FLAG-Antikörpers nachzuweisen. Dafür wurde das Epitop mittels PCR (Primer ON-FlagM2Nco-1 und ON-FlagM2Nco-2) amplifiziert und auf diese Weise mit Restriktionsschnittstellen an beiden Enden versehen, um es im Anschluss über eine *NcoI*-Schnittstelle *in frame* N-terminal vor das Startcodon des *aph*-Gens zu ligieren. Der korrekte Einbau wurde durch Sequenzierung überprüft. Der Großteil an Transformationsexperimenten sowie anschließende molekulare Untersuchungen der Transformanten wurden mit diesem Plasmid durchgeführt.

Das pTJ-5-Konstrukt trägt im Gegensatz zu den bisher eingesetzten Plasmiden ein zusätzliches Intron (In₁) in der 5'NTR des *aphH*-Gens. Bei dem Intron handelt es sich um das erste Intron des *rbcSI*-Gens von *V. carteri*. Dieses wurde über PCR amplifiziert und unter Beibehaltung der eigenen *splice-consensus*-Sequenz über die Schnittstelle *NcoI* vor das *aphH*-Gen gesetzt. Aus Arbeiten von Hallmann and Rappel (1999), Berthold et al. (2002) und Sizova et al. (2001) war bekannt, dass ein solches Intron die Genexpression und folglich die Transformationsrate steigern kann. Deshalb wurde eine analoge Strategie hier erprobt, die zeigte aber keinen positiven Effekt auf die Transformationsrate.

Das pTJ-6-Konstrukt stellt eine Kombination aus dem Plasmid pPmr2 und dem vollständigen pVcNR15-Plasmid (Gruber et al., 1996) dar, welches über eine *KpnI*-Schnittstelle an die 3'NTR von pPmr2 kloniert wurde. Mit diesem Konstrukt sollte es möglich sein, bei Transformationsexperimenten sowohl das *aphH*- wie auch das *nitA*-Gen ins Genom des Rezipienten-Stammes 153-68 zu bringen. Der erfolgreiche Einbau konnte im Anschluss über Selektion auf SVMN und/oder Pm^R nachgewiesen werden. Das Plasmid pPmr2 vermittelte eine Antibiotikaresistenz, die durch Wachstum in Antibiotika-haltigem Medium überprüft wurde. Ein Anwachsen der transformierten Algen in Medium mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle war ein direkter Hinweis auf den Einbau des pVcNR15-Plasmids.

Mit Hilfe des künstlich an die *Codon usage* von *Chlamydomonas* angepaßten *Green-fluorescence-protein*-Gens (*gfp*; Fuhrmann et al., 1999) bestand prinzipiell die Möglichkeit zur Fluoreszenzmarkierung ausgewählter Proteine im exprimierenden Organismus. Deswegen wurde beim Plasmid pTJ-9 das *gfp*-Gen C-terminal an das *aph*-Gen über eine *PstI*-Restriktionsstelle kloniert (Abb. 4), wobei gleichzeitig das *aph*-Stop-Codon zerstört wurde, um einen durchgängigen Leserahmen zu erzeugen.

Die chimären *aphH*-Gene wurden auf Basis des *Bluescript* pSK(-) Vektors zusammengesetzt, mit dem *Escherichia coli* Stamm DH10B vermehrt und für die Transformation von *V. carteri* verwendet.

3.1.5 Transformation der *Volvox*-Stämme 153-68, 153-48 und HK10

Eine wirksame Methode zur Transformation von Pflanzenzellen ist der biolistische DNA-Transfer (*microprojectile bombardment*), ein Verfahren, das im Jahre 1987 durch Klein et al. eingeführt wurde. Eine schonende Version mit DNA-beschichteten Goldpartikeln, die durch

Heliumgas bei 6 Bar beschleunigt, in *Volvox*-Gonidienzellen „geschossen“ werden, war bisher die einzige für die Kugelalge praktikable Technik zur genetischen Transformation (Schiedlmeier et al., 1994). Neuerdings steht eine kommerzielle Apparatur zur biolistischen Transformation mit höherer Durchschlagskraft zur Verfügung (PDS-1000 He *particle gun*; BioRad). Als homologer Selektionsmarker diente zunächst das Nitratreduktasegen (*nitA*). Die Transformation von *nitA*-Mutanten ermöglicht diesen Wachstum auf Nitrat als einziger Stickstoffquelle.

Unter Einsatz dieser Methode wurden zuerst die *Volvox*-Stämme 153-68 (*regA*, *nitA*), 153-48 (*nitA*) mit verschiedenen, neu konstruierten Plasmiden (Abb. 4) und zur Kontrolle mit pVcNR15 (Gruber et al., 1996) transformiert. Ferner wurden die *Volvox*-Stämme 153-48 sowie HK10 (Wildtyp) mit dem PDS-1000 He System transformiert und die erhaltenen Transformationsraten untereinander und mit früheren Daten verglichen. Aminoglycosid-resistente Transformanten wurden in sämtlichen Experimenten in Anwesenheit von 10 µg/ml Paromomycin selektiert.

Potentielle Transformanten, die nach 5 Tagen Wachstum unter Selektionsdruck noch nicht ausgebleicht waren, wurden einzeln in frisches Medium überimpft und dort mindestens drei Tage angezogen. Erst, wenn die Algen nach Wachstum in frischem Paromomycin-haltigem Medium immer noch grüne Farbe zeigten und sich weiter vermehren konnten, wurden sie aus unabhängigen Transformationsansätzen isoliert und für weitere Untersuchungen verwendet.

3.1.5.1 Optimierung der Selektionsbedingungen

Eine sofortige Zugabe des Antibiotikums zum jeweils verwendeten Medium (SVM bzw. SVMN) nach Abschluß der Transformation führte beim Stamm 153-68 in keinem Fall zu lebensfähigen Transformanten. Die fehlende Zeit zur Expression des *aphH*-Gens nach erfolgreicher Transformation kann als Grund für das Absterben der Transformanten gesehen werden. Deshalb war es nötig, den frühest möglichen Zeitpunkt für den Zusatz von Paromomycin zu bestimmen. Eine Testreihe wurde angelegt, in der Paromomycin (10 µg/ml) nach 0, 1, 6, 12, 24, 36 und 48 h zugesetzt wurde. Die Zahl der resultierenden Transformanten erreichte dabei ihr Maximum bei Paromomycin-Zugabe nach 6 h. Folglich wurde Paromomycin routinemäßig 6 h nach Transformation zugesetzt. Potentielle Transformanten

konnten bereits nach fünf weiteren Tagen isoliert werden. Diese wurden dann vereinzelt und in frisches Medium mit 10 µg/ml überführt.

Eine Transformation des Stammes 153-48 ergab keine Transformanten, sofern hier ebenso wie beim Stamm 153-68 Paromomycin nach 6 h zugegeben wurde. Erst nach Verlängerung der Wachstumszeit auf 3 Tage in Paromomycin-freien Medium war es möglich, Transformanten zu isolieren. Deswegen wurde Paromomycin bei sämtlichen Transformationen mit den Stämmen 153-48 und HK10 erst nach 3 Tagen zugesetzt. Nach weiteren 2 Tagen Inkubation in Paromomycin-haltigen Medium konnten bei diesen Transformationen bereits die ersten potentiellen Transformanten isoliert und vereinzelt werden.

3.1.5.2 Transformations- und Kotransformationseffizienz

Die chimären Plasmide pPmr1, pPmr2, pPmr3 und pTJ-9 (Abb. 4), drei unterschiedliche Ausgangsstämme und zwei unterschiedliche Transformationsmethoden wurden in verschiedenen Kombinationen eingesetzt, um die Effizienz des *aphH* Gens als selektiven Marker für Transformationsexperimente zu testen. Für den morphologischen Wildtyp-Stamm (153-48) war es wegen der geringen Zahl an potentiellen Zielzellen erforderlich, die reproduktiven Zellen durch mechanisches Aufbrechen der Sphäroide freizusetzen um diese besser beschießen zu können. Im Gegensatz dazu standen die RegA-Mutanten (153-68), deren reproduktiven Zellen an der Oberfläche exponiert sind und dadurch intakte Sphäroide ein besseres Ziel für den Beschuß darstellen. Ein neueres Verfahren ist der Einsatz der kommerziellen PDS-1000/He *particle gun* (BioRad), das den Vorteil bietet, sowohl exponierte wie auch in die Matrix eingebundene reproduktive Zellen mit DNA-überzogenen Partikeln zu transformieren, was die aufwendige und schädliche Isolierung der Gonidien überflüssig macht.

