

**Kartierung des Periodik – Gens  
*Uhr1*  
aus *Chlamydomonas reinhardtii***

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades des  
Fachbereichs Biologie der  
Universität Hamburg

vorgelegt von

**Stefanie Weitnauer**

aus Bad Brückenau

Hamburg 2002

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg

Auf Antrag von Herrn Professor Dr. D. MERGENHAGEN

Weitere Gutachter der Dissertation:  
Frau Professor Dr. E. PRATJE

Tag der Disputation: 21. Februar 2003

## Inhalt

Abkürzungen .....	5
Zusammenfassung .....	6
1. Einleitung.....	8
1.1. Circadiane Rhythmen.....	8
1.2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als Modellsystem .....	14
1.3. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden.....	16
1.3.1. Transformation.....	16
1.3.2. Screening einer BAC - Bibliothek.....	17
1.3.3. AFLP - Analyse .....	18
1.4. Ziele dieser Arbeit .....	21
2. Material und Methoden .....	23
2.1. Verwendete Organismen .....	23
2.1.1. Chlamydomonas - Stämme.....	23
2.1.2. Bakterienstämme .....	23
2.2. Nährmedien.....	24
2.2.1. TAP - Medium .....	24
2.2.2. HSM – Medium .....	24
2.2.3. Vollmedium .....	24
2.2.4. Sager- Granick – Medium .....	25
2.2.5. Luria-Bertani (LB)-Medium.....	25
2.2.6. 2xYT – Medium.....	25
2.3. Chemikalien und Enzyme.....	26
2.4. Algenanzucht .....	26
2.4.1. Kreuzungsnachkommen .....	26
2.4.2. Stamm cc 503 .....	27
2.5. Kreuzungen für Transformationsexperimente .....	27
2.5.1. Kreuzung und Anreicherung der Zygoten .....	28
2.5.2. Ausplattieren .....	28
2.5.3. Verschieben im Raster.....	29
2.5.4. Bedürftigkeitstest .....	29
2.6. Nukleinsäure-Isolierung .....	30
2.6.1. Algen-DNA-Präparation nach Newman et al.....	30
2.6.2. PeqLab E.Z.N.A. Plant DNA Kit, Protokoll angepaßt .....	30

---

2.6.3. BAC- DNA Präparation .....	31
2.6.4. Plasmid-DNA .....	33
2.7. Gelelektrophorese.....	33
2.7.1. Agarosegelelektrophorese .....	33
2.7.2. Acrylamid-Gelelektrophorese für AFLPs.....	34
2.8. AFLP-Analyse der Kreuzungsnachkommen .....	36
2.8.1. Restriktion .....	36
2.8.2. Ligation .....	37
2.8.3. Präamplifikation .....	38
2.8.4. Selektive Amplifikation .....	39
2.9. Umwandlung der AFLP-Marker in STS (sequence tagged site)-Marker .....	40
2.9.1. Ausschneiden der Markerbanden .....	40
2.9.2. Sequenzierung und Primerableitung.....	41
2.10. PCR.....	41
2.11. Sequenzreaktionen.....	42
2.12. PCR-Analyse der Kreuzungsnachkommen .....	43
2.13. Southern Blots .....	43
2.14. Hybridisierungen.....	44
2.15. Sondenherstellung.....	45
2.15.1.AFLP – Marker.....	45
2.15.2.Herstellung von Sonden aus BAC-Enden durch <i>In-Vitro</i> -Transkription...	45
2.15.3.Markierung von BAC-Endfragmenten mit Dig-ChemLink.....	46
2.15.4.Subklonierung von BAC-Endfragmenten .....	46
2.15.5.Adapterligation an BAC-Endfragmente .....	46
2.16. Detektion von Southern blots und AFLP-Membranen .....	47
2.17. Stripping .....	47
2.18. Screening einer BAC-Bibliothek .....	47
3. Ergebnisse.....	49
3.1. Identifizierung molekularer Marker mittels AFLP .....	49
3.2. Ermittlung des Kopplungsgrades der Marker zum Gen.....	53
3.2.1. Ausschneiden der AFLP-Markerbanden .....	53
3.2.2. STS-Analyse .....	57
3.2.3. CAPS-Analyse .....	57
3.2.4. Ermittlung des Kopplungsgrades .....	58

---

3.3. Screening einer BAC-Bibliothek .....	61
3.4. Chromosome walking mit BAC-Contig-Enden.....	63
3.4.1. BAC-Plasmid-DNA.....	63
3.4.2. Erstellung von Contigs anhand von Agarose-Gelelektrophoresen.....	65
3.4.3. Umwandlung von Contig-Enden in neue Marker.....	67
3.5. Identifizierung und teilweise Sequenzierung eines Kandidatengens.....	72
3.6. Erzeugung von Doppelmutanten für Transformationsexperimente .....	74
4. Diskussion .....	75
5. Literatur .....	91
6. Anhang .....	100
Anhang A: Verwendete Primer.....	100
Anhang B: Sequenzen der AFLP-Marker .....	101
Anhang C: Markerverteilung in den Kreuzungsnachkommen .....	104
Anhang D: Sequenz des Gens <i>lhcb 5</i> .....	109
Anhang E: Sequenz des putativen <i>nit 8</i> – Gens.....	110
Anhang F: Sequenz des Kandidatengens .....	111
Danksagung.....	112

**Abkürzungen**

Abb	Abbildung
abs	absolut
AFLP	amplified fragment length polymorphism
APS	Ammoniumpersulfat
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaare
CAPS	cleaved amplified polymorphic site
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin - Tetraessigsäure
EST	Expressed sequence tag
g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
kb	Kilobasen(paare)
l	Liter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
np	Normalperiodik
PCR	Polymerase - Kettenreaktion
pmol	Pikomol
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp	Kurzperiodik
STS	sequence tagged site
Tab	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAP	Tris - Ammonium - Phosphat
TBE	Tris - Borat - EDTA
Tris	Tris (hydroxymethyl)ammoniummethan
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp

## Zusammenfassung

Circadian regulierte Rhythmen wurden in fast allen eukaryotischen und einigen prokaryotischen Organismen nachgewiesen. Sie regulieren die zeitliche Abfolge von metabolischen und physiologischen Prozessen sowie von bestimmten Verhaltensweisen. Dabei sind sie nicht auf äußere Zeitgeber wie Licht oder Temperaturwechsel angewiesen, sondern sie erhalten selbst einen Rhythmus mit einer Periode von ungefähr 24 h aufrecht. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde in Organismen wie *Drosophila*, *Synechococcus* oder *Arabidopsis* eingehend untersucht. Dabei konnten in allen Organismen wichtige Komponenten des circadianen Systems identifiziert werden, eine vollständige Aufklärung des gesamten Systems mit Input durch äußere Signale, die die Uhr stellen, dem zentralen Oszillator, der die Schwingung mit einer Periodenlänge von ca. 24 h aufrecht erhält und der Steuermechanismen für den Output, also die circadian regulierten Prozesse, steht jedoch noch aus. In allen untersuchten Organismen scheint die Schwingung des zentralen Oszillators durch ein Zusammenspiel von negativen Rückkopplungsschleifen zu entstehen. In allen drei genannten Organismen wurden die wichtigsten Komponenten dieser Rückkopplungsschleifen durch eine genetische und molekularbiologische Untersuchung von Mutanten mit einer veränderten Periodenlänge gefunden. Das erste so gefundene Gen war *period*, das mit Hilfe einer Periodenlängenmutante in *Drosophila* gefunden wurde. Es folgten weitere Gene wie das *kaiABC* – Cluster in *Synechococcus* und *toc 1*, *lhy* und *cca 1* in *Arabidopsis*, die alle durch Periodenlängenmutanten entdeckt wurden. Eine solche Periodenlängenmutante wurde auch in *Chlamydomonas reinhardtii* bereits 1977 von Prof. Dr. D. Mergenhagen isoliert, bisher konnten jedoch noch keinerlei Aussagen über zugrundeliegende Mechanismen gemacht werden. Durch klassische Kreuzungsversuche ist lediglich bekannt, dass es sich um eine Mutation an nur einem Genort handeln muss, die die Periodenlänge von 26 h im Wildtyp auf 18 h in der Kurzperiodikmutante verkürzt.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe molekularbiologischer Methoden diese Mutation zu kartieren und Vorbereitungen zu einer Klonierung des Periodikgens *Uhr1* zu treffen. Als Grundlage standen hierfür ca. 170

Nachkommen einer Kreuzung zwischen einem Wildtypstamm und der Kurzperiodikmutante zur Verfügung. Durch AFLP – Analysen konnten in diesen Nachkommen acht molekulare Marker für *Uhr1* gefunden werden. Diese Marker wurden kloniert und sequenziert, in STS – oder CAPS – Marker umgewandelt und für eine Hochdurchsatzüberprüfung aller Nachkommen eingesetzt. Dadurch konnte der Kopplungsgrad der AFLP - Marker zum gesuchten Gen bestimmt werden. Hoch gekoppelte Marker wurden in Digoxygenin – markierte Hybridisierungs sonden umgewandelt, mit denen eine käuflich erhältliche bacterial artificial chromosome (BAC) – Bibliothek durchgemustert wurde. Diese Bibliothek enthält das gesamte Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* in Fragmenten von ca. 50 – 120 kb in BAC - Klonen. Die so gefundenen Klone wurden in Contigs angeordnet. Aus den Enden dieser Contigs wurden neue Sonden erstellt und die Bibliothek wieder durchgemustert, um so durch weitere Klone die Lücken zwischen einzelnen Contigs zu schließen. Dadurch sollte ein genomischer Bereich abgedeckt werden, der sowohl die Marker als auch das Gen *Uhr 1* enthält.

Parallel dazu wurden Vorbereitungen für Rescue - Experimente mit solchen BAC – Klonen getroffen. Hierzu wurden durch Kreuzung transformierbare Stämme mit dem Selektionsmarker Nitratreduktase erzeugt, die eine verkürzte Periodenlänge aufwiesen. Ein Rescue mit der gesamten genomischen DNA aus einer Wildtyp – Plasmidbank wäre nicht möglich, da hier zu viele Transformanten auf ihre Periodenlänge überprüft werden müssten. Deshalb müssen zuvor genomische Bereiche identifiziert werden, die eine für die Transformation geeignete Größe aufweisen und sehr wahrscheinlich das gesuchte Gen enthalten. Daher wurde eine Methode zur Identifizierung möglicher Kandidatengene auf den BAC – Klonen getestet. Sie beruht auf dem Einsatz einer Sonde aus markierter Gesamt – mRNA, die zu allen exprimierten Genen auf einem BAC – Klon hybridisiert. Dies ermöglicht eine Subklonierung und Sequenzierung dieser Gene, die dann auch für Rescue – Experimente eingesetzt werden könnten. Eine Kotransformation der nitratreduktasebedürftigen Kurzperiodikstämme mit dem Nitratreduktasegen und dem Gen *Uhr1* sollte die im Wildtyp zu beobachtende Periodenlänge von 26 h wieder herstellen und damit beweisen, dass es sich tatsächlich um das gesuchte Periodikgen handelt.



Damit würden sich neue Möglichkeiten eröffnen, die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nicht nur als hervorragend geeignetes Modellsystem für Flagellenaufbau oder Photosynthese zu benutzen, sondern auch als Modell für circadiane Regulationsmechanismen in photosynthetischen Organismen.

## 1. Einleitung

Die Energie für alles Leben auf diesem Planeten kommt von der Sonne. Doch diese Energie steht nicht 24 Stunden gleichbleibend zur Verfügung. Der ständige Wechsel von Tag und Nacht schafft sich rhythmisch wiederholende Veränderungen in unserer Umgebung. Daran haben sich verschiedenste Tiere z. B. durch ein tag - oder nachtaktives Leben angepaßt, Pflanzen erblühen zu verschiedenen Tageszeiten und es ist auch schon lange bekannt, dass verschiedenste physiologische Prozesse zu unterschiedlichen Tageszeiten ablaufen. Dies dürfte schon den Menschen der Urzeit aufgefallen sein, faszinierend ist jedoch eine Beobachtung, die de Mairan 1729 machte: Dieses für eine Tageszeit angepaßte Verhalten wird nicht einfach nur durch den Wechsel von Licht und Dunkelheit ausgelöst, es besteht auch im gleichen Rhythmus fort, wenn der äußere Zeitgeber Licht ausbleibt. De Mairan beobachtete dies an den Blattbewegungen von Pflanzen, die in ständiger Dunkelheit den gleichen Ablauf zeigten wie im Wechsel von Tag und Nacht (de Mairan, 1729). Den Pflanzen mußte also ein Mittel zur Verfügung stehen, die Zeit selbst zu messen und nicht nur auf äußere Veränderungen zu reagieren. In den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts begann Erwin Bünning, dieses Phänomen an der Bohne *Phaseolus* genauer zu untersuchen (Bünning, 1936). Er stellte fest, dass sich die Blattbewegungen der Bohne unter gleichbleibenden Bedingungen (hier: Dauerdunkel) in einem freilaufenden Rhythmus von 25,4 h wiederholten. Inzwischen wurden viele solcher Phänomene beobachtet, die ohne äußere zeitgebende Einflüsse in einem circadianen (lat. *circa* – ungefähr; *dies* – Tag) Rhythmus ablaufen.

### 1.1. Circadiane Rhythmen

Circadiane Rhythmen zeichnen sich durch vier Charakteristika aus (zusammengefaßt in Mergenhagen, 1980):

- sie zeigen auch unter konstanten Bedingungen, also ohne äußere Zeitgeber, eine Periode von ungefähr 24 h

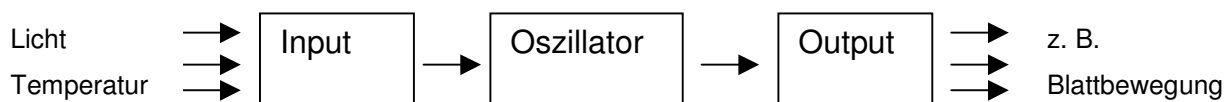
- die Periodenlänge ist innerhalb physiologischer Grenzen temperaturkompensiert, d. h. anders als bei anderen biologischen Reaktionen ändert sich die Geschwindigkeit nicht mit der veränderten Temperatur
- man kann durch äußere Reize innerhalb gewisser Grenzen auch Perioden anderer Länge aufprägen (Entrainment)
- durch Zeitgeber genügender Stärke kann man die Rhythmik in ihrer Phase verschieben

Dies bedeutet, dass Organismen in der Lage sind, die Tageszeit selbständig zu messen und so Abläufe zeitlich zu steuern. Es ist nicht verwunderlich, dass die ersten Beobachtungen hierzu an Pflanzen gemacht wurden, da für Pflanzen Licht als Energielieferant eine lebenswichtige Funktion hat. Kann die Pflanze nun „vorhersagen“, wann es hell wird, können sämtliche für die Photosynthese notwendigen Proteine schon kurz vor Tagesanbruch bereitgestellt werden, um so jedes Photon auszunutzen.

Inzwischen sind viele Phänomene beschrieben, die von dieser inneren Uhr gesteuert werden: Beispiele hierfür sind der Schlaf- / Wach - Rhythmus beim Menschen (Minors and Waterhouse, 1984), der Schlüpfrrhythmus und das Aktivitätsmuster bei *Drosophila* (Konopka and Benzer, 1971), die Aktivitätsverteilung bei Hamstern und Mäusen sowie die Photoakkumulation bei *Chlamydomonas reinhardtii* (Bruce, 1970).

Um den Mechanismus der inneren Uhr zu verstehen, genügt es jedoch nicht, ihre Auswirkungen oder „Zeiger“ zu beobachten, man muß auch herausfinden, wie die Uhr „gestellt“ wird und wie sie „tickt“.

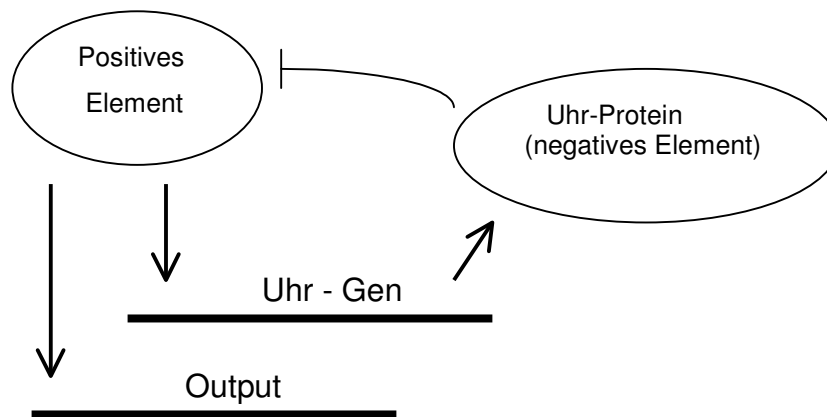
Alle heute gängigen Modelle gehen davon aus, dass circadiane Systeme aus drei Teilen bestehen: einem Input, der äußere Reize wie Licht und Temperatur zum Stellen der Uhr aufnimmt; einem zentralen Oszillator (die "Uhr" an sich), der die freie Schwingung unabhängig von äußeren Einflüssen darstellt; und einem Output, also einem Teil, der die Signale der Uhr an die Zelle weitergibt und so die circadiane Expression verschiedenster Gene bewirkt (Abb. 1).