In dieser Arbeit wurde die Transformationseffizienz für beide Methoden an den *Volvox*-Stämmen 153-48, 153-68 und HK-10 bestimmt. Um den Nutzen des zusammengesetzten *aphH* Gens als selektiven Marker zu überprüfen wurden die oben genannten Plasmide für die Transformation mit den beiden Methoden ausgewählt. Es wurden insgesamt 161 Pm^R

Transformanten unter Verwendung der Standard-Selektion (3.1.5.1) erzeugt. In Tabelle 10 sind die erzielten Transformations-Effizienzen einander gegenübergestellt.

Tab. 10. Transformations- und Kotransformationseffizienzen des *aphH*-Markers

Experiment-Nr.	Transformations-Methode ^{a)}	Rezipienten-Stamm ^{b)}	Plasmid	Selektion auf ^{c)}	Transformanten pro 10 ⁻⁵ Zielzellen mit Standardabweichung (σ_n)	% von Ars ⁺ Kotransformanten	Anzahl an Einzel-Experimenten
1	A	153-68	pVcNR15	Nit ⁺	2,5 (Schiedlmeier et al., 1994)	-	-
2	B	153-68	pVcNR15	Nit ⁺	20,3 ± 15,8	-	2
3	A	153-68	pVcNR15 / pIK2	Nit ⁺	1,9 ± 1,4	45	3
4	A	153-68	pPmr1	Pm ^R	2,5 ± 1,6	-	6
5	A	153-68	pPmr2	Pm ^R	24 ± 0,6	-	7
6	A	153-68	pTJ-9	Pm ^R	24	-	1
7	A	153-68	pPmr3 / pIK2	Pm ^R	24 ± 0,2	33	2
8	A	153-48	pPmr3	Pm ^R	2,4 ± 3,1	-	10
9	B	153-48	pPmr3	Pm ^R	16 ± 0,5	-	4
10	B	153-68	pPmr3 / pIK2	Pm ^R	97 ± 42,6	30	3
11	B	HK10	pPmr3	Pm ^R	8,3	-	1

^{a)} A: Biolistische Transformation nach Schiedlmeier et al. (1994); B: Biolistische Transformation mit einer BioRad PDS-1000 He *particle gun*.

^{b)} ca. 10⁴ Sphäroide (oder 10⁵ isolierte Gonidien in Experiment Nr. 10) wurden einmal pro Ansatz (Methode A) beschossen; 10⁴ - 4 x 10⁴ Sphäroide wurden 10 x pro Ansatz (Methode B) beschossen.

^{c)} 10 µg/ml Paromomycin wurden für die Selektion von Pm^R Transformanten eingesetzt oder 0,5 M Ca(NO₃)₂ als einzige Stickstoffquelle für die Selektion auf Nit⁺ Transformanten.

Kotransformanten wurden durch den Beschuß eines Rezipienten-Stammes mit zwei physikalisch getrennten Plasmiden erzeugt, von denen eines den Selektionsmarker und das andere den nicht-selektierten Marker trägt. Eine hohe Kotransformationsrate ist dann essentiell, wenn es darum geht, die Wirkung nicht-selektierter Gene von besonderem Interesse zu untersuchen (Kirk et al., 1999; Miller und Kirk, 1999; Nishii et al., 2003; Stark et al., 2001). Die Ergebnisse in Tabelle 10 zeigen Kotransformationseffizienzen von 30 bis 33 %, bei Verwendung von gleichen Mengen an *aphH* (pPmr3) und *ars* aus *C. reinhardtii* (pIK2) im Kotransformationsansatz und Selektion auf 10 µg/ml Paromomycin. Diese Raten liegen zwar unter der Kotransformationseffizienz von 45 % bei Einsatz des *nitA*-Gens (Nr. 3) als selektiven Marker, aber sie reichen für den praktischen Einsatz aus.

3.2 Molekulare Analyse isolierter Transformanten

3.2.1 Überprüfung der Integration des *aphH*-Gens ins Transformantengenom durch PCR-Analysen

Die Transformanten aus den Experimenten mit verschiedenen Stämmen und Plasmiden (Tab. 10) wurden einzeln in frisches SVM mit 10 µg/ml Paromomycin überimpft. Sie konnten über einen Zeitraum von mindestens fünf Monaten stabil gehalten werden. Transformanten, die nach Inkubation von zwei Monaten in Paromomycin-freien Medium in Antibiotika-haltiges Medium überimpft wurden, zeigten unveränderte Resistenz. Zur Bestätigung dafür, dass die Paromomycin-resistenten Transformanten nicht durch eine Mutation entstanden waren, die zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Antibiotikum führte, z.B. auf geringerer Durchlässigkeit der Zellmatrix oder einer reduzierten Paromomycin Aufnahme beruhte, sondern von der Expression des Fremdgens herrührte, wurde zunächst die Integration des *aphH*-Gens in das Genom durch PCR-Analysen überprüft.

Dazu wurden entweder 2 bis 5 intakte Sphäroide (sowohl vom Stamm 153-68, wie auch vom Stamm 153-48) oder isolierte DNA der potentiellen Transformanten zu einem PCR-Ansatz gegeben und eine PCR-Reaktion unter Standardbedingungen (2.7.5) durchgeführt.

Die Primer UP und DOWN (Abb. 6C), die am 5' Ende der *hsp70A* Promotor-Sequenz und am 3' Ende der kodierenden Region des *aphH* Gens binden, wurden für die PCR-Amplifikation verwendet. Das daraus resultierende PCR-Fragment sollte eine rechnerisch ermittelte Bandengröße von 1,6 kb ergeben, sofern das transgene Konstrukt komplett ins Genom eingebaut wurde. Beim Rezipientenstamm HK10 wurde das Primerpaar UP und *prbc3'*-x-3' verwendet, das den gesamten Bereich des chimären Konstruktes abdeckt und dabei eine Fragment-Größe von 2,1 kb erwarten lässt. In DNAs von 153-48 Transformanten wurde das erwartete 1,6 kb Fragment nachgewiesen, nicht jedoch in DNA der Transformante 48-6 (Abb. 6A). Im letzten zeigte eine *Southern*-Analyse (Abb.7), daß ein kleines Fragment vom 5'Ende, das den Primer UP bindet (Abb. 6C), offenbar bei der Integration ins Genom verloren gegangen war. Die beiden HK10-Transformanten hk-1 und hk-11 wurden durch PCR-Analyse bestätigt (Abb. 6B).

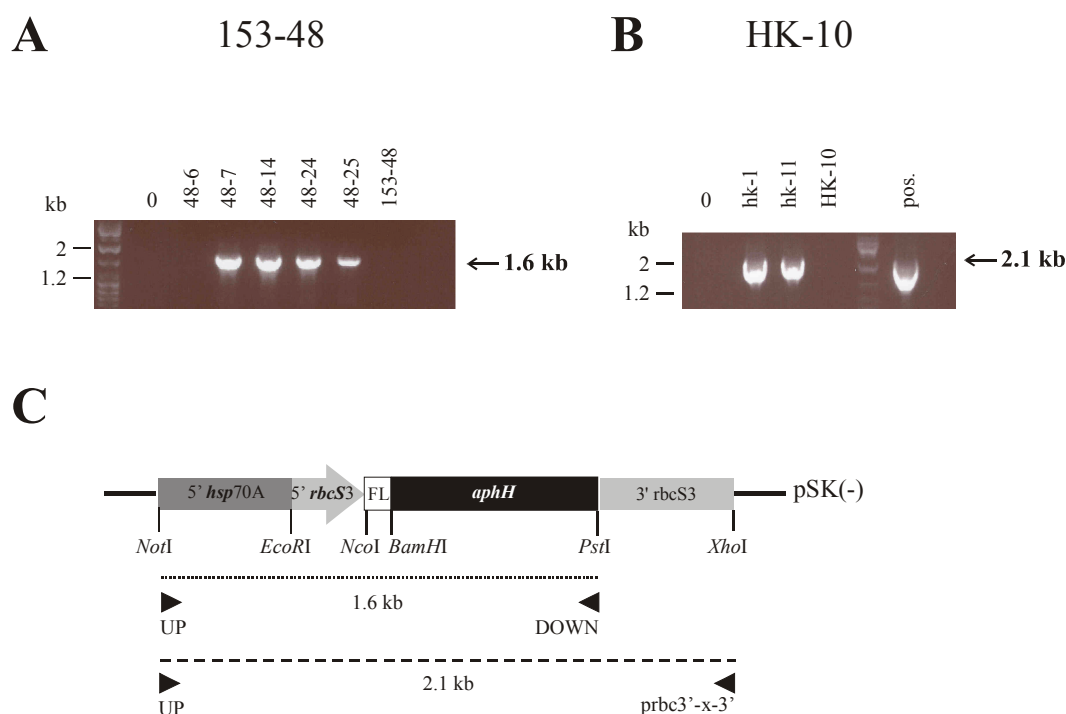


Abb. 6 PCR-Analyse zur Überprüfung der Integration des eingesetzten Plasmids pPmr3 in die genomische DNA.

A) Rezipientenstamm 153-48. Die erwartete Bandengröße von 1,6 kb ist mit einem Pfeil markiert; zwei Standardgrößen sind links angegeben.

B) Rezipientenstamm HK10: erwartete Bandengröße von 2,1 kb hier ebenfalls mit Pfeil markiert.

C) Physikalisch-genetische Karte des Konstrukts pPmr3 mit den PCR-Primern für beiden Fällen sind die Bindestellen der verwendeten Primer UP; DOWN und prbc3'-x-3', und den erwarteten Fragmentgrößen.

3.2.2 Überprüfung der Integration des *aphH*-Gens ins Transformantengenom durch *Southern*-Analyse

In früheren Untersuchungen von *Volvox* Transformanten (Babinger et al., 2001; Hallmann and Rappel, 1999) wurde überzeugend nachgewiesen, daß mehrere Plasmide nach dem Transfer in der Zelle zunächst zu zirkulären Konkaternen fusionieren, bevor sie durch einfaches *crossover* an beliebigen Genloci ins Chromosom integrieren. Daraus resultieren Tandem-Insertionen, die im *Southern-Blot* als Bande mit verstärkter Intensität auftreten.

Southern-Analysen von Transformanten-DNAs zeigen sowohl deren Integration ins *Volvox*-Genom als auch die (ungefähre) Kopienzahl des Fremdgens an. Die Hybridisierung mit einer *aphH*-Sonde (Abb. 7A) nach Restriktion mit *NotI* und *XhoI* sollte spezifisch das *aphH*-Transgen und seine genetische Umgebung detektieren, woraus seine stabile Integration hervorgehen sollte.

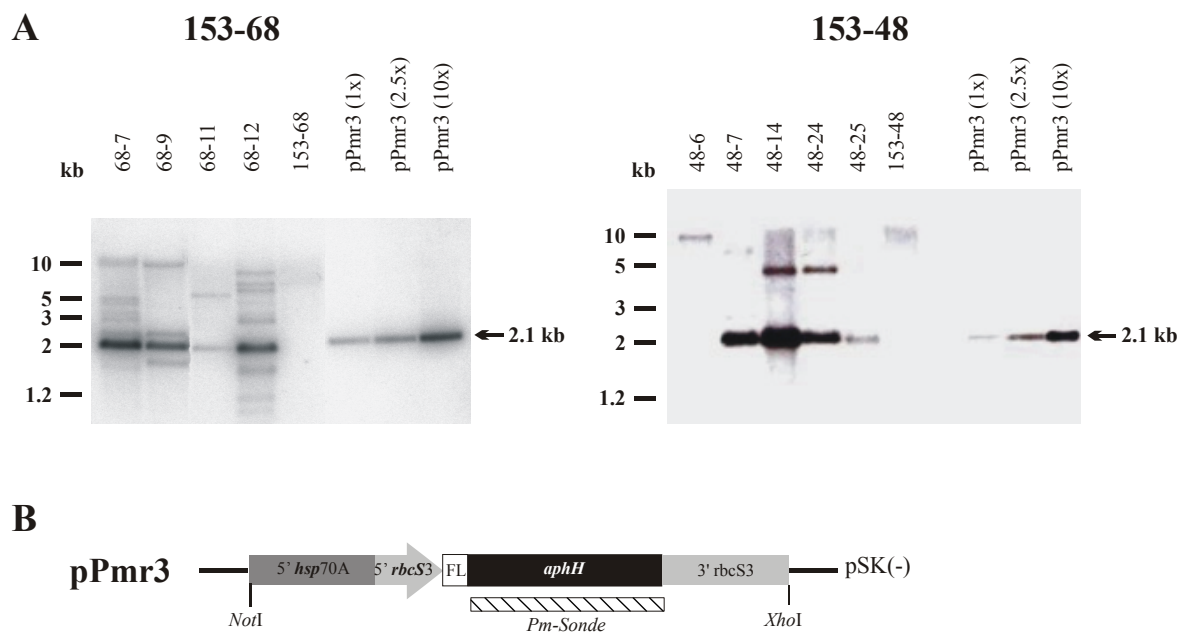


Abb. 7 A) *Southern-Blot* zur Überprüfung der Integration des *aphH*-Transgens bei repräsentativen pPmr3-Transformanten

DNA aus unsynchronisierten *V. carteri* 153-68 (links) und 153-48 (rechts) pPmr3-Transformanten wurde isoliert und mit dem Restriktionsenzymen *NotI* / *XhoI* verdaut, welche das Plasmid direkt am Beginn der 5'NTR (Abb. 7B) sowie am Ende der 3'NTR schneiden. Das gesamte *aphH*-Gen wurde als radioaktive Sonde eingesetzt; die erwartete Bandengröße ist schematisch mit dem eingesetzten Plasmid dargestellt. Auf der rechten Seite wurde definierte Menge (1; 2,5; 10 Kopien) an ebenfalls verdautem Plasmid pPmr3 aufgetragen (obere Hälfte).

B) Physikalisch-genetische Karte des Konstrukts pPmr3 mit eingezeichnetem Sondenbereich und relevanten Schnittstellen (untere Hälfte).

Die zu erwartende starke Bande von 2,1 kb konnte bei 6 Transformanten-DNAs detektiert werden (Abb. 7A), was darauf hinweist, daß diese Transformanten das komplette Transgen in mehrfacher Kopie tragen. Die ungefähre Kopienzahl wurde densitometrisch bestimmt mit den Signalintensitäten von pPmr3 DNA als Standard, welche zusätzlich auf der rechten Seite in äquimolaren Mengen (1; 2,5 und 10 Kopien) aufgetragen wurde. Das Ergebnis zeigt das die Transformanten 48-25 und 68-11 eine einzelne Kopie, 48-14 ca. 18 Kopien, 48-7, 48-24 und 68-7 zwischen 12 und 14 Kopien und 68-9 sowie 68-12 ca. 7 bis 8 Kopien des *aphH* Gens der Größe 2,1 kb beinhalten. Dabei wurde der Großteil des Transgens als *Tandem-repeat* in das *Volvox*-Genom integriert, wie bereits oben erwähnt. Zusätzliche Banden, wie bei den

Transformanten 68-7 oder 68-12 spiegeln eine getrennte Integration unabhängiger Konkatomere in verschiedene Stellen des Genoms wider und in wenigen Fällen kommt es zu Integration von nur einer einzigen Kopie des Transgens (Transformanten 48-6 und 48-25) (Abb. 7A).

3.2.3 Nachweis der Transkription des *aphH*-Gens durch RT-PCR und *Northern-Blot*

Nach Überprüfung der erfolgreichen Integration eines Plasmids in die genomische DNA ist der nächste Schritt der Nachweis der Expression des inserierten Gens.

Dafür wurde von verschiedenen pPmr3-Transformanten der beiden Stämme 153-68 und 153-48 RNA aus unsynchronisierten Algenkulturen isoliert. Der Anteil an Gesamt-mRNA aus dieser RNA-Präparation wurde unter Verwendung eines Poly-dT-Adapterprimers (Frohman et al, 1988) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese diente als Ausgangsmaterial für eine PCR-Reaktion mit dem genspezifischen Primer P1 und dem Adapter-Primer (Frohmann et al., 1988). Zur Ermittlung der optimalen *Annealing*-Temperatur wurde die erste PCR-Reaktion in einem Gradientencycler durchgeführt. Alle untersuchten Transformanten zeigten nach Amplifikation zwei deutliche Banden (Abb. 8) auf einem Agarosegel. Diese Banden wurden anschließend ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Sequenzierung gegeben. Das Ergebnis dieser Sequenzierung zeigt zwei Polyadenylierungsstellen im 3'-untranslatierten Bereich des *rbcs3*-Gens welche durch Vergleiche mit der Datenbanksequenz der *Volvox-rbcS*-Gene bestätigt werden konnten. Die beiden PolyA-Signale liegen ca. 150 bp auseinander, was durch die erhaltenen Banden von 450 und 600 bp in der PCR-Reaktion verifiziert wurde. Somit konnte eine korrekte Expression der mRNA für die analysierten Transformanten nachgewiesen werden.