**Abb. 1: Modell eines circadianen Systems**

Auch wenn Signale zwischen den Zellen in höheren Organismen für eine Synchronisation sorgen können, sind einzelne Zellen dieser Organismen ebenfalls in der Lage, einen stabilen Rhythmus zu erzeugen.

Der zentrale Oszillator besteht in allen bisher untersuchten Organismen aus einer negativen Feedback-Schleife, d. h. die Transkription eines „Uhr“-Gens ergibt ein „Uhr“-Protein, das wiederum seine eigene Synthese stoppt, indem es positive Elemente blockiert, die die Transkription des „Uhr“-Gens ermöglichen (Abb. 2).



**Abb. 2: Modell eines Oszillators** (nach Dunlap, 1999)

Die Aufklärung molekularer Mechanismen der inneren Uhr war nur möglich durch die Analyse von Periodenlängen - Mutanten. Solche Mutanten existieren z. B. für *Drosophila* (Konopka and Benzer, 1971), *Neurospora* (Feldman and Hoyle, 1973), *Synechococcus* (Kondo et al., 1994), *Arabidopsis* (Schaffer et al., 1998) und *Chlamydomonas* (Bruce, 1972) (Mergenhagen, 1984).

Das am besten überprüfte Modell eines circadianen Systems existiert für die Fruchtfliege *Drosophila*, bei der auch das erste mutierte Periodik-Gen, *period* (*per*), gefunden wurde (Reddy et al., 1984). PERIOD stellt als Heterodimer zusammen mit TIMELESS (Myers et al., 1995) das negative Element dar, das auf die Produkte der Gene *cycle* (Rutila et al., 1998) und *clock* wirkt. Diese wiederum bewirken die Transkription nicht nur von *period* und *timeless*, sondern auch von anderen circadian gesteuerten Genen, so dass es zu einem

rhythmischen Output kommt. CYCLE und CLOCK besitzen sogenannte PAS-Domänen zur Protein-Protein-Interaktion, die ihre Heterodimerisierung erleichtern. Zusätzlich spielt das Cryptochrom CRY eine Rolle im Input, da es in Abhängigkeit vom Licht zur Degradation von TIMELESS beiträgt. Die Proteinkinase DOUBLETIME trägt durch Phosphorylierung zu einer schnelleren Degradation von PERIOD bei (Price et al., 1998).

In photosynthetischen Organismen sind es vor allem das einzellige Cyanobakterium *Synechococcus*, die Samenpflanze *Arabidopsis* und die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, deren circadiane Systeme näher untersucht wurden.

Bei dem Cyanobakterium *Synechococcus* wurden in einem automatisierten Screening über 50 Mutanten mit Periodenlängen von 14 - 60 h gefunden (Kondo and Ishiura, 1994). Hierzu wurde das bakterielle Luziferase-Operon *luxAB* unter die Kontrolle eines Promotors aus dem Photosystem II (*psbAI*) gestellt und in die *Synechococcus* – Zellen eingebracht. Dadurch wurde erreicht, dass die Zellen circadian reguliert Biolumineszenz zeigen, und dieses Leuchten wurde automatisch für mehr als 6000 Kolonien auf einer Agarplatte aufgenommen (Kondo et al., 1993). Solche leuchtenden Kolonien wurden durch Ethylmethansulfonat (EMS) mutagenisiert, und bei der dann folgenden Analyse der Mutanten wurden drei Gene entdeckt, *kai* (japanisch für Zyklus) *A*, *B* und *C* (Ishiura et al., 1998).

KAI A erhöht die Expression von *kai C*, während KAI C die Transkription von *kai BC* unterdrückt (Iwasaki et al., 1999), d. h. mit diesen drei Genen sind alle notwendigen Elemente der Feedback-Schleife eines Oszillators gegeben.

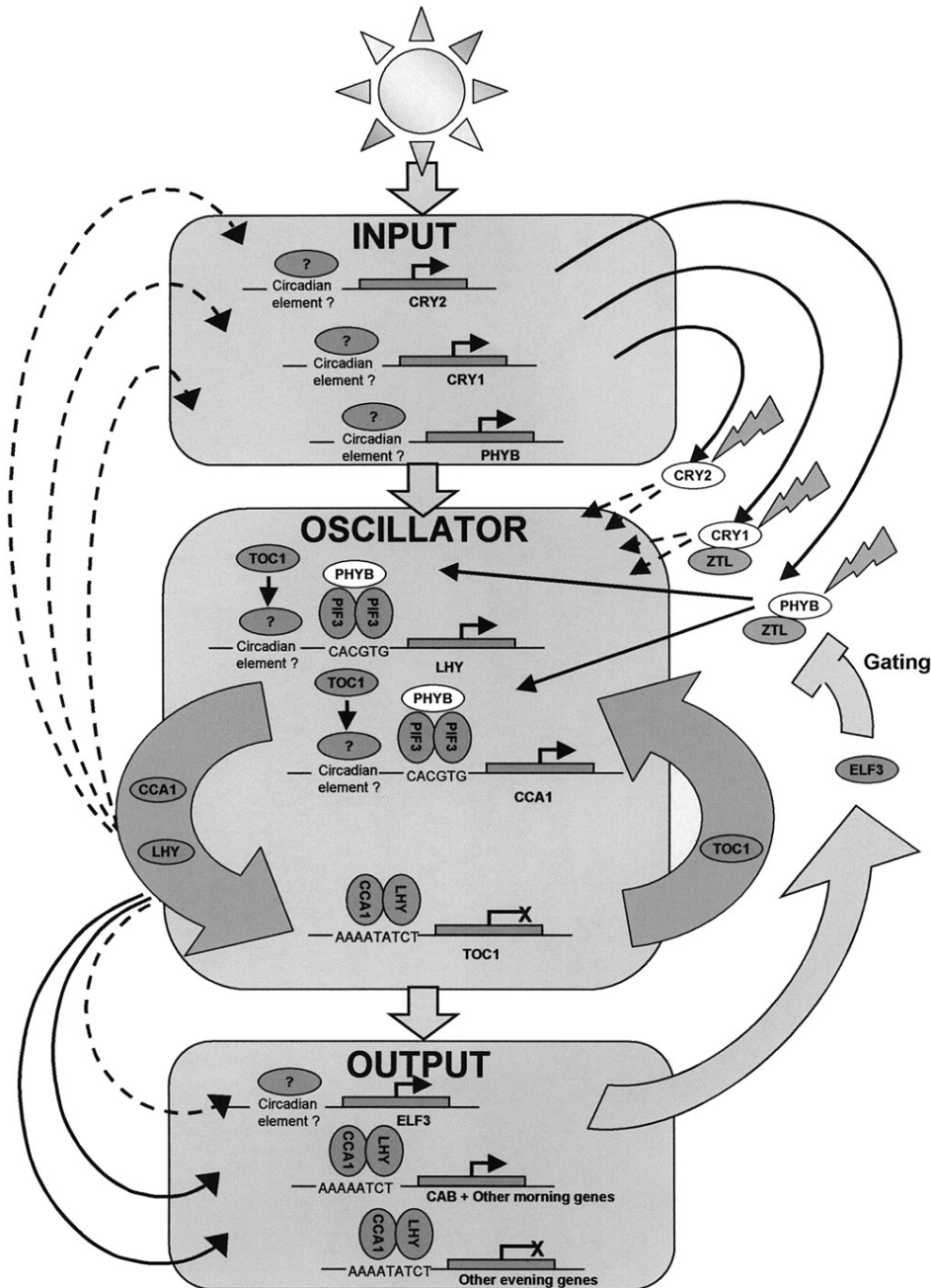
Ebenfalls mit Hilfe des *luxAB* – Gens konnte gezeigt werden, dass in *Synechococcus* tatsächlich alle Gene circadian reguliert werden. Hierzu wurde das Luziferase – Gen ohne Promotor zufällig an die verschiedensten Stellen des Genoms inseriert. Erfolgte die Insertion nahe genug an einem Promotor eines beliebigen Gens, begannen die Zellen zu leuchten, und dieses Leuchten wurde auf seine Periodik hin untersucht. In allen Fällen konnte eine circadiane Rhythmik nachgewiesen werden, auch wenn sich natürlich Amplitude und Phase der einzelnen Rhythmen unterschieden (Liu et al., 1995).

Das Beispiel *Synechococcus* zeigt also, dass bereits einfache Prokaryoten eine innere Uhr besitzen. Von dieser Uhr werden nicht nur für die Photosynthese wichtige, sondern alle Gene circadian reguliert.

In *Arabidopsis* wurden mit Hilfe einer ähnlichen Methode wie bei *Synechococcus* bereits wichtige Komponenten der inneren Uhr identifiziert. Dazu wurde auch hier ein Konstrukt aus Luziferase und verschiedenen circadian regulierten Promotoren verwendet (Millar et al., 1992). So wurden in Pflanzen, die das *cab2::luc* Reportergen trugen und mit Ethylmethansulfonat mutagenisiert worden waren, in einem Screen nach Periodenlängenmutanten die Gene *toc 1 (timing of cab)* (Somers et al., 1998) und *ztl (Zeitlupe)* (Somers et al., 2000) gefunden. Weitere Untersuchungen an Transkriptionsfaktoren für die circadian regulierten *lhc* (light harvesting complex) – Gene führten zur Entdeckung von zwei weiteren wichtigen Bestandteilen der inneren Uhr in *Arabidopsis*, LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) (Schaffer et al., 1998) und CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA 1) (Wang and Tobin, 1998). Mutationen dieser Gene führen zu einer Veränderung aller rhythmisch gesteuerten Prozesse, ihre Transkripte zeigen selbst eine circadiane Periodik mit einem Maximum am Abend. Zusammen mit TOC 1 gehören sie zum zentralen Oszillator der Uhr, wobei TOC 1 die Expression von *cca 1* und *lhy* positiv reguliert, während die von diesen beiden Genen codierten Proteine an den Promotor von *toc 1* binden und so die negative Rückkopplung in dieser Feedback-Schleife darstellen (s. Abb. 3).

Inzwischen sind auch wichtige Komponenten des Inputs von Lichtsignalen in den zentralen Oszillator gefunden worden (Abb. 3). Hier spielen vor allem die Cryptochrome 1 und 2 (CRY 1, 2) und Phytochrom B (PHY B) eine Rolle (Somers et al., 1998), die alle unter direkter Kontrolle des Oszillators stehen. PHY B erhöht die Transkription von *cca 1* und *lhy*, indem es zusammen mit dem PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3) an ein G-Box-Element der entsprechenden Promotoren bindet (Martinez-Garcia et al., 2000). CRY 1 und PHY B geben das Lichtsignal in Verbindung mit dem Signaltransduktionsfaktor ZEITLUPE an die Uhr weiter. Hierbei spielt jedoch ein ebenfalls von der Uhr regulierter Faktor namens EARLY FLOWERING 3 (ELF 3) eine Rolle, der die Empfindlichkeit für diese Lichtsignale periodisch beeinflusst (Hicks et al., 2001). Es zeigt sich also, dass das in Abb. 1

dargestellte Modell eines circadianen Systems erweitert werden muss um Rückkopplungen zwischen Output und Oszillator, Oszillator und Input etc. Allgemein regulieren die Proteine LHY und CCA1 aus dem Oszillator viele Gene unter circadianer Kontrolle, wobei sie sowohl an sog. „morning“- als auch „evening“- Promotorelemente binden können und dort eine positive bzw. negative Regulierung ausüben. Diese beiden Proteine können also bewirken, dass die unterschiedlichsten Gene zu verschiedenen Tageszeiten exprimiert werden (Abb. 3).



**Abb. 3:** Übersicht über das circadiane System in *Arabidopsis*, aus (Devlin, 2002)

Das circadiane System in *Arabidopsis* ist also deutlich komplexer als in dem Einzeller *Synechococcus*. Es wurde zwar gezeigt, dass auch hier alle Komponenten der inneren Uhr in jeder Zelle vorhanden sind, indem z. B. verschiedene Teile eines Blattes auf unterschiedliche Licht - / Dunkel – Zyklen trainiert wurden und diese Rhythmen dann auch im Freilauf mehrere Tage unabhängig voneinander weiterliefen (Thain et al., 2000), jedoch ist es bei einer vielzelligen höheren Pflanze natürlich immer schwierig, Einflüsse durch z. B. Hormone, saisonale Bedingungen und Entwicklungsstadien (Blühinduktion etc.) auszuschließen.

## 1.2. *Chlamydomonas reinhardtii* als Modellsystem

Mit der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* steht ein sehr gut geeignetes Modell zur Verfügung, um die innere Uhr eines photoautotrophen Eukaryoten anhand eines einfacheren, einzelligen Organismus zu untersuchen. Es ist schon lange bekannt, dass auch in *Chlamydomonas* viele Prozesse circadian reguliert sind, z. B. die Zellteilung (Goto and Johnson, 1995), das Photoakkumulations-verhalten (Bruce, 1970), Chemotaxis und die *cab(Lhc)*-mRNA-Akkumulation (Jacobshagen and Johnson, 1994), (Hwang and Herrin, 1994). Diese Regulierung erfolgt sowohl transkriptionell als auch auf translationeller Ebene (Mittag, 2001). Außerdem gibt es erste Hinweise auf photoperiodische Steuerung z. B. der Keimungseffizienz von Zygosporien (Suzuki, 2001). Viele der in *Arabidopsis* untersuchten Phänomene finden sich also auch in *Chlamydomonas reinhardtii* wieder, könnten hier aber vielleicht einfacher aufgeklärt werden.

Die haploide Alge *Chlamydomonas reinhardtii* kann photoautotroph wachsen, d. h. sie betreibt Photosynthese wie höhere Pflanzen, kann aber auch Acetat als Kohlenstoffquelle nutzen. *Chlamydomonas* vermehrt sich unter normalen Bedingungen vegetativ, so dass Populationen mit gleicher genetischer Ausstattung gezogen werden können. Unter Stickstoffmangel differenzieren sich die Zoosporen zu Gameten, zwei haploide Zellen unterschiedlichen Paarungstyps verschmelzen zu einer diploiden Zygote, die nach der Meiose wieder 4 haploide Tochterzellen hervorbringt. Dies erlaubt das Kreuzen von Stämmen mit unterschiedlichen Eigenschaften und eine anschließende Analyse der Nachkommen mit Methoden der klassischen Genetik, wie zum



Beispiel der Tetradeanalyse (Harris, 1989). Molekularbiologische Arbeiten werden dadurch erleichtert, dass es eine Vielzahl von gut charakterisierten *Chlamydomonas* – Stämmen gibt und auch Systeme zur Transformation der Zellen etabliert sind.

Schon vor ca. 30 Jahren wurden auch Rhythmusmutanten gefunden: eine Kurzperiodik-Mutante mit einer Periodenlänge von ca. 18 h, die spontan entstanden ist (Mergenhagen, 1984) und mehrere Langperiodik-Mutanten (Bruce, 1972). Diese Verlängerung der Periodik ist auf die Wirkung mehrerer Gene zurückzuführen, da Kreuzungen zwischen diesen Mutanten und dem Wildtyp ein Spektrum an Periodenlängen zwischen Wildtyp und Mutantenperiode ergeben (Bruce, 1974).

Für die von Prof. Dr. D. Mergenhagen isolierte Kurzperiodik-Mutante konnte ganz klar gezeigt werden, dass der Unterschied von über 6 h in der Periodenlänge durch nur einen Genort verursacht wird, da eine Überprüfung vieler Hundert Nachkommen von Kreuzungen zwischen Wildtyp und Mutante mit Hilfe der Photoakkumulationsreaktion immer je zwei Nachkommen mit deutlicher Kurzperiodik und zwei Nachkommen mit Wildtyp-Periodik ergab.