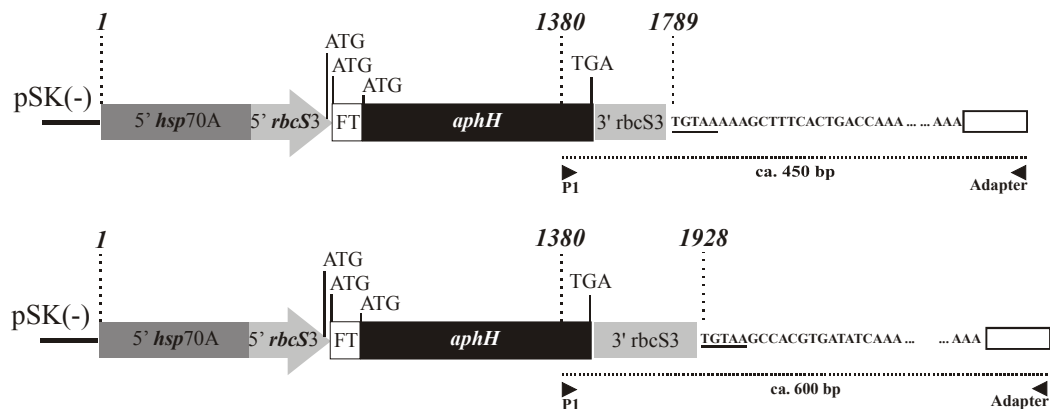
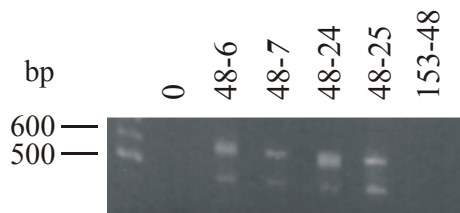
A**B**

Abb. 8 RT-PCR zur Überprüfung der Transkription des *aphH*-Gens

A) Physikalische Karte von pPmr3 DNA und von zwei aufgrund verschiedener polyA-Signale (unterstrichen) vorhergesagten cDNA Produkten, die mit den Primern P1 und Adapter amplifiziert wurden. Mit Zahlen sind die Sequenz-Positionen markiert. Die zwei erwarteten 450 bp und 600 bp PCR Produkte sind abgebildet.

B) Reverse Transkription und anschließende PCR Amplifikation (RT-PCR) der chimären mRNA von 4 Transformanten und dem Rezipientenstamm mit Primern P1 und Adapter wie unter A.

3.2.4 Nachweis der AphH-Proteinexpression in ausgewählten Transformanten

Um eine erfolgreiche Transformation und damit Integration des eingesetzten Plasmids ins Genom zu überprüfen, ist es nicht ausreichend, nur den Nachweis des Einbaus zu bringen. Für die Funktion eines neuen Selektionsmarkers ist es unverzichtbar, dass das von ihm kodierte Protein vollständig und korrekt exprimiert wird. Denn erst das Protein vermittelt im Fall von

aphH die nachweisbare Resistenz. Deswegen wurden Lysate der transgenen Algen auf die Expression des AphH-Proteins hin durch *Western-Blot*-Analyse untersucht.

3.2.4.1 *Western-Blot* mit Anti-Aph-Rohserum

Ein Antiserum wurde gegen das gesamte APHVIII-Protein hergestellt (Sizova, 2000). Dieses Antiserum ist wenig spezifisch und weißt eine Reihe kreuzreagierender Banden im Immunoblot auf. Die Expression des Proteins wurde zuerst an Transformanten überprüft, welche mit dem Plasmid pPmr2 und dem Ausgangsstamm 153-68 erzielt wurden. Dabei konnte in allen Fällen eine Expression nachgewiesen werden. Eine einzelne Protein-Bande ist bei allen transformierten Algen detektierbar, zeigt sich aber nicht in der Kontrolle mit dem Wildtyp-Stamm.

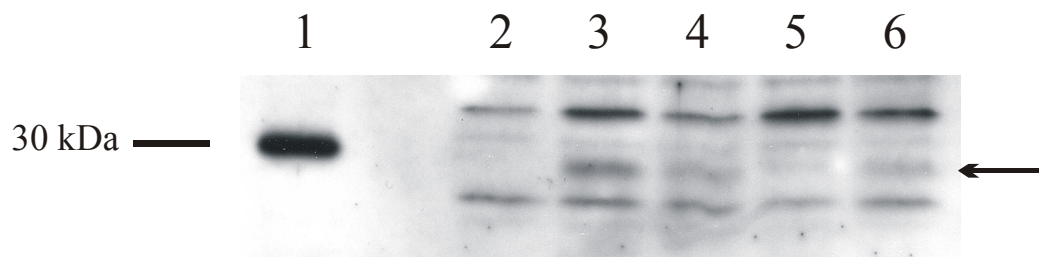


Abb. 9 *Western-Blot*-Analyse der transgenen Algen (153-68 mit integriertem pPmr2) mit Anti Aph-Antiserum

Aus repräsentativen Transformanten wurden Extrakte mit Polyklonalen Anti-AphH Antikörper getestet. 1: Gereinigtes Antigen (50 pg); 2: Ausgangsstamm 153-68 (25 µg); 3: TJ-1 Transformante (25 µg); 4: TJ-2 Transformante (25 µg); 5: TJ-3 Transformante (25 µg); 6: TJ-4 Transformante (25 µg). Die Größe des Antigens ist bei 30 kDa eingezeichnet; die resultierenden Banden sind mit Pfeil markiert.

Die Größe der resultierenden Bande entspricht dabei in etwa der Größe des gereinigten Antigens von 30 kDa, was auf eine vollständige Expression des APHVIII-Proteins hinweist. Damit konnte nach der Integration der eingesetzten Plasmide ins Genom des Ausgangsstammes auch deren vollständige und korrekte Expression gezeigt werden.

3.2.4.2 Western-Blot mit Anti-FLAG-Antikörper

Der Nachteil einer großen Anzahl von Kreuzreaktionen und einer nur schwach detektierbaren Bande des APHVIII-Rohserums sollte durch das Einbringen eines neun Aminosäuren langen Epitops (FLAG[®]-Tag; Sigma, Taufkirchen) eliminiert werden. Zu diesem Zweck wurde der Rezipienten-Stamm 153-48 mit dem Plasmid pPmr3 transformiert und Gesamt-Protein von den potentiellen Transformanten 7; 14 und 24 isoliert. Vorangegangenen Untersuchungen mit dem Aph-Rohserum zeigten eine nur schwache Expression des APHVIII-Proteins. Deswegen wurde das isolierte Gesamt-Protein durch Fällung mit TCA (Trichloressigsäure) und anschließender Zentrifugation in Centricon-Röhrchen (Amicon; USA; Ausschluß-Grenze ≤ 10 kDa) aufkonzentriert. Dadurch war es möglich eine Gesamt-Konzentration von je 120 mg Protein pro Transformante in einen *Western-Blot*-Nachweis einzusetzen (Abb. 10). Anschließend wurde mit dem polyklonalen FLAG[®]-Antikörper von Sigma die Nachweisreaktionen durchgeführt. Es war nicht möglich eine eindeutige Bande nur bei den Transformanten in der erwarteten Größe von ca. 30 kDa zu detektieren. Allerdings zeigte sich bei den drei untersuchten Transformanten bereits nach 5 min Expositionszeit eine deutlich stärkere Bande auf erwarteter Größe (Abb. 10). Jedoch korreliert diese nach einer Expositionszeit von 45 min mit einer schwachen Kreuzreaktion des *Volvox*-Proteins im untransformierten Ausgangsstamm (153-48), wodurch sich keine eindeutige Aussage zur Expression des Epitop-markierten APHVIII-Proteins machen lässt. Die deutlich stärkeren Bandenintensitäten der Transformanten (48-7, 48-14 und 48-24; Abb. 10) sind ein Zeichen dafür, daß das FLAG-markierte APHVIII Protein in detektierbaren Mengen vorhanden ist und dies ein Ergebnis der Expression des *aphH* Transgens in diesen Transformanten ist.

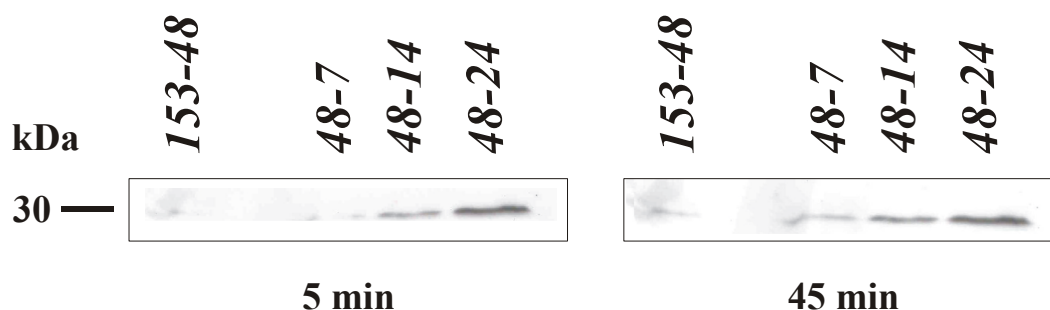


Abb. 10 *Western-Blot*-Analyse der transgenen Algen mit Anti-FLAG-M2-Antikörper

In allen Spuren wurden jeweils 120 µg Gesamt-Protein eingesetzt; wt, Wildtyp 153-48; 48-7 / 48-14 / 48-24, Transformanten mit pPmr3; linke Abbildung Expositionszeit von Film = 5 min; rechts Expositionszeit = 45 min; Proteingrößenstandard ist links in kDa angegeben.

3.2.5 Resistenz und Promotorstärke

Für eine unabhängige Abschätzung der transgenen *aphH*-Gen Expression wurde die Höhe der Paromomycin-Resistenz von verschiedenen Transformanten bestimmt. In Tabelle 11 sind die maximalen Antibiotikum-Konzentrationen angegeben, die für sieben *Volvox*-Stämme, transformiert mit chimären Plasmiden mit dem *aphH*-Gen unter Kontrolle von unterschiedlichen Promotoren (Abb. 4), bestimmt wurden. Auffällig war dabei, daß Transformanten mit dem β 2-Tubulin-Promotor (pPmr1) nur etwa die Hälfte an Pm-Konzentration überlebten, wie Transformanten mit dem *aphH*-Gen unter Kontrolle des zusammengesetzten hsp70A/rbcS3-Promotors (pPmr2 und pPmr3).

Tab. 11. Paromomycin Toleranz von *V. carteri* Rezipienten Stämmen und Transformanten

Stamm	Paromomycin Resistenz ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}
Rezipienten	
153-68	< 2
153-48	< 2
Transformanten	
153-68 (pPmr1)	90 \pm 68
153-68 (pPmr2)	170 \pm 70
153-68 (pPmr3)	140 \pm 27
153-48 (pPmr3)	160 \pm 57

^{a)} Maximale Resistenzwerte mit Standardabweichung von je sieben unabhängigen Transformanten

Die Stabilität repräsentativer Pm^R-Transformanten wurde auch über vier Monate Kultivierung in Medium ohne Antibiotikum beibehalten. Nach Überimpfen in Medium mit Paromomycin (10 $\mu\text{g/ml}$) zeigten die untersuchten Transformanten unverändertes Wachstum.

3.2.6 Immunfluoreszenz von Aph/Gfp-Transformanten

Die Expression eines GFP-Fusionsproteins kann in vivo durch Fluoreszenz-Mikroskopie beobachtet werden. Die Methode hat den Vorteil, daß ohne schädlichen Eingriff (Arylsulfatase-Test) bzw. Extraktion (*Western-Blot*) die Produktion und Lokalisation des

fraglichen Proteins in situ bestimmt werden kann. Das Plasmid pTJ-9 (Abb. 4) enthält, C-terminal an das *aphH*-Gen fusioniert, das *gfp*-Gen unter Aufrechterhaltung eines durchgängigen Leserahmens. Nach Transformation von 153-68 wurde die Integration des fusionierten *gfp*-Gens mittels PCR mit dem Primerpaar 1 und 2 (Tab. 4) über ein 490 bp Fragment nachgewiesen (Abb. 11). Dieses ist deutlich in den Transformanten 1 und 7 und schwach in der Transformante 4 erkennbar.

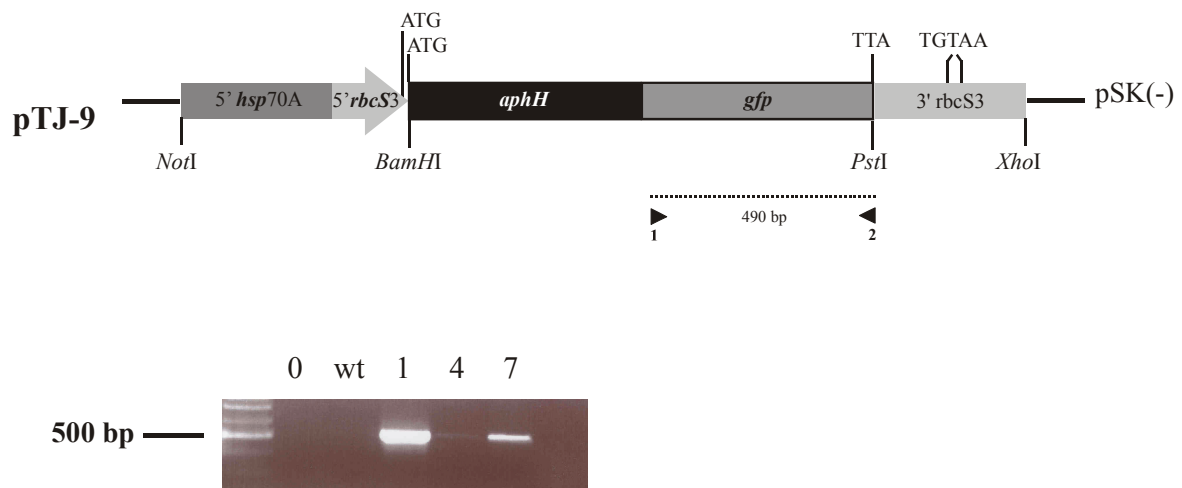


Abb. 11 PCR-Analyse von drei pTJ-9 Transformanten und des Rezipientenstammes 153-68

Die Genkarte des pTJ-9 Konstrukts (wie Abb. 4) ist mit den Primern 1 und 2 und dem erwarteten 490 bp Produkt dargestellt (oben). Das Ergebnis der PCR-Amplifikation von 153-68 (wt) und Transformanten (1, 4, 7) zeigt das Gelphoto (unten).

Von den Transformanten 1 und 7 wurden einzelne Sphäroide auf dünne Agarplättchen zur Fixierung aufgetragen und unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510) mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt. In beiden Fällen wurde im Gegensatz zum untransformierten Rezipientenstamm 153-68 grünliche Fluoreszenz beobachtet (Abb. 12), die sich auf einzelne Zellen beschränkt oder über ganze Sphäroide verteilt ist. Sie zeigt anschaulich die Expression des *aphH-gfp* Transgens.

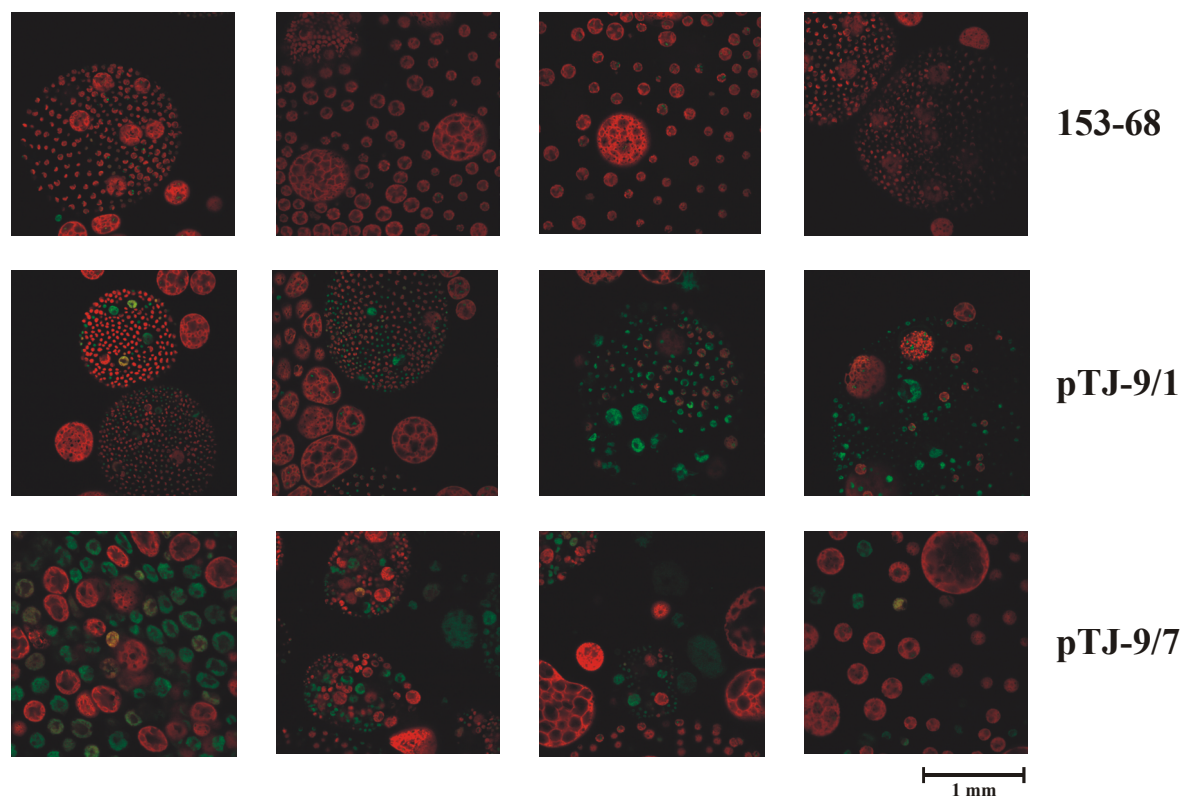


Abb. 12 Immunfluoreszenzaufnahmen von *V. carteri* 153-68 (Kontrolle) und zwei pTJ-9 Transformanten
Die drei Reihen zeigen verschiedene Felder der rechts bezeichneten Stämme im Laser-Scanning-Mikroskop