Da in dieser Mutante wie z. B. auch bei *toc 1* in *Arabidopsis* direkt die Periodenlänge verändert ist, liegt sehr wahrscheinlich eine Mutation im Kernbereich der Uhr, dem Oszillator, vor. Mit ihrer Hilfe könnten also genetische Grundlagen des circadianen Systems in *Chlamydomonas reinhardtii* entschlüsselt werden.

Anders als in *Arabidopsis* wurden diese Mutanten nicht mit Hilfe eines Luziferase-Konstrukts gefunden, sondern schon ca. 20 Jahre zuvor anhand der Photoakkumulationsreaktion identifiziert. Unter Photoakkumulation versteht man die Ansammlung von Zellen in einem Lichtstrahl durch positive Phototaxis. Da *Chlamydomonas reinhardtii* dieses Verhalten nur während des subjektiven Tages zeigt, eignet sich dieser Parameter sehr gut für Untersuchungen der inneren Uhr dieser Grünalge. Die Messung erfolgt automatisch, indem Zellen, die in normalem Licht - / Dunkelrhythmus (12/12 L/D) in Minimalmedium angezogen wurden, in eine Küvette gegeben werden, die zwischen einer Lichtquelle und einer Photozelle positioniert wird. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wird alle 2 h ein Lichtpuls von 20 min Dauer

gegeben, ansonsten befinden sich die Zellen im Dauerdunkel. Schwimmen die Zellen während dieser 20 min ins Licht, wird die darunterliegende Photozelle verdunkelt, was automatisch aufgezeichnet wird. Da die Zellen nur während ihres subjektiven Tages dieses phototaktische Verhalten zeigen, während der subjektiven Nacht jedoch auch während des 20 min. Lichtpulses zufällig verteilt bleiben, kann die endogene Periodik der Algen an den Extinktionswerten der Photozelle abgelesen werden. Auf diese Weise wurden Hunderte von Stämmen auf ihre Periodenlänge hin getestet, außer diesen physiologischen Daten standen zu Beginn dieser Arbeit jedoch keinerlei Informationen über bekannte Sequenzbereiche oder molekulare Marker in Verbindung mit diesem Genort zur Verfügung.

### 1.3. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden

#### 1.3.1. Transformation

Es ist zwar durchaus möglich, in *Chlamydomonas reinhardtii* Rescue – Experimente mit der kompletten genomischen DNA durchzuführen, um so den für den phänotypischen Unterschied verantwortlichen Genort zu finden, da gut etablierte Methoden wie die Transformation mit glass beads (Kindle, 1990) zur Verfügung stehen. Dies wurde z. B. mit Hilfe einer genomischen Cosmid – Bank für eine argininbedürftige Mutante (*arg 7-8*) erfolgreich gezeigt (Purton and Rochaix, 1994). Unter  $3 \times 10^9$  transformierten Zellen fanden sich drei Klone, die eine funktionsfähige Kopie des Gens *arg 7* aufwiesen. Diese drei Klone konnten jedoch nur identifiziert werden, da durch die Argininbedürftigkeit der Mutanten eine einfache Selektion erfolgreich transformierter Stämme zur Verfügung stand. Die transformierten Zellen werden lediglich auf ein selektives Medium ohne Arginin gebracht, so dass nur solche Zellen zu Kolonien heranwachsen können, die das *arg 7* – Gen enthalten und somit wie Wildtyp – Zellen in der Lage sind, selbst Arginin zu synthetisieren.

Im Fall der hier untersuchten Periodenlängenmutante ist ein solches Vorgehen allerdings nicht möglich. Die Überprüfung der einzelnen Stämme auf erfolgreiche Transformation wäre nur durch die Photoakkumulationsreaktion möglich. Ein solcher Test erfordert jedoch drei Wochen Vorbereitung, dauert sieben Tage und ist jeweils nur für 36 Stämme gleichzeitig möglich. Es wird

also sehr schnell deutlich, dass eine wahllose Transformation mit der gesamten genomischen DNA hier nicht zum Erfolg führen kann.

Für eine Mutante mit paralysierten Flagellen wurde eine andere, für diese Untersuchung geeignetere Methode entwickelt (Diener et al., 1990). Es wurden Doppelmutanten erzeugt, die sowohl paralysierte Flagellen als auch eine Nitratreduktase – Defizienz aufwiesen. Diese wurden dann mit zwei Plasmiden gleichzeitig transformiert, die zum einen das Gen für Nitratreduktase und zum anderen das RSP 3 – Gen, das die Funktion der Flagellen wiederherstellen kann, enthielten. Die transformierten Zellen wurden zunächst auf einem Medium mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle selektiert. Dadurch konnte die Zahl der zu überprüfenden Stämme bereits von  $1 \times 10^9$  auf 21 reduziert werden. Die hier gewachsenen Kolonien wurden anschließend mikroskopisch auf intakte Flagellen untersucht und es wurden 14 Stämme gefunden, die beide Plasmide enthielten und wieder normale Flagellen aufwiesen. Durch diese „Vorselektion“ kann man also die Anzahl der genauer zu untersuchenden Stämme auf ein auch für die Photoakkumulationsreaktion durchführbares Maß reduzieren.

### 1.3.2. Screening einer BAC - Bibliothek

Da hier aber nach einem noch unbekannten Gen gesucht wird, steht noch kein Plasmid für die Cotransformation mit der Nitratreduktase zur Verfügung. Eine mögliche Alternative sind BAC (Bacterial Artificial Chromosome) – Klone. Sowohl BAC- als auch YAC-Klone wurden in verschiedenen Organismen schon erfolgreich für Rescue-Experimente eingesetzt. Für *Chlamydomonas reinhardtii* ist bereits ein System für die positionelle Klonierung mit Hilfe von YACs publiziert (Vashishtha et al., 1996). Außerdem ist für *Chlamydomonas reinhardtii* eine BAC – Bibliothek kommerziell erhältlich. Es sollte also möglich sein, das gesuchte Gen *Uhr 1* durch Transformationen mit geeigneten BAC-Klonen zu finden und zu klonieren. Die BAC - Bibliothek besteht aus ca. 15.000 Klonen, die Stücke von genomischer DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* in einer Größe zwischen ca. 50 und 120 kbp enthalten. Das gesamte Genom ist etwa achtfach in der Bibliothek vertreten. Die einzelnen einklonierten Fragmente entstanden durch einen partiellen *Hind* III – Verdau der genomischen DNA. Somit sollte jedes Gen statistisch gesehen in acht Klonen verschiedener Länge auftauchen. Alle Klone sind als High density

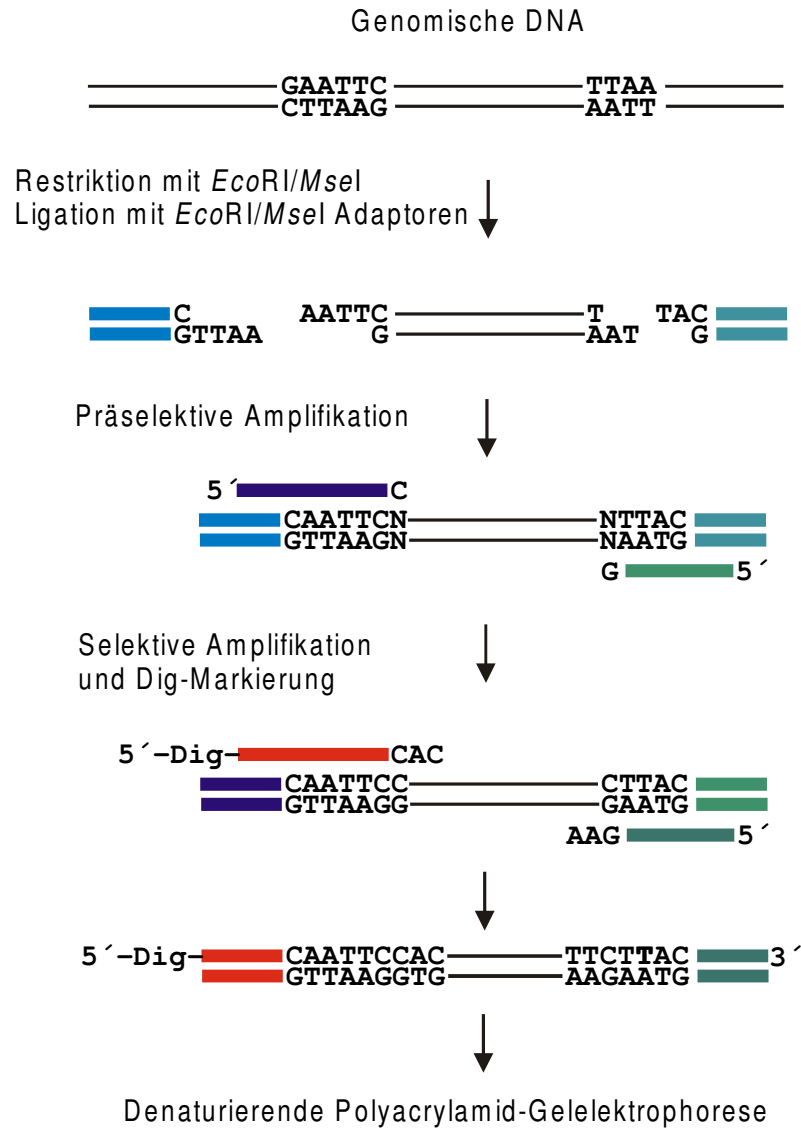
Makroarray auf einer Nylonmembran in einem bestimmten Muster aufgetragen, so dass durch das Durchmustern der Membran mit Hybridisierungs-sonden Klone mit ganz bestimmten Sequenzbereichen identifiziert werden können. Wie oben erwähnt, waren zu Beginn dieser Arbeit aber keine Sequenzen bekannt, die die Herstellung solcher Hybridisierungssonden erlaubt hätten.

### 1.3.3. AFLP - Analyse

Die Methode der Wahl zur Generierung geeigneter molekularer Marker bei einem klar einzuordnenden Phänotyp, aber ohne Sequenzinformationen, ist die AFLP-Analyse. Diese ermöglicht die Identifizierung unterschiedlicher genomischer Bereiche durch Erzeugung eines jeweils typischen Bandenmusters von amplifizierten Restriktionsfragmenten.

AFLPs wurden erstmals von Pieter Vos et al. (Vos et al., 1995) als neue Methode zum DNA-Fingerprinting beschrieben. Das Verfahren vereint die Vorteile von RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) mit der hohen Sensitivität von PCR-Reaktionen, und es werden vorab keinerlei Sequenzinformationen benötigt, da die polymorphen Fragmente direkt in einer PCR markiert werden können. Es wurde bereits erfolgreich z. B. in *Sorghum* (Klein et al., 2000), Gerste (Wei et al., 1999) und in unserem Labor in *Chlamydomonas* (Werner, 2001) angewendet. Das Prinzip beruht darauf, wie bei der RFLP-Methode die unbekannte DNA mit Restriktionsenzymen in viele Fragmente zu zerlegen und diese in einem Gel der Größe nach aufzutrennen. Anders als bei RFLPs werden die Restriktionsfragmente jedoch noch in zwei PCR-Reaktionen amplifiziert und dabei direkt markiert. Dies wird dadurch ermöglicht, dass an die überhängenden Enden der Restriktionsschnittstellen Adapter mit bekannter Sequenz ligiert werden, die als Primer für die PCR fungieren (Abb. 4). Man verwendet ein häufig schneidendes Enzym (z.B. *Mse* I), um kleine, gut amplifizierbare Fragmente zu erhalten, und ein selten schneidendes Enzym (z.B. *Eco* RI), um die Anzahl der amplifizierten Fragmente gering zu halten. Dies ist der Fall, da nur Fragmente mit zwei unterschiedlichen Schnittstellen effektiv amplifiziert werden. Fragmente mit gleichen Adaptern bilden Haarnadelstrukturen aus, da die Adapter spiegelbildliche Wiederholungen enthalten. Diese Strukturen werden in einer PCR-Reaktion nicht oder nur sehr selten amplifiziert, da die Primer nicht

binden können. Die Amplifikation erfolgt in 2 Schritten, der präselektiven Amplifikation, in der Fragmente mit zwei unterschiedlichen Adaptoren vermehrt werden, und der selektiven Amplifikation, in der die Fragmente markiert werden und ihre Anzahl reduziert wird.



AFLP is a trademark of and is licensed by Keygene n.v.

**Abb.4: Schematische Übersicht über die AFLP-Methode**

Diese Reduzierung der Anzahl der Banden erfolgt durch die Verwendung eines Primers mit 3'-überhängenden Basen. Durch jede zusätzliche Base, die in das Insert hineinragt, wird die Bandenzahl um den Faktor 4 kleiner, da nur Fragmente amplifiziert werden, die an erster Position zufällig die jeweilige komplementäre Base tragen.

Um die Fragmente sichtbar zu machen, wird einer der Primer, meist der auf der Seite des selten schneidenden Enzyms, markiert. Diese Markierung kann radioaktiv oder z. B. mit Digoxigenin erfolgen. Es ist also vorab keinerlei Sequenzinformation wie für die Sondenherstellung in RFLP-Analysen notwendig. Die Fragmente werden in Polyacrylamidgelen nach ihrer Größe aufgetrennt und direkt auf eine geladene Nylonmembran übertragen. Diese wird nach Detektion zum Belichten eines Röntgenfilms verwendet, auf dem die manuelle Auswertung stattfindet.

Für die manuelle Auswertung der durch die AFLP-Methode entstehenden Bandenmuster ist entscheidend, dass der Periodentyp der Kreuzungsnachkommen schon bekannt ist, z. B. aus der Photoakkumulationsreaktion. Dadurch ist es möglich, die Proben schon vor dem Auftragen auf das Gel nach ihrer Periodenlänge zu sortieren.

Da nur hoch gekoppelte Marker interessieren, müssen diejenigen Banden gefunden werden, die in allen Proben auf einer Hälfte des Gels auftreten, in der anderen Hälfte jedoch fehlen. So identifizierte AFLP-Marker können dann aus den direct blotting-Membranen ausgeschnitten, kloniert und sequenziert werden (Werner et al., 2001). Aus diesen Sequenzen lassen sich STS (sequence tagged site) - und CAPS (cleaved amplified polymorphic site) - Marker herstellen, die ein weniger zeitaufwändiges Durchmustern vieler Proben mittels PCR bzw. PCR und anschließender Restriktion erlauben. So können Daten über Rekombinationshäufigkeiten zwischen den Markern und dem gesuchten Gen gewonnen werden. Außerdem lassen sich diese Marker nach Markierung in einer PCR – Reaktion für das Durchmustern der BAC – Bibliothek nutzen. Somit können BAC – Klone identifiziert werden, die für Transformationen von Kurzperiodikstämmen zur Wiederherstellung der Wildtyp – Periodenlänge geeignet wären, was letztlich zu einer Klonierung des Gens *Uhr 1* führen könnte.

## 1.4. Ziele dieser Arbeit

Mit dieser Arbeit sollten durch die Kartierung des Periodik – Gens *Uhr 1* die Voraussetzung für eine spätere Klonierung und Charakterisierung des Gens geschaffen werden.

Dafür sollte folgende Strategie verfolgt werden:

- Durch eine AFLP - Analyse von Kreuzungsnachkommen zwischen einem Normal- und Kurzperiodikstamm sollten zunächst AFLP - Marker für das gesuchte Gen identifiziert werden.
- Um festzustellen, wie eng diese Marker an das Gen gekoppelt sind, mussten viele Nachkommen auf das Vorhandensein dieser Marker getestet werden. Für ein Hochdurchsatz - Screening sollten deshalb entsprechende AFLP - Marker in STS (sequence tagged site)- oder CAPS-(cleaved amplified polymorphic site) Marker umgewandelt werden.
- Marker, die nahe genug am Gen liegen, sollten dann für das Durchmustern einer BAC-Bibliothek verwendet werden.
- Aus den so gefundenen Klonen sollten Contigs erstellt werden, auf denen die Marker und das gesuchte Gen in einer bestimmten Reihenfolge angeordnet werden können.
- Anhand dieser Marker sollte das Gen auf einem Chromosom kartiert werden.
- Es sollten Vorbereitungen für eine Transformation von *Chlamydomonas reinhardtii* mit BACs getroffen werden, indem je ein transformierbarer, mit einem selektiven Marker ausgestatteter Kurzperiodik - und Normalperiodik - Stamm erzeugt wurde.
- Erste BAC-Klone sollten auf mögliche Kandidatengene hin überprüft werden.