3.2.7 Kotransformation mit einem nicht-selektierten Marker

Ein wichtiger Bestandteil bei der Etablierung neuer Selektionsmarker ist deren Verwendbarkeit und Einsatz bei Kotransformationsexperimenten. Nur unter diesen Voraussetzungen ist es möglich, zusätzliche Marker, vor allem solche, die keine direkte Selektion erlauben, ins Genom des Rezipientenstammes zu integrieren. Aus diesem Grund wurde das Plasmid pIK2 (Babinger et al., 2001), das ein *Chlamydomonas* Arylsulfatase Gen hinter einem konstitutiven Promotor trägt als Kotransformationsmarker ausgewählt und gemeinsam mit den Plasmiden pPmr2 bzw. pPmr3 der *Volvox* Stamm 153-68 transformiert. Die erste Selektion erfolgt dabei auf Paromomycin-Resistenz. Alle potentiellen resistenten Transformanten wurden anschließend über einen Farbttest auf die Integration des Plasmids pIK2 überprüft (Abb. 13B). Dabei wird durch Expression des *Chlamydomonas* Arylsulfatase-Gens aufgrund des konstitutiven Promotors das zugesetzte X-Sulfat innerhalb von 5 Stunden

gespalten und das Medium färbt sich daraufhin dunkelblau. Durch diese Untersuchung war es möglich eine Kotransformationsrate der beiden Plasmide von 33% zu bestimmen. Da der Farbttest allein noch kein ausreichendes Kriterium für die Integration des zweiten Plasmids ist, wurde eine Auswahl an Transformanten zusätzlich durch eine PCR-Reaktion untersucht. Für alle im Farbttest positiv befundenen Transformanten konnte die Integration des pIK2-Plasmids auch auf DNA-Ebene bestätigt werden (Abb. 13C)

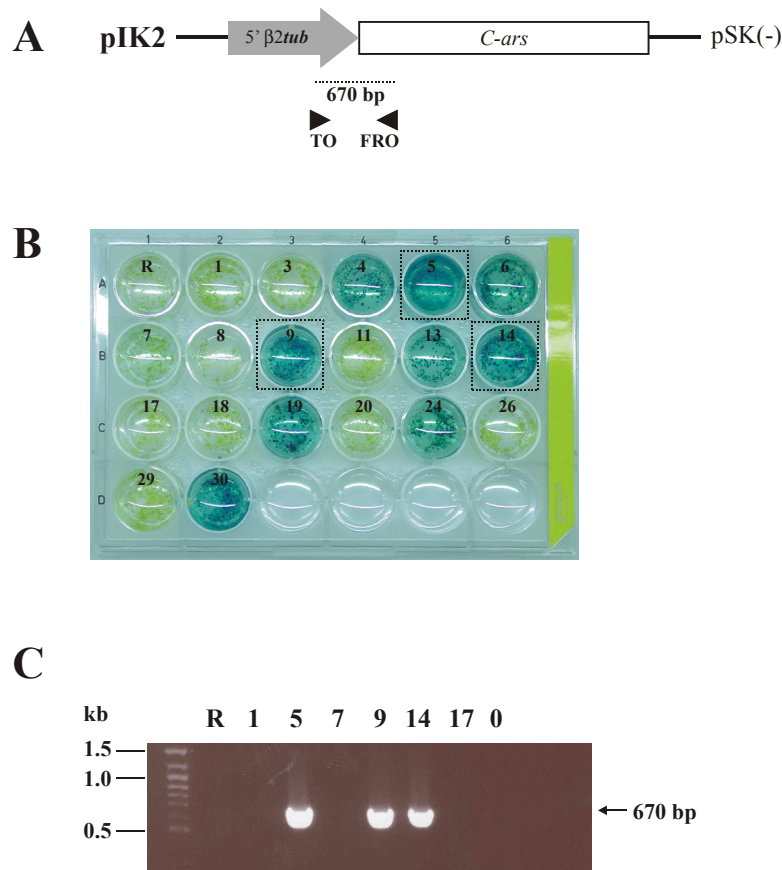


Abb. 13 Überprüfung der Integration und Expression des zweiten unselektionierbaren Markergens *ars* (*C. reinhardtii* Arylsulfatase)

A) schematische Darstellung des Plasmids pIK2 wobei der Bereich mit Pfeilen markiert ist (669bp), der per PCR amplifiziert wurde;

B) X-Sulfat-Farbttest von potentiellen Kotransformanten; positive Transformanten die über PCR analysiert wurden sind dabei mit gestricheltem Rechteck markiert;

C) PCR-Analyse von Transformanten 1, 5; 7, 9; 14 und 17; R, Rezipient 153-68; erwartete Bandengröße ist mit Pfeil markiert

4 Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war die Etablierung eines neuen dominanten Selektionsmarkers für die Transformation der vielzelligen Grünalge *V. carteri*. Das Prinzip des neuen Systems beruht auf der Verwendung des bakteriellen *aphH* Gens aus *Streptomyces rimosus*, welches unter der Kontrolle eines *Volvox*-spezifischen Hybridpromotors (*hsp70A* und *rbcS3*) steht, wie es bereits beim einzelligen Vertreter *C. reinhardtii* zum Einsatz kam (Sizova et al., 2001). Das *aphH*-Gen kodiert für die Aminoglykosid-Phosphotransferase VIII und vermittelt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Paromomycin durch Phosphorylierung eines primären Alkohols am 3'-Kohlenstoff des Toxins, woraufhin dieses nicht mehr an die 30S-Untereinheit des Ribosoms binden und den Translokationsschritt der Translation hemmen kann. Mit diesem System ist es möglich, sowohl *Volvox* Wildtypstämme (HK10 und 153-48) als auch Mutantenstämme (153-68) zu transformieren. Zwei Aspekte machen das *aphH*-Gen auch im Laboreinsatz zum idealen Kandidaten der Transformation von Grünalgen. Zum einen weist der *V. carteri* eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Paromomycin auf und zum anderen hat APHVIII hohe Affinität zu Paromomycin und kann daher bereits geringe Konzentrationen des Antibiotikums inaktivieren (Danilenko et al., 1997; Sizova et al., 1996). Mit diesen Eigenschaften hat der *aphH*-Marker die Potenz, verschiedene Schwierigkeiten von bisher verwendeten Markern zu umgehen. So weist das modifizierte *aphH*-Gen eine an Grünalgen adaptierte *codon-usage* auf (Sizova et al., 1996), wodurch vorzeitige Kettenabbrüche bei der Translation wie bei anderen Fremdgenen (Lumbreras et al., 1998) verhindert werden und damit die korrekte Faltung in ein funktionelles Protein ermöglicht wird. Eine weitere Verbesserung lag in der Verwendung *Volvox*-spezifischer Promoter- und Regulationsbereiche (*hsp70A* und *rbcS3*). Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass solche spezifischen Sequenzelemente entscheidend für die Expression sind und selbst zwischen verwandten Algen nicht problemlos ausgetauscht werden konnten (W. Mages, pers. Mitteilung). Diese Voraussetzungen waren eine optimale Grundlage für die Etablierung des neuen dominanten Selektionsmarkers *aphH* für die Transformation von *V. carteri*.

1. Einfluß verschiedener Faktoren auf die Transformationsraten

Für den DNA-Transfer in reproduktiven *V. carteri* Zellen (Gonidien) sind nach allen bisherigen Erfahrungen nur zwei biolistische Verfahren geeignet: (A) Der "Beschuß" isolierter (wt: HK10, 153-48) bzw. auf der *Volvox*-Oberfläche exponierter (RegA: 153-68) Gonidien mit DNA-beschichteten Goldpartikeln unter Gasdruck (6 Bar Helium) (Schiedlmeier et al., 1994) oder (B) ein kommerzielles Verfahren (PDS-1000 He *Particle gun*, BioRad), das die beschichteten Goldpartikel mit größerer Durchschlagskraft in die Zellen treibt und sich deshalb auch für den "Beschuß" ganzer Sphäroide eignet, deren Gonidien in tieferen Schichten, von der Glykoprotein-Matrix geschützt, liegen (Hallmann and Rappel, 1999). Die Transformationseffizienz der beiden Verfahren mit verschiedenen Vektoren ist von mehreren Faktoren abhängig. So findet man eine ca. 7-fach niedrigere Transformationsrate beim Stamm 153-48, wenn isolierte Gonidien anstelle von intakten Sphäroiden mit Methode A beschossen wurden (Tab. 10). Als Ursache kommen ein negativer Einfluß durch die Isolierung der Gonidien aus den Muttersphäroiden und eine geringe Überlebensfähigkeit isolierter und gereinigter Gonidien in Frage. Auf der anderen Seite kann der wiederholte 10-malige Beschuß bei Methode B zu den höheren Transformationsraten beitragen (Tab. 10). Die generell höheren Transformationsraten bei Einsatz des Stammes 153-68 sind als Folge der ca. 20 bis 40-fach höheren Zahl an reproduktiven Zellen zu sehen.

Ein weiterer Faktor ist die deutliche Abhängigkeit der Transformations-Effizienz vom eingesetzten Plasmid. Algen, die mit den Plasmiden pPmr2 und pPmr3 (Abb. 4) transformiert wurden, weisen 10-fach höhere Raten auf, als sie mit dem Plasmid pPmr1 (Abb. 4) erreicht werden. Dieser Unterschied spiegelt die geringere Expression von *aphH* unter Kontrolle des β 2-Tubulin-Promotors im Vergleich zum Hybrid-Promotor (*hsp70/rbcS3*) wieder, was u.a. in einer geringeren Toleranz gegen Paromomycin zum Ausdruck kommt. Die höheren Transformationsraten (Tab. 10) bei Einsatz von pPmr2 oder pPmr3 werden als Folge der höheren Resistenz und schärferen Selektion auf Paromomycin-Medium interpretiert. Im Vergleich von *aphH* zu *nitA* findet man, abhängig von der eingesetzten biolistischen Methode, eine bis zu 12-fach höhere Transformationsrate bei Selektion mittels *aphH*. Dies liegt generell an der schärferen Selektion auf Antibiotika-Resistenz, die mit auxotrophen Markern wie *nitA* nicht erreicht werden kann, weil die Selektion auf Nitrat als einziger Stickstoffquelle durch

Verunreinigungen im Medium und durch Freisetzung von Stickstoff aus abgestorbenen Algen weniger effektiv ist.

2. Kopienzahl und Resistenzstärke

Nach Transformation mit den verschiedenen Vektoren und anschließender Selektion auf Paromomycin-Resistenz konnte bei allen untersuchten Transformanten eine erfolgreiche Integration des *aphH*-Gens in das Rezipientengenom durch PCR- und *Southern*-Analysen bestätigt werden. Dabei zeigten die *Southern Blots* (Abb. 7) bei dem Großteil der Transformanten eine starke Bande auf der Höhe des Kontrollfragments (Plasmid-DNA). Diese starke Hybridisierungsbande wird durch Konkatomerenbildung und statistische Integration erklärt, Mechanismen, die zuvor bei *V. carteri* analysiert wurden (Babinger et al., 2001), und die verkürzt als "Tandem-Integration von Transgenen" bezeichnet werden. Offenbar fördert die Transformation mit hoch-konzentrierter Plasmid-DNA diesen Mechanismus (Schiedlmeier et al., 1994). Mehrere Plasmide bilden durch homologe Rekombination offenbar zirkuläre Konkatomere, bevor sie dann über ein einzelnes *Crossover* ins Rezipientengenom integriert werden. Dies führt dann zu den beobachteten Tandem-Wiederholungen. Bei den 153-68 Transformanten 68-7, 68-9, 68-12 sowie bei den 153-48 Transformanten 48-7, 48-14, und 48-24 (Abb. 7) wurde jeweils eine starke Bande bei 2.1 kb detektiert, die der Größe des Gesamt-Plasmids entspricht und diese Interpretation bestätigt. Intensitätsmessungen des Signals dieser Hauptbande ergaben 7 bis 18 Kopien in Tandem-Konfiguration. Je nach *Crossover point* resultiert eine Extrabande unterschiedlicher Länge, die das terminale Glied des Tandemkonglomerats kennzeichnet. Im Vergleich zur Zahl der integrierten Genkopien wurde in mehreren Transformanten die Resistenzstärke analysiert. Eine Korrelation zwischen Kopienzahl und Resistenz ließ sich daraus nicht ableiten. So konnten bei Transformanten mit nur 1 bis 2 Kopien (Abb. 7; Transformante 48-25) eine ähnliche Resistenzstärke von ca. 150 µg/ml bestimmt werden, wie bei Transformanten mit 12 Kopien (Abb. 7, Transformante 48-24) (Tab. 11). Für diesen Befund gibt es mehrere Erklärungen:

(a) Die Expression der *aphH*-Kopien wird durch den Integrationslocus (Euchromatin hohe Expression, Heterochromatin niedrigere Expression) bestimmt.

- (b) Es besteht ein *feedback*, das promotorabhängig die Transkription vieler Kopien herunter reguliert.
- (c) Es ist bekannt, daß hohe Kopienzahlen eines Gens zum *Silencing* führen, ein Phänomen, das u.a. durch RNA-Interferenz erklärt wird (Waterhouse et al., 2001; Hannon, 2002; Ahlquist, 2002)
- (d) Eine "nicht-ideale" *codon usage* und falsche Faltung der *aphH* mRNA können zu verstärktem RNA-Abbau und geringerer Translationseffizienz führen.

Deshalb sind auch bei geringen APHVIII-Konzentrationen in den Transformantenzellen hohe k_m und v_{max} der Phosphotransferase bei Selektion auf Paromomycin entscheidend für die gute Eignung des Systems für *V. carteri*. Im Gegensatz zum *Ble*-Protein, welches eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin vermittelt (Hallmann et al., 1999), erfordert es die vom *aphH*-Gen codierte Phosphotransferase nicht, in stöchiometrischen Mengen nachgeliefert zu werden, um eine ausreichende Resistenz zu erzeugen. Dies ist ein großer Vorteil des neuen Selektionssystems, denn dadurch treten keine negativen Effekte der notwendigen Überexpression des resistenzvermittelnden Proteins, wie im Fall des *ble*-Gens auf. Zusätzliche Immunfluoreszenz-Untersuchungen an resistenten Transformanten mit Hilfe eines *gfp*-Reportergens (Abb. 12) zeigen ebenfalls nur eine schwache, grüne Fluoreszenz, die sich auf die marginale Expression des APHVIII-Proteins zurückführen läßt.

3. Bedeutung des *aphH*-Markers für die *Volvox* Transformation

Durch Kombination des *aphH*-Gens aus *S. rimosus* mit starken endogenen Promotor- und Regulationssequenzen wurde ein neuer, effektiver Selektionsmarker für die genetische Transformation von *V. carteri* geschaffen. Unter optimalen Bedingungen wurde die Transformationseffizienz um eine Größenordnung auf 9 Transformanten pro 10.000 Rezipientenzellen erhöht (Tab. 10). Damit können neue Anwendungen wie das *targeting* von *Volvox*-Genen ins Auge gefaßt werden. Ferner ist der *aphH*-Marker ubiquitär im Wildtyp und Mutantenstämmen verwendbar. Die gemessenen Kotransformationsraten von über 30 % sind in der Praxis dem genetischen Transfer aller interessanten nicht-selektionierbaren Gene angemessen. Es ist zu erwarten, daß der hier etablierte dominante Selektionsmarker molekulargenetische Analysen von *V. carteri* fördern und beschleunigen wird.

5 Zusammenfassung

Das Aminoglykosid-Antibiotikum Paromomycin, welches hoch toxisch für die Grünalge *Volvox carteri* ist, wird durch die Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase (APHVIII) aus *Streptomyces rimosus* effektiv inaktiviert. In dieser Arbeit wurde das bakterielle *aphH* Gen, das dieses Enzym kodiert genetisch für die Expression in *Volvox* bearbeitet, um dieser Alge eine Paromomycin Resistenz zu vermitteln. Die maximale Resistenz wurde dabei durch ein chimäres *aphH* Gen unter konstitutiver Kontrolle eines *hsp70A-rbcS3* (Hitzeschock-Rubisco S3) Promotors in Kombination mit der 3'-NTR des *Volvox* Rubisco S3 Gens erzielt. Dieses *aphH*-enthaltende Konstrukt schien als dominanter Selektionsmarker für die genetische Transformation von *Volvox carteri* mit Transformationsraten von bis zu 9 Transformanten pro 10.000 Zellen am besten geeignet zu sein. Die Kotransformationseffizienzen mit einem nicht-selektionierbaren Marker liegen bei über 30 %. Das chimäre *aphH* Gen wurde stabil, oft auch als Tandem Wiederholung, in das *Volvox* Genom integriert. Eine für die Paromomycin-Resistenz ausreichende Expression konnte mit diesem Plasmid erreicht werden. Aus diesem Grund ist das bakterielle *aphH* Gen ein idealer dominant selektionierbarer Marker für die Transformation und Kotransformation von Wildtyp- und Mutanten-Stämmen von *V. carteri* mit maximalen Raten.

6 Literaturverzeichnis

Ahlquist, P. (2002). RNA-Dependent RNA Polymerases, Viruses, and RNA Silencing. *Science* **296**:1270-1273.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402.