Diese Vorgehensweise ist nur möglich, da in den letzten Jahrzehnten bereits umfangreiche physiologische Untersuchungen an Kreuzungsnachkommen zwischen Wildtyp und Kurzperiodikmutante durchgeführt wurden. Dadurch stehen bereits Kreuzungsnachkommen für die AFLP – Analyse zur Verfügung, deren Periodentyp durch die Photoakkumulationsreaktion charakterisiert ist.

Schwierigkeiten ergeben sich dadurch, dass viele der geplanten molekularbiologischen Untersuchungen zunächst in *Chlamydomonas reinhardtii* etabliert werden müssen. Dies ist aufgrund des außergewöhnlich hohen GC – Gehalts des *Chlamydomonas reinhardtii* – Genoms nicht trivial. Außerdem müssen für eine statistisch sichere Analyse des Kopplungsgrades zwischen gefundenen Markern und dem gesuchten Gen sehr viele Kreuzungsnachkommen überprüft werden. Es müssen also Möglichkeiten gefunden werden, diese Analysen mit möglichst geringem Zeitaufwand durchzuführen.

Es soll des weiteren versucht werden, in allen Methoden auf die Verwendung radioaktiver Markierungen zu verzichten und statt dessen mit einer Markierung durch Digoxigenin zu arbeiten. Auch hierfür müssen einige Standardprotokolle angepaßt werden.

Die Kartierung des Periodik – Gens *Uhr 1* und die Vorbereitungen zu seiner Klonierung soll zur Aufklärung des circadianen Systems der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beitragen. Mit Hilfe dieses einfachen Modells ist es dann vielleicht auch möglich, noch offene Fragen in komplexeren Systemen wie *Arabidopsis* zu klären.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Organismen

#### 2.1.1. Chlamydomonas - Stämme

**wt<sup>+</sup>** : Wildtyp; Stamm 137c, erhalten von P. Levine, The Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge; der Stamm wird seit 1975 im Labor von Prof. Dr. D. Mergenhagen kultiviert.

**9.2.3<sup>-</sup>** : Kurzperiodik - Stamm, hervorgegangen aus einer Kreuzung von wt<sup>+</sup> und der spontan entstandenen Kurzperiodik - Mutante s<sup>-</sup>

**Kreuzungsnachkommen:** Tochterzellen aus 2 Kreuzungen von wt<sup>+</sup> und

9.2.3<sup>-</sup> ; Bezeichnung: 102.x.x, 103.x.x

**cc 503:** Zellwandloser Stamm aus dem Chlamydomonas Genetics Center

**cc 2678<sup>+</sup>:** cw15 nit1-305 sr1 mt<sup>+</sup> - Stamm für Transformationsexperimente aus dem Chlamydomonas Genetics Center

#### 2.1.2. Bakterienstämme

**TOP10F<sup>'</sup>:** Für die Klonierung von PCR-Produkten wurden kompetente *Escherichia coli* –Zellen des Stamms TOP10F<sup>'</sup> der Firma Invitrogen verwendet.

Eigenschaften:

F<sup>'</sup> *lacI*<sub>q</sub> Tn10 (Tet<sup>R</sup>) *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*M15 *lac74*  
*recA1*

*deoR* *araD*139 (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*

**DH 5α:** Für die Klonierung von BAC-Enden etc. wurden nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990) kompetente *E. coli* – Zellen des Stammes DH 5α hergestellt.

Eigenschaften:

F– *f80dlacZ.M15* .(*lacZYA-argF*)U169 *endA1* *recA1* *hsdR17*(r– m +) *deoR* *thi-1*  
*phoA* *supE44* .–*gyrA96* *relA1*

**DH10b:** Klone der Firma Incyte Genetics mit *Hind* III – Fragmenten des *C. reinhardtii* – Stamms cc 503 im Vektor pBeloBACmn

Eigenschaften:

*F– mcrA .(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80dlacZ.M15 .lacX74 endA1 recA1 deoR .(ara, leu)7697 araD139 gal U gal K nupG rps L .–*

## 2.2. Nährmedien

### 2.2.1. TAP - Medium (Gorman and Levine, 1965)

2,42 g Tris  
 1 ml Spurenelemente-Lösung nach Hutner (1950) (in Harris; 1989)  
 1 ml Eisessig  
 1 ml Phosphatlösung (93,5 g  $K_2HPO_4$  ; 63,0 g  $KH_2PO_4$  ; ad 1 l ddH<sub>2</sub>O)  
 50 ml Beyerinck-Lsg. (150 mM  $NH_4Cl$ ; 8 mM  $MgSO_4$ ; 7 mM  $CaCl_2$ )  
 ad 1 l ddH<sub>2</sub>O; pH 7,0

Flüssigkulturen:

jew. 100 ml in 500 ml-Schikanekolben mit Schaumkappe autoklaviert;  
 für Plattenkulturen wurden dem Medium 1,5 % Agar (Difco) zugefügt.

### 2.2.2. HSM – Medium (Sueoka, 1960)

0,5 g  $NH_4Cl$   
 0,02 g  $MgSO_4 \times 7 H_2O$   
 0,01 g  $CaCl_2 \times 2 H_2O$   
 1,44 g  $K_2HPO_4$   
 0,72 g  $KH_2PO_4$   
 1 ml Spurenelemente-Lsg. nach Hutner (Hutner et al., 1950)  
 ad 1 l ddH<sub>2</sub>O; pH 6,8

Flüssigkulturen Stamm cc 503:

jew. 100 ml in 500 ml-Kolben ohne Schikane mit Schaumkappe autoklaviert

### 2.2.3. Vollmedium (VM)

675 ml ddH<sub>2</sub>O  
 37,5 ml Beyerinck-Lsg.  
 0,75 ml Spurenelemente-Lsg. nach Hutner  
 11,25 g Agar  
 0,75 g Yeast Extract  
 1,5 g Natriumacetat  
 autoklaviert;

37,5 ml      Phosphatpuffer getrennt autoklaviert;  
Phosphatpuffer: 14,34 g  $K_2HPO_4$  ; 7,26 g  $KH_2PO_4$  ad 1 l ddH<sub>2</sub>O

2.2.4.      Sager- Granick – Medium (Sager, Granick; 1953)

3,76 g       $NaH_2PO_4$   
1,15 g       $K_2HPO_4$   
2 g      Natriumacetat  
10 ml      Spurenelemente nach Sager – Granick  
10 ml      0,1%  $FeCl_3$   
10 ml      0,4%  $CaCl_2 \times 2 H_2O$   
10 ml      3%  $MgSO_4 \times 7 H_2O$   
950 ml      ddH<sub>2</sub>O

Anzuchtmedium SG-NH<sub>4</sub>:      + 10 ml 3%  $NH_4NO_3$

Selektionsmedium SG-NO<sub>3</sub>:      + 10 ml 3%  $KNO_3$

für Selektionsplatten wurde 2% gewaschener Agar verwendet

2.2.5.      Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook et al., 1989)

10 g      Bacto-Trypton  
5 g      Hefeextrakt  
10 g      NaCl  
ad 1l ddH<sub>2</sub>O; pH 7,0  
autoklaviert

2.2.6.      2xYT – Medium (Sambrook and Russell, 2001)

12 g      Trypton  
10 g      Hefeextrakt  
5 g      NaCl  
ad 1 l ddH<sub>2</sub>O; pH 7,0  
autoklaviert

### 2.3. Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), Fluka (Schweiz), Roth (Karlsruhe) oder Roche (Mannheim) bezogen. Restriktionsenzyme der Firmen Roche und Gibco (Eggenstein) wurden jeweils nach Vorschrift der Hersteller verwendet. Für Standard-PCR-Reaktionen wurde Taq-Polymerase der Firma Gibco benutzt.

### 2.4. Algenanzucht

#### 2.4.1. Kreuzungsnachkommen

Die Algenstämme wurden 2-3 Wochen auf TAP-Platten in einem Kulturschrank bei 22 °C und L/D 12/12 vermehrt.

Sobald die Platten dicht bewachsen waren, wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse eine Flüssigkultur (100 ml TAP-Medium) angeimpft. Diese Kulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 23 °C, L/D 12/12 und 120 rpm für weitere 5-8 Tage inkubiert.

Die Kulturen wurden abgeerntet, sobald sie eine sattgrüne Färbung angenommen hatten.

- Kultur aus dem Erlenmeyer-Kolben in zwei 50ml-Falcon Röhrchen aufteilen
- Zentrifugieren: 5 min, 5.000 U in Tischzentrifuge
- Überstand (Medium) abgießen
- Niederschlag in 1 ml TEN-Puffer resuspendieren und in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugieren: 2 min, 13.000 U in Tischzentrifuge
- Überstand (TEN-Puffer) abnehmen
- Niederschlag in 1 ml TEN-Puffer resuspendieren
- Zentrifugieren: 2 min, 13.000 U in Tischzentrifuge
- Überstand (TEN-Puffer) abnehmen
- Bei -70°C einfrieren bis zur DNA-Präparation

TEN-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 150 mM NaCl

#### 2.4.2. Stamm cc 503

Stamm cc 503 ist eine Mutante mit Zellwanddefekt, so dass Anzucht- und Erntebedingungen angepaßt werden mußten.

Dieser Stamm wurde mind. 3 Wochen auf TAP-Platten bei Tageslicht ohne direkte Sonneneinstrahlung und Raumtemperatur angezogen.

Sobald die Platten dicht bewachsen waren, wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse eine Flüssigkultur (100 ml HSM-Medium, Kolben ohne Schikane) angeimpft. Diese Kulturen wurden auf einem Schüttler bei Tageslicht ohne direkte Sonneneinstrahlung und Raumtemperatur weitere 10-14 Tage inkubiert.

Die Kulturen wurden abgeerntet, sobald sie eine sattgrüne Färbung angenommen hatten.

- Kultur aus dem Erlenmeyer-Kolben in zwei 50ml-Falcon Röhrchen aufteilen
- Zentrifugieren: 10 min, 1.000 U in Tischzentrifuge
- Überstand (Medium) abgießen
- Niederschlag in 1 ml TEN-Puffer durch Schwenken resuspendieren und in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugieren: 10 min, 2500 U in Tischzentrifuge
- Überstand (TEN-Puffer) abnehmen
- Niederschlag in 1 ml TEN-Puffer durch Schwenken resuspendieren
- Zentrifugieren: 10 min, 2500 U in Tischzentrifuge
- Überstand (TEN-Puffer) abnehmen
- Bei  $-70^{\circ}\text{C}$  einfrieren bis zur DNA-Präparation

### 2.5. Kreuzungen für Transformationsexperimente

Um gefundene Kandidatengene überprüfen zu können, werden Stämme gebraucht, die transformierbar sind und sowohl einen Selektionsmarker als auch Kurzperiodik aufweisen. Zur Transformation eignet sich der zellwanddefekte Stamm cc 2678<sup>+</sup>nit, der mit dem Kurzperiodikstamm 9.2.3 <sup>sp</sup> gekreuzt wurde. Durch den Zellwanddefekt wird zwar das Einbringen fremder

DNA erleichtert, die Zellen sind jedoch auch wesentlich empfindlicher gegenüber mechanischer Belastung. Es zeigte sich, dass weder Zygoten noch vegetative Zellen ein Verschieben auf Agarplatten in genügend großer Zahl überstanden. Aus diesem Grund mußte das Standard-Kreuzungsprotokoll nach Hudock (Hudock, 1967) wie folgt angepaßt werden:

#### 2.5.1. Kreuzung und Anreicherung der Zygoten

Die Zellen der Elternstämme wurden wie üblich auf VM-Agarplatten in L/D 12/12 bei 21°C ca. 3-4 Wochen vorgezogen und die dicht bewachsenen Platten mit 10 ml Phosphatpuffer abgeschwemmt. Um die zur Kreuzung fähigen begeißelten Zellen von defekten Zellen zu trennen, wurde die Zellsuspension im Reagenzglas unter eine Lichtquelle gestellt, so dass die begeißelten Zellen nach oben in Richtung Licht schwimmen. Nach 2 h wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, die Zellzahl der Suspension bestimmt und durch Verdünnung mit Phosphatpuffer auf ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

Je 10 ml Suspension der Elternstämme wurden zur Kreuzung in ein 25 ml Becherglas gegeben, das von oben mit Alufolie abgedunkelt und auf eine Lichtquelle gestellt wurde. Dies soll einer Konzentration der Zygoten in einer sogenannten „Zygotenhaut“ auf der Wasseroberfläche dienen, da die Zygoten nach oben treiben und noch begeißelte, nicht gekreuzte Zellen zur Lichtquelle nach unten schwimmen. Die oberen 3 ml dieses Kreuzungsansatzes wurden mit einer abgeschnittenen 1 ml-Pipettenspitze vorsichtig abgenommen und in ein neues Becherglas überführt. Von dieser Suspension wurden der Prozentsatz an Zygoten und die Zellzahl mikroskopisch bestimmt.

Da das sonst übliche Vereinzeln der Zygoten und vor allem der Nachkommen auf Agarplatten sich als zu belastend für die zellwanddefekten Stämme herausgestellt hatte, wurden zwei neue Methoden zur Separation der Zygoten und Nachkommen getestet:

#### 2.5.2. Ausplattieren

Die Zygotensuspension wurde auf ca. 50 bzw. 100 Zellen/200 µl verdünnt und von beiden Verdünnungen wurden je 4 1,5% Agar-Vollmedium – Platten angelegt, indem die 200 µl Suspension sehr vorsichtig mit einem dünnen Drigalskyspatel verteilt wurden. Diese Platten wurden bei 22°C und Dauerlicht über Nacht inkubiert und dann für 5 Tage in Dauerdunkel gestellt. Danach

wurden unter dem Binokular Zellen auf den Platten markiert, die nach Größe, Aussehen und Festsitzen im Agar Zygoten sein könnten.

Nach ca. einer Woche hatten sich aus diesen Zellen Kolonien gebildet, die einzeln mit einer Pipette und etwas Phosphatpuffer abgeschwemmt und in 2 ml - Reaktionsgefäße überführt wurden, die jew. 200 µl Phosphatpuffer enthielten. Diese Suspension wurde sehr vorsichtig auf VM-Agarplatten ausplattiert, inkubiert und jew. 16 der entstandenen Kolonien mithilfe eines PCR-Tests auf ihren Paarungstyp hin untersucht. Kamen beide Paarungstypen bei Nachkommen einer Ursprungszelle vor, wurden diese Kolonien weiter angezogen.

#### 2.5.3. Verschieben im Raster

Für diesen Versuch wurden auf die Unterseite von Petrischalen mit 1,5 % VM-Agar Raster mit ca. 1 cm<sup>2</sup> aufgezeichnet und ober- und unterhalb des Rasters in einer Linie etwas Zygotensuspension aufgetragen. Diese Platten wurden ebenfalls über Nacht in Dauerlicht und anschließend in Dauerdunkel inkubiert. Unter dem Binokular wurden mögliche Zygoten in die Kästchen des Rasters geschoben und die Platten zum Auskeimen dieser Zygoten für 16 h ins Licht gestellt. Die vier bzw. 8 Nachkommen einer Zygote wurden innerhalb des Kästchens auseinandergeschoben und die Platten für 14 Tage inkubiert. Die dann entstandenen Kolonien wurden auf 1,5 % VM-Platten weiter vermehrt.

Phosphatpuffer: siehe Vollmedium, 1:20 verd.

#### 2.5.4. Bedürftigkeitstest

Da die Überprüfung von Kreuzungsnachkommen auf ihren Periodentyp recht zeitaufwändig ist, wurden die Nachkommen zunächst auf das Vorhandensein des Selektionsmarkers, der Bedürftigkeit für Ammonium, getestet.

Hierzu wurde etwas Zellmaterial zuerst auf Agarplatten mit Sager-Granick-Medium SG-NO<sub>3</sub> (selektiv) und dann auf SG-NH<sub>4</sub> – Medium (zur Anzucht) aufgetragen. Die Platten wurden für 6 Wochen inkubiert und dann ausgewertet.

## 2.6. Nukleinsäure-Isolierung

### 2.6.1. Algen-DNA-Präparation nach Newman et al. (Newman et al., 1990)

es wurden jeweils die Zellen aus 50 ml Kultur aufgearbeitet.

- Zellen mit Filterspitzen in 150 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendieren
- 300 µl SDS-EB-Puffer dazugeben
- vortexen
- Extraktion:
  - Jew. 200 µl Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) dazugeben
  - 3 min vortexen, 5 min zentrifugieren
  - Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen
  - Insgesamt 3 x extrahieren, oder bis Interphase (weiß) dünn genug ist
  - Einmal mit 400 µl Chloroform extrahieren
- Überstand in 2 ml Reaktionsgefäß überführen
- Mit doppelter Menge eiskaltem EtOH absolut versetzen
- Auf Eis stellen, 30 min fällen
- Zentrifugieren: 10 min, 13.000 U
- Überstand abpipettieren
- 150 µl 70% EtOH auf Niederschlag geben
- Zentrifugieren: 10 min, 13.000 U
- Überstand abpipettieren
- Niederschlag im Heizblock bei 37°C trocknen
- Niederschlag in 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendieren

Bei - 20°C einfrieren bis zur weiteren Benutzung

SDS-EB-Puffer:

2% SDS, 400 mM NaCl, 40 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0

### 2.6.2. PeqLab E.Z.N.A. Plant DNA Kit, Protokoll angepaßt

Für die DNA-Präparation mit dem PeqLab Kit wurden eingefrorene Algenpellets in 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Für den Zellaufschluß wurden nicht der im Kit enthaltene Puffer P1 und β-Mercaptoethanol verwendet, sondern 300 µl SDS-EB Puffer. Nach gründlichem Durchmischen wurden 140 µl Puffer 2 zugegeben, wieder gemischt und für 10 min bei 10.000



g und 23°C zentrifugiert. Ca. 500 µl Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 350 µl Isopropanol (RT) versetzt. Ab diesem Schritt erfolgte die Präparation wie im Kit beschrieben.

### 2.6.3. BAC- DNA Präparation

#### 2.6.3.1. Miniprep

Die Präparation geringer Mengen an Bacterial Artificial Chromosome (BAC) – DNA erfolgte nach einem Protokoll von Frau Dr. Pushpa Kathir (Univ. of Minnesota, USA; pers. Mitt.).

1,5 ml einer 2xYT- Übernachtskultur wurden in einem Reaktionsgefäß für 1 min bei 10.000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 150 µl eiskalter Solution 1 resuspendiert, dann wurden 150 µl Solution 2 zugegeben und durch Wenden des Gefäßes gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 150 µl eiskalter Solution 3 zugegeben, wieder sanft gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellreste etc. wurden durch 10 min Zentrifugation bei 10.000 g abgetrennt, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µl absolutem Ethanol (RT) gründlich vermischt. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei –20°C wurde die DNA bei 10.000 g für 10 min abzentrifugiert, das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 17 µl sterilem dd H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Sol.1: 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; 25 ml 1M Tris pH 8,0;  
55 ml ddH<sub>2</sub>O; 9,01g Glukose

Sol. 2: 7,6 ml ddH<sub>2</sub>O; 400 µl 10 N NaOH; 2 ml 10 % SDS

Sol. 3: 6 ml 5M KAc; 1,15 ml Eisessig; 2,85 ml ddH<sub>2</sub>O

#### 3.6.3.1. Maxiprep

Um größere Mengen an BAC-DNA zu gewinnen, wurden je 500 ml einer 2xYT-Übernachtskultur nach einem leicht abgeänderten Protokoll von Genome Systems aufgearbeitet.

Dazu wurden 500 ml 2xYT-Medium mit 2 ml einer Vorkultur beimpft und bei 37°C für ca. 16-18 h inkubiert. Das Ernten erfolgte bei 4°C durch 15 min Zentrifugation bei 12.000 g. Das Bakterienpellet wurde auf Eis in 20 ml 10 mM EDTA pH 8 resuspendiert, bei Raumtemperatur mit 40 ml frisch angesetzter,

eiskalter Sol. II versetzt, leicht geschwenkt und 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 30 ml Sol. III wurde der Ansatz für 15 min auf Eis gestellt. Es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte von je 15 min bei 4°C und 12.000 g, wobei der Überstand aus dem ersten Schritt in ein neues Gefäß überführt wurde. Der zweite Überstand wurde mit 45 ml Isopropanol versetzt, geschüttelt und bei 4.000 g und 4°C für weitere 15 min zentrifugiert. Der hierbei entstandene Niederschlag wurde in 8.8 ml ddH<sub>2</sub>O durch Schwenken resuspendiert, in ein Falcon-Gefäß überführt, mit 6,75 ml 5M KAc versetzt und für 30 min oder über Nacht bei –70°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde in einer Tischzentrifuge für 10 min bei 5000 U zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß mit 26 ml absolutem Ethanol gefüllt und gut durchmischt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 5000 U und 4°C. Der Niederschlag wurde in 700 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und in einigen Fällen für 10 min bei 37°C mit RNase A inkubiert. Zur Aufreinigung wurde zweimal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert, wobei das Durchmischen der Phasen nicht durch Vortexen, sondern durch 5 min Kreisen auf einem Drehteller erzielt wurde, um Beschädigungen der BAC-DNA zu vermeiden. Die letzte Fällung erfolgte mit 700 µl Isopropanol und 70 µl 3M NaAc bei Raumtemperatur, das Pellet wurde einmal mit 70 % EtOH gewaschen und in 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Sol. II: 44 ml ddH<sub>2</sub>O, 1 ml 10 N NaOH, 5 ml 10% SDS

Sol. III: 75 ml 5 M KAc, 23 ml Eisessig, 102 ml ddH<sub>2</sub>O

#### 4.6.3.1. Kits

Da die Präparation von BAC – Plasmid – DNA in größeren Mengen mit der oben beschriebenen Methode sowohl sehr zeit- als auch materialaufwändig ist, wurden auch Kits verschiedener Firmen getestet, mit denen sich die Plasmid –DNA innerhalb weniger Stunden gewinnen lassen soll. Folgende Kits wurden jeweils nach Vorschrift der Hersteller verwendet: Nucleobond BAC 100 (Macherey & Nagel), GenElute BAC Purification (Sigma) und Large Construct (Qiagen).

#### 2.6.4. Plasmid-DNA

Plasmid-DNA von Bakterientransformationsexperimenten wurde mit dem PerfectPrep Plasmid Mini Kit der Firma Eppendorf (Hamburg) laut Vorschrift isoliert.

### 2.7. Gelelektrophorese

#### 2.7.1. Agarosegelelektrophorese

##### 5.6.3.1. TBE-Agarosegele

Agarosegele mit 1-2% Agarose in 1xTBE-Puffer wurden verwendet für die Überprüfung von PCR-Produkten, Standardrestriktionen und zur Mengenabschätzung und Größenbestimmung nach Nukleinsäurepräparationen.

Die Abschätzung der gewonnenen DNA-Menge erfolgte durch Visualisierung in einem 1%-igen Agarose-Gel. Speziell bei den Kreuzungsnachkommen wurden hierzu 5 µl der DNA-Lösung mit 1 µl RNase A (Roche, 10 mg/ml) verdaut (10 min bei 37 °C) und mit 1 µl Probenpuffer (LBIII) auf das Gel aufgetragen. Zum Mengen- und Größenvergleich wurden auch 500 ng *λ-Eco-Hind*-Marker (MBI Fermentas) aufgetragen. Die Gele liefen bei 90 – 140 V in 1xTBE-Puffer und wurden erst nach dem Lauf in Ethidiumbromidlösung (3mg / ml) für ca. 15 min. gefärbt und dann unter UV-Licht fotografiert.

Probenpuffer LBIII (Sambrook et al., 1989):

30%	Glyzerin
0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylencyanol
in ddH <sub>2</sub> O	

10xTBE Stammlösung:

500 mM	Tris
500 mM	Borsäure
1 mM	EDTA

#### 6.6.3.1. TAE-Agarosegele

Für die Auftrennung der zum Teil weit über 15.000 bp großen Restriktionsfragmente von BAC-Plasmiden wurden TAE-Agarosegele mit einer Stärke von 0.6% verwendet, da sich hier schärfere Banden ergaben als in TBE-Gelen. Diese Gele liefen in 1xTAE-Puffer bei 100 V / cm<sup>2</sup>. Bei Laufzeiten über 3 Stunden wurde der Puffer zeitweise von Hand durchmischt.

50xTAE Stammlösung:

121 g	TRIS
28,6 ml	Eisessig
50 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad 500 ml	

#### 2.7.2. Acrylamid-Gelelektrophorese für AFLPs

Die amplifizierten Restriktionsfragmente wurden auf 4-6%-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und während des Gellaufs direkt auf eine positiv geladene Nylonmembran (GATC) übertragen. Dabei wurden die Proben nach ihrem aus der Photoakkumulationsreaktion bekannten Periodentyp sortiert. Dies erleichtert die manuelle Erkennung der Marker erheblich.

Die Polyacrylamidgele wurden laut Vorschrift der Firma GATC gegossen.

Für ein Gel von ca. 18 cm x 30 cm wurden 30 ml Gellösung aus Harnstofflösung und Acrylamidlösung angesetzt, durch einen Faltenfilter filtriert und ca. 5 min entgast. Erst dann wurden APS und TEMED zugegeben, um die Polymerisation zu starten, und die Gele wurden schnellstmöglich gegossen, indem die Gellösung mit einer Spritze auf eine Glasplatte gegeben wurde, während eine zweite Glasplatte darübergeschoben wurde. Die Dicke dieser Gele betrug 0,19 mm.

Die Gelelektrophorese erfolgte mit folgenden Parametern:

Ein Vorlauf von 30 min bei 1600 V diente zur Erwärmung des Gels, dann wurden die Proben aufgetragen. Ein Probeneinlauf bei 500 V für 15 min sorgte für ein gleichmäßiges Einlaufen der Proben, die eigentliche Elektrophorese erfolgte dann bei 1800 V für ca. 6,5 h.

4%ige Gele:

24 ml Harnstofflsg.

6 ml Acrylamidlsg.

Harnstofflösung:

84 g Harnstoff

18,7 g 10x TBE

73,4 g ddH<sub>2</sub>O

6%ige Gele:

24 ml Harnstofflsg.

6 ml Acrylamidlsg.

Harnstofflösung:

84 g Harnstoff

18,7 g 10x TBE

61,6 g ddH<sub>2</sub>O

bei ca. 50° C unter Rühren lösen bei ca. 50° C unter Rühren lösen

Die Polymerisation erfolgte immer mit 114,5 µl 10% Ammoniumpersulfatlsg. und 25,5 µl TEMED.

10x TBE-GATC-Puffer:

154,5 g TRIS

26,2 g Borsäure

9 g Na<sub>2</sub>EDTA

810 g ddH<sub>2</sub>O

Für die Elektrophorese wurden jeweils 130 ml des 10x Puffers mit 1170 ml ddH<sub>2</sub>O verdünnt und entgast.

Übertragung auf die Nylonmembran:

Sobald die DNA-Fragmente das gesamte Gel durchlaufen hatten, wurden sie automatisch auf eine 30 – 55 cm lange Nylonmembran übertragen, die mit Hilfe eines Schrittmotors mit 12 cm/h unter der Gelkante entlanggezogen wurde.

## 2.8. AFLP-Analyse der Kreuzungsnachkommen

Unterschiede auf molekularer Ebene zwischen Wildtyp- und Kurzperiodik-Stämmen wurden mit Hilfe von AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms, (Vos et al., 1995); (Werner, 2001)) gefunden.

### 2.8.1. Restriktion

Es wurden ca. 250 ng DNA mit den Restriktionsenzymen *Eco* RI und *Mse* I für 2,5 h bei 37°C verdaut.

Restriktionsansatz:

5x Restriktions-Ligationspuffer (RL)	5 µl
<i>Eco</i> RI (Gibco; 10 U/µl)	0,25 µl
<i>Mse</i> I (New England Biolabs; 4 U/µl)	0,625 µl
DNA	250 ng
H <sub>2</sub> O (steril)	auf 20 µl

Die Menge an DNA-Lösung richtete sich nach der im Gel ermittelten Konzentration, üblicherweise ca. 5 µl.

Zuerst wurden RL-Puffer und Wasser in einem Reaktionsgefäß gut gemischt. Die Enzyme wurden im Stratacooler kühl gehalten und der Restriktionsansatz nach Zugabe der Enzyme ebenfalls auf Eis gekühlt. Der Ansatz wurde gemischt, kurz anzentrifugiert und 2,5 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

5 x Restriktions-/Ligationspuffer:

25 mM	DTT
50 mM	MgCl <sub>2</sub>
50 mM	Tris HAc
250 mM	KAc
ddH <sub>2</sub> O	

## 2.8.2. Ligation

Im gleichen Ansatz wurde auch die Adapterligation durchgeführt. Da der Adapter eine geänderte Base enthält, wird die Erkennungsstelle für die Restriktionsenzyme zerstört, so dass die Adapter nicht wieder abgespalten werden können. Religierte genomische Stücke werden jedoch weiterhin geschnitten. Dies erlaubt eine sehr effiziente Restriktion und Ligation.

## Ligationsansatz:

H <sub>2</sub> O (steril)	2,35 µl
5xRL-Puffer	1 µl
10mM ATP (Roche)	0,6 µl
<i>Eco</i> RI Adapter (Metabion; 5 pmol/µl)	0,5 µl
<i>Mse</i> I Adapter (Metabion; 50 pmol/µl)	0,5 µl
T4 DNA-Ligase (New England Biolabs; 400 U/µl)	0,05 µl

## Adaptersequenzen:

*Eco* RI Adapter:

up: 5'–CTCGTAGACTGCGTACC–3'  
 low: 3'–CATCTGACGCATGGTTAA–5'

*Mse* I Adapter:

up: 5'–GACGATGAGTCCTGAG–3'  
 low: 3'–TACTCAGGACTCAT–5'

Jeweils 5 µl dieses Ansatzes wurden zu den Restriktionsansätzen gegeben, durchmischt, kurz anzentrifugiert und weitere 3,5 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Von diesem Restriktions-Ligations-Gemisch wurden 1:10 Verdünnungen hergestellt, um überschüssige Adapter zu reduzieren. Die Lagerung der Ansätze erfolgte bei –20°C.

## 2.8.3. Präamplifikation

Die erste Amplifikation erfolgte mit Primern ohne selektiven Überhang. Es sollten die Fragmente mit zwei verschiedenen Adaptern vermehrt werden. Fragmente mit zwei gleichen Überhängen wurden nicht effizient amplifiziert, da die Adapter palindromische Sequenzen enthalten. Diese lagern sich aneinander an und bilden Haarnadelstrukturen aus, die eine Primerbindung erschweren.

Ansatz:

H <sub>2</sub> O (steril)	35,8 µl
10xPCR/MgCl <sub>2</sub> -Puffer (Roche)	5 µl
10 mM dNTPs (Roche)	1 µl
Primer ECO+0 (Metabion; 50 ng/µl)	1,5 µl
Primer MSE+0 (Metabion; 30 ng/µl )	1,5 µl
Taq-Polymerase (Gibco; 5 U/µl)	0,2 µl

Primersequenzen:

Primer ECO+0:

5'-GACTGCGTACCAATTC-3'

Primer MSE+0:

5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

Jeweils 45 µl des Ansatzes wurden in 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und auf Eis 5 µl des verdünnten RL- Ansatzes dazugegeben.

Die PCR lief wie alle folgenden in einem Eppendorf Gradientencycler nach folgendem Programm (AFLP 2A):

95°C 30s, R= 1 °/s

56°C 1 min

72°C 1 min



Es wurden 20 Zyklen durchgeführt. Wichtig ist, dass bei dieser PCR kein sog. hot start gemacht werden darf, da die Adapter nicht phosphoreliert sind, so dass sich während der Aufheizphase ein Strang vom Template ablöst. Dieses Stück wird in einer fill-in Reaktion durch die Taq-Polymerase aufgefüllt.

Von dieser PCR- Reaktion wurde wiederum eine Verdünnung (1:50) hergestellt, um überschüssige Primer zu reduzieren.

#### 2.8.4. Selektive Amplifikation

Bei der selektiven Amplifikation wurde auf der Seite der *Eco* RI- Schnittstelle ein Primer eingesetzt, der am 5´ -Ende eine Digoxigenin- Gruppe und auf der 3´ - Seite als selektive Base ein Adenin trug. Auf der Seite der *Mse* I- Schnittstelle wurden Primer mit 2-4 unterschiedlichen selektiven Basen verwendet. Die selektive Amplifikation dient sowohl der Markierung der Fragmente durch die Dig-Gruppe als auch der Reduzierung der Anzahl von Fragmenten auf eine gut detektierbare Menge.