Babinger, P., Kobl, I., Mages, W., and Schmitt, R. (2001). A link between DNA methylation and epigenetic silencing in transgenic *Volvox carteri*. *Nucleic Acids Res* **29**:1261-1271.

Bachmann, B.J. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K12, Edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.

Berthold, P., Schmitt, R., and Mages, W. (2002). An engineered *Streptomyces hygroscopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* **153**:401-412.

Cerutti, H., Johnson, A. M., Gillham, N. W., and Boynton, J. E. (1997). Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **9**:925-945.

Choi, G., Przybylska, M. and Straus D. (1996). Three abundant germ line-specific transcripts in *Volvox carteri* encode photosynthetic proteins. *Curr Genet* **30(4)**:347-55.

Danilenko, V. N., Akopiants, K. E., Sizova, I. A. and Michurina, T. A. (1997). Determination of the nucleotide sequence and characterization of the novel aminoglycoside phosphotransferase *aphVIII* gene from the *Streptomyces rimosus* strain. *Genetika*. **33(11)**:1478-86.

Ertl, H., Mengele, R., Wenzl, S., Engel, J., and Sumper, M. (1989). The extracellular matrix of *Volvox carteri*: molecular structure of the cellular compartment. *J Cell Biol* **109**:3493-3501.

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

Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:8998-9002.

Fuhrmann, M., Oertel, W., and Hegemann, P. (1999). A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **19**:353-361.

Gierl, A. and Saedler, H. (1992) Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Mol Biol* **19**(1):39-49.

Gruber, H., Goetinck, S. D., Kirk, D. L., and 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., and 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., and Rappel, A. (1999). Genetic engineering of the multicellular green alga *Volvox*: a modified and multiplied bacterial antibiotic resistance gene as a dominant selectable marker. *Plant J* **17**:99-109.

Hallmann, A., Rappel, A., and Sumper, M. (1997). Gene replacement by homologous recombination in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7469-7474.

Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* **418(6894)**:244-51.

Harper, J. F., and Mages, W. (1988). Organization and structure of *Volvox* beta-tubulin genes. *Mol Gen Genet* **213**:315-324.

Hasnain, S. E., Manavathu, E. K., and Leung, W. C. (1985). DNA-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* cells: use of aminoglycoside 3'-phosphotransferase as a selectable marker. *Mol Cell Biol* **5**:3647-3650.

Huskey, R. J., Griffin, B. E., Cecil, P. O., and Callahan, A. M. (1979). A preliminary genetic investigation of *Volvox carteri*. *Genetics* **91**:229-244.

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, und R. C. Starr (ed.), *Experimental Phycology, Volume 1: Cell Walls and Surfaces, Reproduction and Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin.

Kirk, D. L. (1998). *Volvox: Molecular Genetic Origins of Multicellularity and Cellular Differentiation*. Cambridge University Press, Cambridge.

Kirk, D. L. (2001). Germ-soma differentiation in *volvox*. *Dev Biol* **238**:213-223.

Kirk, D. L., Birchem, R., and 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., and Harper, J. F.** (1986). Genetic, biochemical, and molecular approaches to *Volvox* development and evolution. *Int Rev Cytol* **99**:217-293.
- Kirk, D. L., Kaufman, M. R., Keeling, R. M., and 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., and Nishii, I.** (2001). *Volvox carteri* as a model for studying the genetic and cytological control of morphogenesis. *Dev Growth Differ* **43**:621-631.
- Knappik, A. and Pluckthun, A.** (1994) An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments. *Biotechniques* **17**(4):754-61.
- Lumbreras, V., Stevens, D. R., and Purton, S.** (1998). Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J* **14**:441-447.
- Mages, W., Salbaum, J. M., Harper, J. F., and Schmitt, R.** (1988). Organization and structure of *Volvox* alpha-tubulin genes. *Mol Gen Genet* **213**:449-458.
- Meissner, M., Stark, K., Cresnar, B., Kirk, D. L. and Schmitt, R.** (1999). *Volvox* germline-specific genes that are putative targets of RegA repression encode chloroplast proteins. *Curr Genet* **36**(6):363-70.
- Miller, S. M., Schmitt, R. and Kirk, D. L.** (1993). Jordan, an active *Volvox* transposable element similar to higher plant transposons. *Plant Cell* **5**(9): 1125-38.
- Miller, S. M., and 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.

- Nishii, I., Ogihara, S. und Kirk, D. L.** (2003). A kinesin, *invA*, plays an essential role in *volvox* morphogenesis. *Cell* **113**(6):743-53.
- Novick, R. P., Clowes, R. C., Cohen, S. N., Curtiss, R. 3rd, Datta, N. and Falkow, S.** (1976). Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev* **40**(1):168-89.
- Provasoli, L. and Pintner, I. J.** (1958). Ecological implications of in vitro nutritional requirements of algal flagellates. *Ann N Y Acad Sci* **56**(5):839-51.
- Quinn, T. W. and Wilson, A. C.** (1993). Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *J Mol Evol* **37**(4):417-25.
- Rochaix, J. D., and van Dillewijn, J.** (1982). Transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with yeast DNA. *Nature* **296**:70-72.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-5467.
- Schiedlmeier, B., Schmitt, R., Muller, W., Kirk, M. M., Gruber, H., Mages, W., and Kirk, D. L.** (1994). Nuclear transformation of *Volvox carteri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:5080-5084.
- Schmitt, R., Fabry, S., and Kirk, D. L.** (1992). In search of molecular origins of cellular differentiation in *Volvox* and its relatives. *Int Rev Cytol* **139**:189-265.
- Schroeder, R., Waldsich, C. and Wank, H.** (2000). Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J* **19**(1):1-9.

Schroda, M., Blocker, D., and Beck, C. F. (2000). The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J* **21**:121-131.

Sizova, I., Fuhrmann, M., and Hegemann, P. (2001). A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* **277**:221-229.

Sizova, I. A., Lapina, T. V., Frolova, O. N., Alexandrova, N. N., Akopiants, K. E., and Danilenko, V. N. (1996). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with a *Streptomyces rimosus* gene as the selective marker. *Gene* **181**:13-18.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**:503-517.

Stark, K., Kirk, D. L., and 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. and Schmitt, R. (2002). Genetic control of germ-soma differentiation in *Volvox carteri*. *Protist* **153**(2):99-107.

Starr, R. C. (1969) Structure, reproduction and differentiation in *Volvox carteri f. nagariensis* Iyengar, strains HK9 & HK10. *Arch Protistenk* **111**:204-222

Starr, R. C. (1970). Control of differentiation in *Volvox*. *Symp Soc Dev Biol* **29**:59-100.

Starr, R. C., and Jaenicke, L. (1974). Purification and characterization of the hormone initiating sexual morphogenesis in *Volvox carteri f. nagariensis* IYENGAR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**:1050-1054.

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

Vieira, J. and Messing, J. (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. Gene **19(3)**:269-76.

Waterhouse, P. M., Wang, M. B. and Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature **411(6839)**:834-42.

Bedanken möchte ich mich zuerst bei Herrn **Prof. Dr. Rüdiger Schmitt** für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit. Sein persönliches Engagement, seine Anregungen und zahlreichen Tipps sowie die ständige Diskussionsbereitschaft waren mir eine willkommene Hilfe.

Dr. Armin Hallmann danke ich für die Einweisung und praktische Hilfe bei der Benutzung der *BioRad-Particle Gun*.

Ein besonderer Dank gilt meinem ehemaligen Laborkollegen **Dr. Klaus Stark**, sowie vor allem meinem momentanen Betreuer **Dr. Wolfgang Mages** und unserer besten TA **Gerda Treuner**, ohne deren Hilfe und seelischen Beistand ich die letzten Jahre nicht so erfolgreich beenden hätte können.

Danke auch an **Dr. Patrick Babinger** für die Hilfe bei zahlreichen Computer-Problemen und seine Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragestellungen.

Ebenfalls ein dickes Danke an **Dr. Birgit Scharf** für Tipps und Tricks bei sämtlichen Arbeiten mit Proteinen und anderen Schwierigkeiten.

Andrea Brinnich und **Andreas Leiherer** waren mir immer hilfreiche Gesprächspartner in allen Lebenslagen.

Allen Lehrstuhlmitgliedern, die bisher namentlich nicht genannt wurden, sowie unserer Sekretärin **Sabine Schneider** sei hier ebenfalls für das wirklich gute Arbeitsklima und ihre Anregungen gedankt.

Zuletzt möchte ich mich noch bei **meinen Eltern** und **Uli** bedanken, bei denen ich immer die nötige Unterstützung und das Verständnis fand, ohne die eine solche Arbeit nicht möglich wäre.

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg in der Zeit von Januar 2000 bis November 2003 unter der Betreuung von Prof. Dr. Rüdiger Schmitt angefertigt.

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

.....

Thomas Jakobiak