Ansatz:

H <sub>2</sub> O (steril)	11,4 µl
10xPCR/MgCl <sub>2</sub> -Puffer (Roche)	2 µl
10 mM dNTPs (Roche)	0,4 µl
Dig-ECO-A (Metabion; 20 pmol/µl)	0,1 µl
MSE+X (Metabion; 30 ng/µl)	1 µl
Taq-Polymerase (Gibco; 5U/µl)	0,1 µl

X = CA, CC, GG, GGA, GGC, GGT, GGG, GGTA, GGTC, GGTT, GGTG

Primersequenzen:

Primer Dig-ECO+A:

5´ -Dig-GACTGCGTACCAATTCA-3´

Primer MSE+X:

5´ -GATGAGTCCTGAGTAA-X-3´

Jeweils 15 µl des Ansatzes wurden in 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und auf Eis 5 µl des verdünnten Präamplifikations- Ansatzes dazugegeben.

Die PCR erfolgte mit dem Programm AFLP 2B. Nach einer Denaturierung bei 96°C (30 s, R=2°C/s) erfolgte die Primeranlagerung bei 65°C für 1 min und die Extension bei 72°C ebenfalls für 1 min. Die Primeranlagerungstemperatur wurde in den nächsten 12 Zyklen schrittweise um je 0,7°C gesenkt. Danach erfolgten weitere 23 Zyklen mit folgendem Profil: 94°C 30 s; 56°C 1 min; 72°C 1 min.

Diese sogenannte touch-down PCR dient dazu, zuerst hochspezifisch, d.h. mit hoher Primeranlagerungstemperatur, die richtigen Fragmente zu amplifizieren. Dabei binden die Primer jedoch nur mit geringer Effizienz, so dass keine großen Mengen an Amplifikaten erzeugt werden. Sind die „richtigen“ Fragmente jedoch erst einmal im Verhältnis angereichert, genügt auch eine geringere Primeranlagerungstemperatur, bei der dann auch die Amplifikation effizient abläuft.

Auf die PCR- Ansätze wurden 20µl AFLP- Stop-Puffer gegeben, der gleichzeitig als Gelbeladungspuffer diene.

AFLP-Stop-Puffer: 5 mM EDTA; 0,1% Bromphenolblau; 98% entionisiertes Formamid

## **2.9. Umwandlung der AFLP-Marker in STS (sequence tagged site)-Marker**

Einige der AFLP-Marker wurden in STS-Marker umgewandelt, indem die entsprechenden Fragmente aus der Nylonmembran eluiert, kloniert und sequenziert wurden, so dass aus den Sequenzen Primer für ein direktes PCR-Screening abgeleitet werden konnten.

### **2.9.1. Ausschneiden der Markerbanden**

Für das Ausschneiden der Markerfragmente wurden spezielle Gele gegossen, bei denen jeweils nur eine Probe mehrfach nebeneinander aufgetragen wurde. Nach dem Gellauf wurde die Membran so der Länge nach durchtrennt, dass 2 Teile mit gleichem Bandenmuster entstanden. Nur eine Hälfte wurde detektiert

und der so erhaltene Film diene als Größenmarker zum Auffinden der Banden auf dem unbehandelten Membranstück. Mit einer frischen Rasierklinge wurden Membranstücke auf Höhe der Marker ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 200 µl ddH<sub>2</sub>O durch 10 min Kochen eluiert.

Diese DNA wurde in einer PCR-Reaktion mit den entsprechenden AFLP-Primerpaaren reamplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel überprüft und zur Klonierung mit dem TOPO-TA Kit (Invitrogen) laut Vorschrift des Herstellers eingesetzt.

### 2.9.2. Sequenzierung und Primerableitung

10 weiße Kolonien wurden von jedem Marker zur weiteren Bearbeitung ausgewählt. Die Klone wurden mit einer PCR unter Verwendung der M13-Standardprimer auf die Richtigkeit des eingebauten Fragments überprüft. PCR-Produkte der richtigen Größe wurden mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) nach Vorschrift gereinigt. Von diesem gereinigten Produkt wurden ca. 100 ng für die Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

Durch Vergleich der Sequenzen von Markern für Kurzperiodik und Normalperiodik wurden Primer abgeleitet, die für jeweils einen Phänotyp spezifisch sind, so dass nur von DNA-Proben des entsprechenden Phänotyps PCR-Produkte erwartet werden.

## 2.10. PCR

Soweit nicht anders angegeben, wurden für PCRs folgende Standardkonzentrationen eingesetzt:

10 µl	10xPCR-Puffer (Roche; Gibco)
3 µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM) (Roche; Gibco)
2 µl	dNTPs (10 mM)
je 1 µl	Primer (20 pmol/µl)
5U	Taq-Polymerase (Gibco)

in ddH<sub>2</sub>O gelöste DNA oder Teile einer Bakterienkolonie als Matrize  
ad 100 µl

Die Amplifizierung erfolgte in Eppendorf Gradientencyclern mit folgendem Profil:

96 °C	3 min.
96 °C	30 s
X °C	1 min.
72 °C	2 min.; 30 Zyklen
X °C	3 min.
72 °C	7 min.
8 °C	∞

X: Annealingtemperatur je nach verwendeten Primern; siehe Anhang A

Eine Liste der verwendeten Primer findet sich im Anhang A.

## 2.11. Sequenzreaktionen

Die Sequenzierung von klonierten AFLP-Markern, BAC-Subklonen oder Kandidatengenomen erfolgte nach folgendem Protokoll:

Halfterm (Perkin Elmer)	6 µl
Bigdye (Perkin Elmer)	2 µl
Primer (10 pmol/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O (steril)	ad 20 µl

Als Template dienten gereinigtes PCR-Produkt oder Minipreps der entsprechenden Plasmide.

Programm Bigdye:

96 °C	30 s
50 °C	15 s
60 °C	4 min
25 Zyklen	

Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurde der Ansatz in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 45 µl Ethanol abs. versetzt und 20 min bei

10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der Niederschlag in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Die Sequenzierung erfolgte im Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie Hamburg auf einem Applied Biosystems DNA Sequencer.

## 2.12. PCR-Analyse der Kreuzungsnachkommen

Für die STS- bzw. CAPS-Analyse müssen keine aufwändigen AFLPs mehr durchgeführt werden, sondern das Vorhandensein der Marker kann in einer einfachen PCR-Reaktion überprüft werden. Auch die DNA-Präparation entfällt, da für diese PCR-Reaktionen die Zellen nur grob aufgeschlossen werden müssen. Hierzu wurde ca. eine Impföse *Chlamydomonas*-Zellen von einer Plattenkultur abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 20 µl sterilem Wasser resuspendiert. Die Zellen wurden durch 10 min Kochen im Wasserbad mit 200 µl 5% Chelex-Lösung aufgeschlossen, die Zellbestandteile in einer Eppendorf Tischzentrifuge für 10 min bei 13.000 U abzentrifugiert und der Überstand für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Diese Ansätze wurden bei 4°C gelagert und vor der Wiederverwendung erneut zentrifugiert.

Die Amplifikation erfolgte mit den in Anhang A aufgelisteten STS- bzw. CAPS-Primern, als Ausgangsmaterial dienten 5 µl Chelex-Überstand.

## 2.13. Southern Blots

Zur Herstellung von Southern Blots wurden sowohl TBE- als auch TAE- Gele wie oben beschrieben verwendet. Die Gele wurden grundsätzlich in Schalen auf einem Schüttler für 10 min in 250 mM HCl depuriniert, da stets auch sehr große DNA-Fragmente übertragen werden mußten. Anschließend wurden die Gele mit Wasser gespült und je zweimal für je 15 min mit Denaturierungspuffer und Neutralisierungspuffer im Schüttler inkubiert. Bei den sehr instabilen TAE-Gelen erfolgte das Austauschen der Puffer durch Absaugung. Die Übertragung der DNA-Banden auf Membranen erfolgte mit Hilfe des Turboblotter Rapid Downward Transfer Systems (Schleicher & Schuell). Es wurde die Hybond NX Membran der Firma Amersham Pharmacia benutzt, geblottet wurde mit 20xSSC über Nacht. Anschließend wurde die

übertragene DNA im UV-Crosslinker an die Membran gebunden und die Membran wurde trocken in Alufolie bis zur Verwendung aufbewahrt.

20xSSC: 3M NaCl; 0,3 M NaCitrat

Denaturierungspuffer: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

Neutralisierungspuffer: 0,5 M Tris – HCl (pH 7,5), 1,5 M NaCl

## 2.14. Hybridisierungen

Zur Hybridisierung der Southern blots wurden sowohl DNA- als auch RNA-Sonden verwendet. In beiden Fällen wurde die Membran für 30 min. bei der späteren Hybridisierungstemperatur mit dem entsprechenden Puffer prähybridisiert und dann die Dig-markierte Sonde zugegeben. Frisch hergestellte Sonden wurden zuvor auf ein Volumen von 100 µl gebracht und für 5 min. im kochenden Wasserbad erhitzt, aufgetaute, bereits verwendete Sonden in Hybridisierungspuffer wurden für 10 min. bei 68°C erwärmt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht, für DNA-Sonden bei 42°C, für RNA-Sonden mit 55°C. Danach wurde die Sonde abgegossen und bei –20°C eingefroren und die Membran 2x für je 5 min. bei RT in 2xSSC/0,1%SDS und 2x 15 min bei 68°C in 0,1xSSC/0,1% SDS gewaschen und gleich im Anschluß detektiert. Im Falle von RNA-Sonden wurden sämtliche Wasch- und Detektionslösungen DEPC- behandelt, um einen Sondenabbau durch RNAsen zu verhindern.

Hybridisierungspuffer DNA: Dig Easy Hyb (Roche)

Hybridisierungspuffer RNA: 50% Formamid deion.; 5xSSC; 0,1% N-Lauroylsarcosin; 2% Blockingreagenz (Roche); 0,02% SDS

dieser Puffer wurde aus DEPC-behandelten Stammlösungen zubereitet

## 2.15. Sondenherstellung

Für ein erstes Durchmustern der BAC-Bibliothek von *Chlamydomonas reinhardtii* wurden drei geeignete AFLP-Marker verwendet. Um weitere BACs zu identifizieren, mußten jedoch neue Sonden erzeugt werden. Dazu mußten die Enden einzelner BACs gefunden und je nach Größe und Sequenz mit verschiedenen Techniken in Sonden umgewandelt werden.

### 2.15.1. AFLP – Marker

Die AFLP-Marker wurden in einer PCR-Reaktion mit alkalilabilem Dig-dUTP (Roche) im Verhältnis von 1:3 zu dTTP von den bekannten Primersequenzen aus amplifiziert. Es wurden Ansätze mit 100 µl Volumen nach den oben beschriebenen PCR-Bedingungen für die jeweiligen Marker amplifiziert.

### 2.15.2. Herstellung von Sonden aus BAC-Enden durch *In-Vitro*-Transkription

Eine Möglichkeit zur Identifizierung von BAC-Enden ist die *In-Vitro*-Transkription. Hierbei wird die Plasmid-DNA, ausgehend von den im Plasmid vorhandenen SP 6- und T 7- Transkriptionsstartpunkten, vervielfältigt und dabei gleichzeitig durch den Einbau von Dig-UTP-Molekülen markiert. Dies geschah mit Hilfe des Dig RNA labeling (SP6/T7) Kits (Roche) nach Vorschrift des Herstellers.

Erste Versuche zeigten, dass Transkripte aus den vollständigen, ungeschnittenen Plasmiden zu groß wurden, so dass in weiteren Versuchen die Plasmide zuvor mit geeigneten Restriktionsenzymen wie *Bam*HI, *Nhe*I oder *Hae*III verdaut wurden. Die 20 µl-Restriktionsansätze wurden mit 80 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgefüllt und zweimal mit je 50 µl Chloroform /Isoamylalkohol und Phenol und einmal mit 100 µl Chloroform /Isoamylalkohol extrahiert. Die Fällung erfolgte mit eiskaltem Ethanol bei –70 °C für 30 min, das Pellet wurde einmal mit 70 % EtOH<sub>DEPC</sub> gewaschen und nach dem Trocknen in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> resuspendiert. Diese Suspension wurde dann komplett für die Transkription eingesetzt.

## 2.15.3. Markierung von BAC-Endfragmenten mit Dig-ChemLink (Roche)

In manchen Fällen ließen sich die BAC-Plasmide nicht in geeigneter Größe linearisieren. War aus Restriktionsgelen verschiedener BACs jedoch bekannt, welches Restriktionsfragment wahrscheinlich ein Ende darstellt, wurden diese Fragmente direkt markiert. Die entsprechende Bande wurde eluiert, gleiche Mengen DNA-Eluat und Dig-ChemLink (meist 2 µl) vermischt und auf ein Volumen von 20 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach neunzigminütiger Inkubation im Wasserbad bei 85 °C wurden 5 µl Stop Solution zugegeben und die Sonde wie üblich verwendet.

## 2.15.4. Subklonierung von BAC-Endfragmenten

Da die direkte Markierung von BAC- Endfragmenten teilweise an zu geringer DNA-Menge scheiterte und außerdem ein Strippen von Blots mit Dig-ChemLink sehr umständlich und nicht sehr effektiv ist, wurden Endfragmente subkloniert, um sie dann in Sonden zu verwandeln. Hierzu wurden die aus den Gelen eluierten *Hind*III – Fragmente in den Vektor phT3T7 BM+ (Roche) einkloniert und dann in den *E. coli* – Stamm DH5 α transformiert. Die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformation erfolgten nach dem Protokoll von Inoue (Inoue et al., 1990).

Die Plasmid-DNA wurde mit *Eco* RI linearisiert und mithilfe einer *In-Vitro*-Transkription wie in Kapitel 2.12.1 in eine Sonde umgeschrieben.

## 2.15.5. Adapterligation an BAC-Endfragmente

Um sich das zeitaufwändige und arbeitsintensive Subklonieren zu ersparen, wurde auch versucht, Adapter an die eluierten *Hind*III – Fragmente zu ligieren, um durch PCR mit markierten Nukleotiden Sonden zu erzeugen. Hierzu wurden je 10 µl Eluat; 7 µl H<sub>2</sub>O; 2 µl Ligase-Puffer; 0,25 µl T4-Ligase und je 10 pmol der beiden Adapter gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Amplifikation wurden sowohl das Eppendorf Triple Master System mit je 1, 0,1 und 0,01 µl des Ligationsansatzes als Matrize als auch das Gibco Enhancer System nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Primer dienten Standard – T3 Primersequenzen, die komplementär zu der Sequenz der *Hind*III-Adapter sind.

Adaptersequenz: 5´ – AGCTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATT – 3´



## 2.16. Detektion von Southern blots und AFLP-Membranen

Die Detektion erfolgte mit dem Dig-System der Firma Roche. Hierzu wurden bei AFLP-Membranen die DNA-Fragmente zuerst durch UV-Crosslinking an die Membran gebunden, bei Southern Blots die nötigen Waschschriffe durchgeführt und die Membranen dann nach Vorschrift des Herstellers detektiert. Als Substrat für die alkalische Phosphatase diente CDP-Star (Roche, Mannheim). Die Expositionszeit der Röntgenfilme betrug normalerweise 0,5 – 1,5 h.

## 2.17. Stripping

Nach erfolgter Detektion und Filmentwicklung wurden die Southern blots gestrippt, um die alkalilabile Markierung der Sonden zu entfernen und den Blot für eine erneute Hybridisierung vorzubereiten. Hierzu wurde die Membran zunächst mit Wasser gespült und dann zweimal für je 10 min bei mind. 37°C mit Stripping Solution im Hybridisierungsofen inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für je 10 min in 2xSSC gespült, entweder sofort wieder prähybridisiert oder noch feucht in Frischhaltefolie eingeschlagen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Stripping Solution: 0,2 M NaOH; 0,1 % SDS

## 2.18. Screening einer BAC-Bibliothek

Für den *Chlamydomonas reinhardtii* –Stamm cc 503 existiert eine sogenannte BAC-Bibliothek, d.h. ein Membranfilter, auf dem DNA von ca. 15.000 BAC-Klonen in einem bestimmten Muster aufgetragen ist. Diese Klone enthalten in den Bacterial Artificial Chromosome- Vektoren Stücke der genomischen DNA von cc 503 in einer Größe zwischen ca. 50.000 und 120.000 Basenpaaren. Durch ein bestimmtes Muster aus jeweils 2 Punkten, das sich nach Hybridisierung des Filters mit Sonden ergibt, können einzelne Klone identifiziert und käuflich erworben werden. Dieser Filter und die Klone wurden zunächst von Genome Systems (USA), später von Incyte Genomics (USA) vertrieben. Nach einer Umstrukturierung dieser Firma waren lange Zeit keine

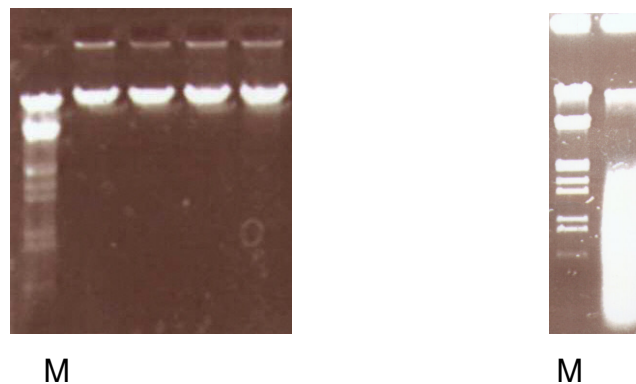
Klone erhältlich, inzwischen befindet sich die gesamte Bibliothek am Clemson University Genomics Institute (USA), von dem auch wieder Klone bezogen werden können.

Der Hersteller empfiehlt die Verwendung radioaktiv markierter Sonden, Vorversuche mit einer Testmembran ergaben jedoch, dass sich auch dieser Filter problemlos mehrere Male mit alkalilabilen Dig-markierten Sonden hybridisieren und auch stripfen lässt. Hybridisierung und Detektion erfolgten wie bei Southern Blots (Kap. 2.14, 15, 17).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Identifizierung molekularer Marker mittels AFLP

Für die AFLP-Analysen wurde hochreine genomische DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* gebraucht. Zu Beginn der Arbeit wurde diese durch die klassische Extraktion mit Phenol und Chloroform nach Newman (Newman et al., 1990) gewonnen. Diese Methode lieferte reine, intakte DNA in ausreichender Menge, war jedoch aufgrund des Zeitaufwandes und der verwendeten Gefahrstoffe nicht optimal. DNA-Extraktionskits verschiedener Hersteller hatten sich schon im Vorfeld als nicht geeignet erwiesen, da wohl aufgrund von sekundären Inhaltsstoffen die Ausbeute sehr gering war. Während dieser Arbeit wurde jedoch das von der Firma PeqLab neu entwickelte E.Z.N.A. Plant DNA Kit getestet, das bereits bei Einsatz genau nach Vorschrift eine deutlich höhere Ausbeute an DNA zeigte als andere Kits. Durch Anpassung des Aufschlußpuffers und der eingesetzten Mengen an Material und Pufferlösungen konnte die Ausbeute so weit gesteigert werden, das sie der aus der Standardmethode entsprach oder diese sogar übertraf (Abb.5).

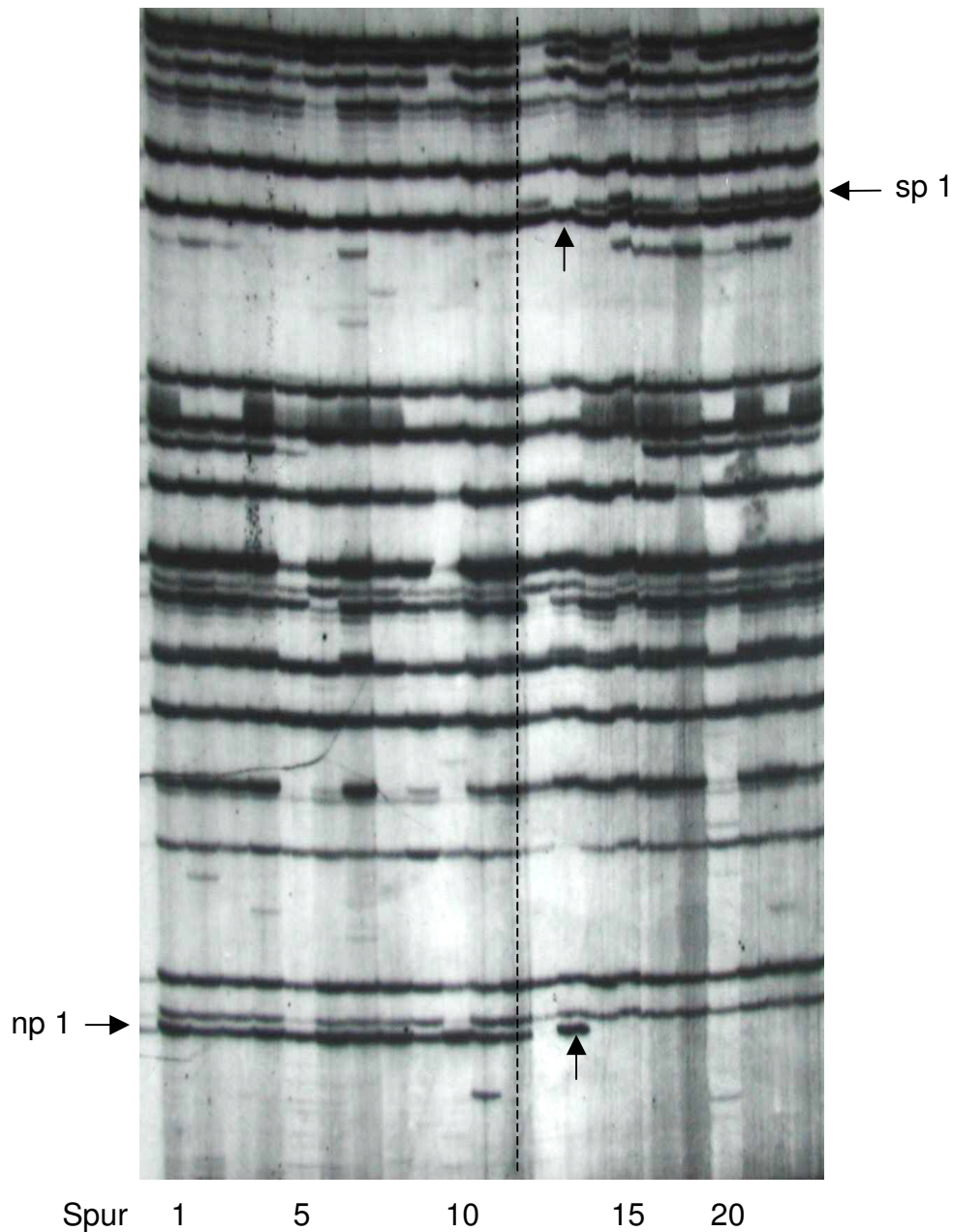


**Abb. 5: DNA-Präparationen aus *Chlamydomonas reinhardtii***

Links sind 4 DNA-Präparationen nach der Standardmethode, rechts eine mit dem PeqLab-Kit gezeigt. Als Marker sind jeweils 6 µl λEcoHind (MBI Fermentas) aufgetragen. Es sind keine großen Unterschiede in Qualität oder Quantität zu beobachten, bei der Präparation mit dem PeqLab Kit wurde auf einen RNA-Verdau verzichtet. Als Ausgangsmaterial dienten je 50 ml Flüssigkultur, aufgetragen ist je 1/100 der Gesamtmenge.

Ausgehend von diesen DNA – Präparationen der Nachkommen einer Kreuzung eines Wildtypstammes mit einer Kurzperiodikmutante wurden AFLP-Polyacrylamidgelelektrophoresen durchgeführt, um die Kreuzungsnachkommen auf das Vorhandensein von molekularen Markern zu überprüfen. Dazu wurde die DNA mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten, Stücke mit zwei verschiedenen Schnittstellen wurden in einer ersten PCR bevorzugt amplifiziert und in einer zweiten, die Fragmentanzahl weiter verringernden selektiven PCR markiert. Die selektive Amplifikation erfolgte immer mit der Primerkombination Dig-*Eco*-A / *Mse*-X, wobei das X für die verwendeten selektiven Basen steht. Diese sind im weiteren als Überhang bezeichnet. Die so entstandenen markierten Banden wurden in 4 – 6 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

Exemplarisch wird hier eine Analyse von 23 Nachkommen mit der Primerkombination Dig-*Eco*-A / *Mse*-CA gezeigt. In der Analyse in Abb. 6 zeigen sich viele Banden, die in allen Proben vorkommen und die identische Bereiche in beiden Periodentypen darstellen. Andere Banden kommen nur in vereinzelt Proben vor. Sie können z. B. durch Punktmutationen in nichtkodierenden Bereichen oder durch genomische Unterschiede, die keinen Einfluß auf den hier untersuchten Phänotyp haben, verursacht werden. Als Marker für die Photoakkumulationsperiodik lassen sich solche Banden identifizieren, die in einem überwiegenden Teil der Proben eines Periodentyps auftauchen, in den Proben des anderen Periodentyps jedoch fehlen. Die Identifizierung dieser Banden wird ermöglicht durch die vorherige Sortierung der Proben nach dem in der Photoakkumulationsreaktion bestimmten Periodentyp.



### Abb. 6: AFLP-Analyse von Kreuzungsnachkommen

Die selektive Amplifikation erfolgte mit der Primerkombination Dig-*ECO-A/MSE-CA*. Der Kurzperiodikmarker sp 1 und Normalperiodikmarker np 1 sind durch Pfeile gekennzeichnet. Rechts sind Normalperiodik-Proben von 12 Nachkommen der Kreuzung 103 aufgetragen, links 11 Kurzperiodik-Proben sowie der Stamm cc 503. Eine Rekombination in der Probe 103.11.3 ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Spuren 1-12: Normalperiodik: 11.2 12.4 16.2 19.2 20.3 10.1 12.1 13.1 13.4 16.3 19.1 20.1

Spuren 13-23: Kurzperiodik: 10.2 11.3 12.3 20.2 10.3 11.1 12.2 13.2 13.3 16.1 19.3 cc 503

Zwei Banden, die jeweils entweder in Normalperiodik- oder in Kurzperiodikproben auftauchen, sind mit waagerechten Pfeilen gekennzeichnet. Diese Banden stellen für den jeweiligen Phänotyp spezifische Bereiche dar. Nach Überprüfung wurden diese als Marker np 1 (Normalperiodik) und sp 1 (Kurzperiodik) bezeichnet.

Die Probe 103.11.3 (Abb. 6, senkrechte Pfeile) weist den Marker np 1 für die Normalperiodik auf und der Marker sp 1 fehlt, obwohl der Stamm in der Photoakkumulationsreaktion Kurzperiodik zeigt. Hier liegt eine der sehr selten vorkommenden Rekombinationen zwischen dem Marker sp 1 und dem Periodikgen vor.

Es wurden insgesamt 26 AFLP - Polyacrylamidgelelektrophoresen mit 15 verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt, um die Kreuzungsnachkommen auf das Vorhandensein von molekularen Markern zu überprüfen. Dabei konnten mit drei verschiedenen Primerkombinationen acht eng gekoppelte Marker identifiziert werden, je 4 für Normalperiodik (np 1-4) und Mutante (sp 1, 4, 5, 6). Diese Marker haben eine Länge zwischen ca. 100 und 400 bp. In Tabelle 1 sind die gefundenen Marker, ihre Längen und die zugehörigen Primerkombinationen zusammengefaßt. Die Ergebnisse der AFLP-Analysen für die einzelnen untersuchten Stämme sind im Anhang C detailliert aufgeführt.

**Tab. 1: Liste der gefundenen Marker**

	Überhang	Gelkonzentration	Länge (bp)
np 1	CA	4%	396
np 2	GGA	6%	99
np 3	GGT	6%	145
np 4	GGA	6%	404
sp 1	CA	4%	243
sp 4	GGT	6%	152
sp 5	GGA	6%	410
sp 6	GGA	6%	127

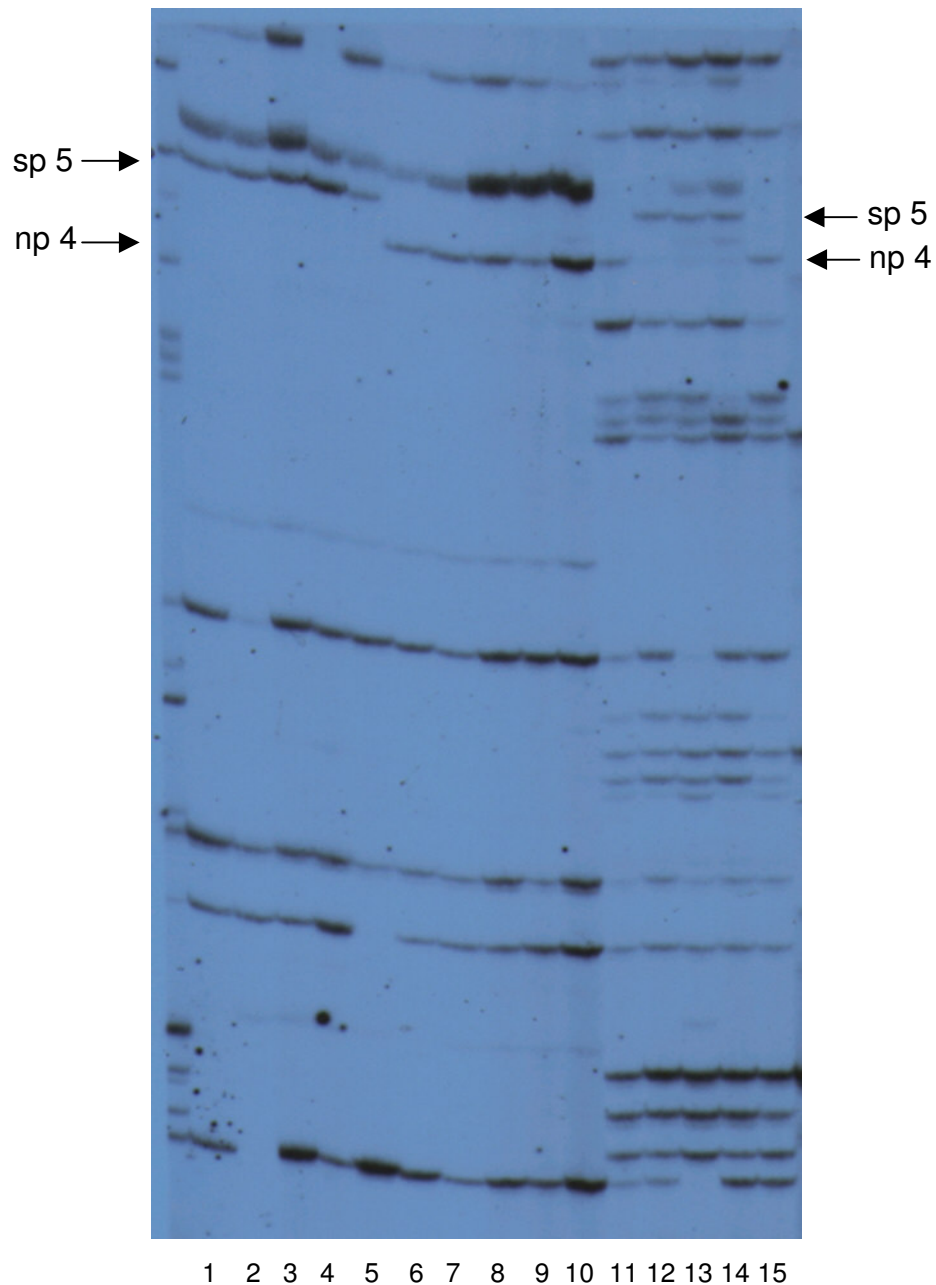
Angegeben sind die durch AFLP-Analysen gefundenen Marker, wobei np stets Marker für den Wildtyp und sp solche für die Kurzperiodikmutante bezeichnet. Für jeden Marker sind die verwendeten selektiven Überhänge und die ideale Gelkonzentration sowie die nach Sequenzierung bestimmte Länge aufgeführt.

### 3.2. Ermittlung des Kopplungsgrades der Marker zum Gen

Nachdem nun einige molekulare Marker zur Verfügung standen, mußte der Kopplungsgrad dieser Marker zum gesuchten Gen ermittelt werden. Hierzu mußten möglichst viele Kreuzungsnachkommen auf das Vorhandensein der Marker hin überprüft werden. Dies ist zwar prinzipiell durch AFLP-Analysen möglich, wäre jedoch extrem zeitaufwändig gewesen, deshalb wurden aus einigen Markern STS-oder CAPS-Marker entwickelt. Mit Hilfe dieser Marker ist eine Überprüfung der Nachkommen im Mikrotiterplatten-Format mit einer einzigen PCR (und evtl. Restriktion) und ohne aufwändige DNA-Präparationen möglich.

#### 3.2.1. Ausschneiden der AFLP-Markerbanden

Um die gefundenen Markerfragmente in STS- oder CAPS- Marker zu verwandeln, mußten die entsprechenden Banden aus den AFLP-Membranen ausgeschnitten, kloniert und sequenziert werden. Dies ist in Abb. 7 für die Marker np 4 und sp 5 exemplarisch dargestellt. Um das Ausschneiden der Banden zu erleichtern, wurde eine zusätzliche selektive Base an den Primer gehängt, so das sich die Gesamtzahl der Banden auf ca. ein Viertel verringert.



**Abb. 7: Separation der Markerbanden durch Verwendung einer zusätzlichen selektiven Base**

Die Auftrennung erfolgte in einem 6%igen Polyacrylamidgel, die Reduktion der Bandenzahl bei einer zusätzlichen selektiven Base ist deutlich zu sehen.

Spuren 1-5: Kurzperiodik, Überhang –GGA,

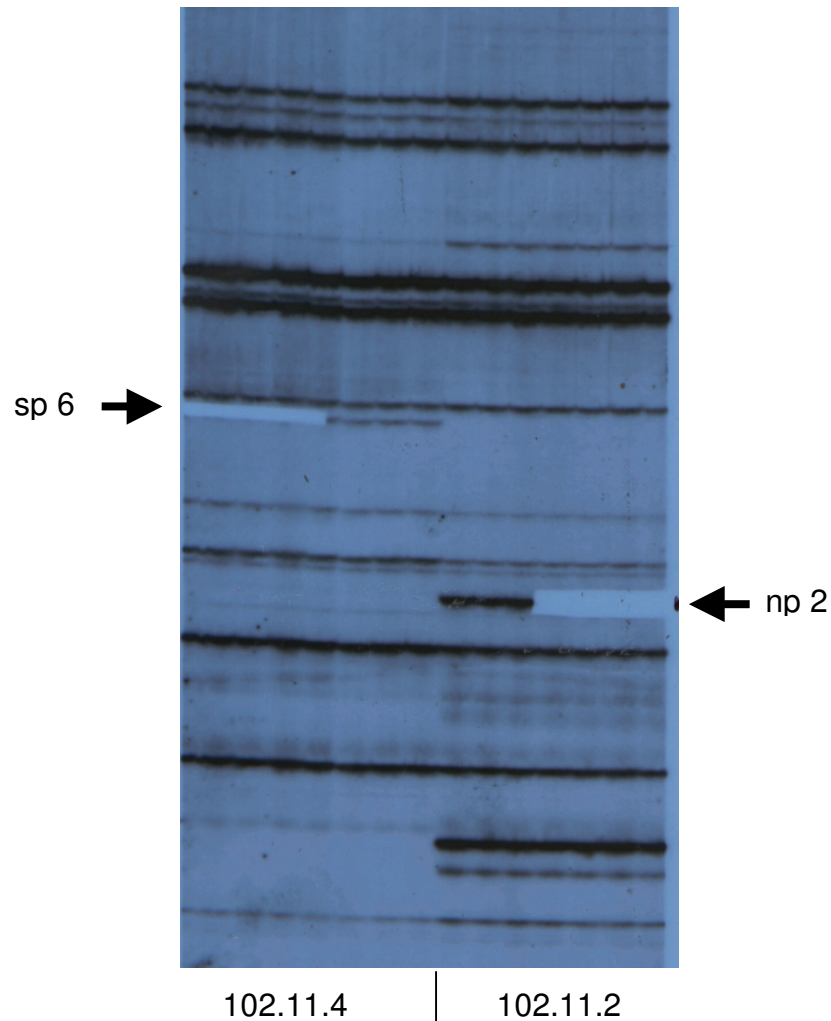
Spuren 6-10: Normalperiodik, Überhang –GGA

Spuren 11,15: Normalperiodik, Überhang –GG,

Spuren 12-14: Kurzperiodik, Überhang –GG



Für das Ausschneiden der Markerfragmente wurden Gelelektrophoresen durchgeführt, bei denen jeweils eine Probe mehrfach nebeneinander aufgetragen wurde, so das auch beim Ausschneiden mehrerer Spuren garantiert nur ein identisches Fragment gewonnen wurde (Abb. 8).



#### **Abb. 8: Kontrolle der ausgeschnittenen Markerfragmente**

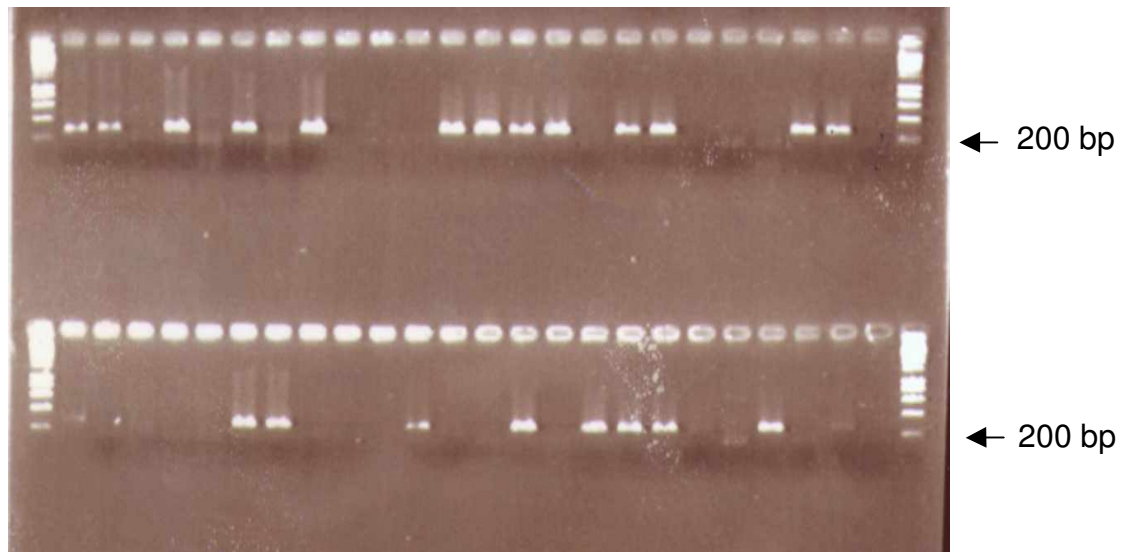
Hier ist ein Membranstück nach Ausschneiden der Banden und anschließender Detektion gezeigt. Zum Ausschneiden von Markerbanden für die Klonierung wurde eine Elektrophorese durchgeführt, bei der die gleiche Probe mehrfach nebeneinander aufgetragen wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Markerbanden gut getroffen wurden.

Die DNA wurde aus den ausgeschnittenen Membranstücken eluiert, mit den entsprechenden unmarkierten AFLP – Primern reamplifiziert, mit dem TOPO-TA-System kloniert und anschließend sequenziert. Für alle Marker sind die Sequenzen in Anhang B aufgelistet.

Dabei zeigten sich in einigen Fällen Paare von homologen Sequenzen für Wildtyp und Kurzperiodikmutante, die sich nur geringfügig unterschieden. So sind die Marker np 4 und sp 5 über weite Strecken sequenzidentisch, lediglich in den ersten 100 Basen zeigen sich geringfügige Unterschiede und die Deletion von 5 Basen im Wildtyp. Für andere Marker wie sp 1 und np 1 wurden keine direkten Entsprechungen gefunden. Bei einer Datenbanksuche stellte sich heraus, dass der Marker np3 zum 3' - Bereich des Gens *ida7* (AF159260) aus *Chlamydomonas reinhardtii* 100%ig homolog ist. Dieses Gen kodiert für die „inner dynein arm I1 intermediate chain“, eine Komponente des Flagellenaufbaus (Yang and Sale, 1998). Für dieses Gen wurde bereits ein Marker am äußeren Ende des Chromosom 18 gefunden, so dass durch diese Sequenzhomologie bereits deutlich wurde, dass sich das gesuchte Gen *uhr 1* und die entsprechenden Marker auch in diesem Chromosomenendbereich befinden. Dadurch konnte mit größerer Sicherheit von beobachteten Rekombinationshäufigkeiten der Marker auf einen ungefähren Abstand in bp im Genom geschlossen werden, da hier keine Rekombinationsunterdrückung wie in centromernahen Bereichen zu erwarten ist. In *Chlamydomonas reinhardtii* entspricht 1 cM ungefähr einem Abstand von 50 bis 100 kbp (P. Ferris, pers. Mitt.).

## 3.2.2. STS-Analyse

Von den nun bekannten Sequenzen der AFLP-Marker wurden für die Marker sp 1, np 4 und sp 5 Primerpaare abgeleitet, die ein für den jeweiligen Periodentyp spezifisches Amplifikat erzeugen (Abb. 9).



**Abb. 9: Mikrotiterplatten-PCR des STS-Markers np 4**

Zur schnellen Überprüfung vieler Nachkommen wurden PCRs im Mikrotiterplatten-Format durchgeführt. In diesem 2%igen Agarosegel sind Proben der ersten 48 Nachkommen der Kreuzung 103 aufgetragen, bei Vorhandensein des Markers np 4 zeigt sich ein spezifisches Amplifikat von 280 bp.

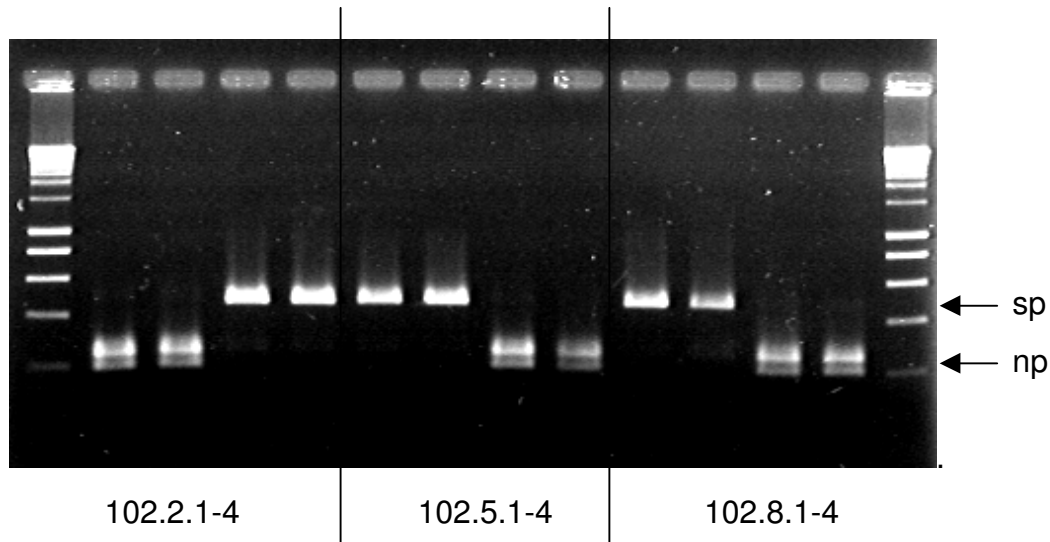
Mit Hilfe dieser STS-Marker konnten sehr schnell ca. 170 Nachkommen auf das Vorhandensein der entsprechenden Fragmente überprüft werden, um so Aussagen über den Kopplungsgrad zwischen den Markern und dem gesuchten Gen machen zu können. Die einzelnen Ergebnisse finden sich in Anhang C.

## 3.2.3. CAPS-Analyse

Für den AFLP-Marker np 1 konnten keine geeigneten Primer abgeleitet werden, da sich der entsprechende genomische Bereich in Wildtyp und Kurzperiodik nur im Vorhandensein einer Restriktionsstelle unterscheidet. Frau Jasna Olschewski entwickelte hierfür einen sogenannten cleaved amplified polymorphic site (CAPS)-Marker, den sie mir freundlicherweise zur

Verfügung stellte. Hierfür wird ein größerer genomischer Bereich mittels PCR amplifiziert, die PCR- Ansätze anschließend mit dem Restriktionsenzym verdaut und dann auf ein Agarosegel aufgetragen. Je nach Vorhandensein der Schnittstelle in der Sequenz ergeben sich entweder zwei kleine oder eine größere Bande.

Gezeigt wird hier eine Agarosegelelektrophorese von Nachkommen aus drei Zygoten nach PCR und *EcoRI* – Verdau (Abb. 10).



**Abb. 10: CAPS-Marker np 1**

Aufgetragen ist jeweils das mit *EcoRI* verdaute CAPS-Amplifikat. Von den Nachkommen der drei Zygoten weisen jeweils zwei den Kurzperiodik-Phänotyp auf und zeigen dementsprechend ein größeres, ungeschnittenes Amplifikat, während in den Normalperiodik-nachkommen zwei kleinere Banden, die durch Restriktion entstanden sind, zu sehen sind.

Auch hier sind die Einzelergebnisse der Tabelle in Anhang C zu entnehmen.

#### 3.2.4. Ermittlung des Kopplungsgrades

AFLP-Analysen erwiesen sich als eine sehr robuste und reproduzierbare Methode, um molekulare Marker für die jeweiligen Phänotypen zu finden. Schwierigkeiten traten lediglich beim Restriktionsverdau der DNA auf. Manche der DNA-Proben ließen sich auch nach mehrmaligen Versuchen nicht vollständig schneiden, was eine schlüssige Auswertung der AFLP-Analysen verhinderte. Um sicher zu sein, dass in einer bestimmten Probe ein Marker tatsächlich im Genom fehlt und nicht nur deshalb nicht auf der erwarteten

Höhe in einem Gelbild auftaucht, weil die Restriktion nicht effizient ablief, müssen alle Proben eines Gels ungefähr gleich viele Banden aufweisen. Zeigt nun eine Probe vergleichsweise wenige Banden, kann eine fehlende Markerbande nicht mit Sicherheit auf einen Verlust des Markers durch Rekombination zurückgeführt werden. Die teilweise unvollständige Restriktion mancher Proben ist am wahrscheinlichsten auf eine Methylierung der DNA zurückzuführen, da die beiden verwendeten Enzyme *EcoRI* und *MseI* methylierungssensitiv sind und dadurch die Schnittstellen im methylierten Zustand nicht mehr erkennen. Solche Proben wurden wenn nötig von der DNA-Präparation ab wiederholt, mit STS-Markern überprüft oder von der Auswertung ausgeschlossen.

Für den STS-Marker sp 1 wurde ein Fehlen des spezifischen Amplifikats nicht sofort als Rekombinationsereignis gewertet, da es sich stets auch um eine mißlungene PCR-Reaktion gehandelt haben könnte. Solche Proben wurden ein weiteres Mal mit den STS-Primern überprüft und im Zweifelsfall auch eine AFLP-Analyse der entsprechenden Nachkommen durchgeführt.

Für die STS-Marker np 4 und sp 5 wurde die Auswertung dadurch erleichtert, das die Marker aus homologen Sequenzbereichen stammen, d.h. der Marker muß in der einen oder der anderen PCR-Reaktion auftauchen. Dies erlaubte eine interne Kontrolle der Ergebnisse für diese beiden Marker.

Die Ergebnisse dieser Analysen mit AFLP-, STS- und CAPS- Markern für die einzelnen Kreuzungsnachkommen sind im Anhang 3 aufgelistet.

Die Daten aus diesen Analysen wurden kombiniert und zur Erstellung einer Tabelle mit Rekombinationshäufigkeiten (Tab. 2) verwendet. Dabei wurden alle Nachkommen, bei denen die Ergebnisse unklar waren, nicht berücksichtigt. Dies traf für ca. 8-10 der Proben zu, bei denen entweder aufgrund nicht gelungener Restriktionen keine AFLP-Analyse möglich war oder auch nach mehrmaligen Versuchen die STS-PCRs keine eindeutigen Ergebnisse lieferten. Zwei der Nachkommen stellten sich als Mischklone heraus, da sie stets beide Marker zeigten. Sie wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, da sich eine Aufreinigung für nur zwei zusätzliche Werte nicht lohnte.

Aus den übrigen Daten wurden Rekombinationshäufigkeiten nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Rekombinationen}}{\text{Anzahl der nicht rekombinierten Nachkommen}} \times 100 = X\%$$

**Tab. 2 : Rekombinationshäufigkeiten**

AFLP-Marker:	untersuchte Nachkommen:	% Rekombination:	Sequenz:	PCR-Marker:
sp1	175	0.6	398 bp	STS
sp4	68	3.0	152 bp	
sp5	177	1.7	409 bp	STS
sp6	19		127 bp	
np1	177	0.6	245 bp	CAPS
np2	80	4.5	99 bp	
np3	69	3.0	-	
np4	176	1.7	404 bp	STS

In dieser Tabelle sind die Zahl der für jeden Marker untersuchten Nachkommen, die Anzahl der Rekombinationen und die daraus berechneten Rekombinations-häufigkeiten zusammengefaßt. Dabei entspricht der Wert für die Rekombinations-häufigkeiten dem Abstand in cM der Marker vom Gen.

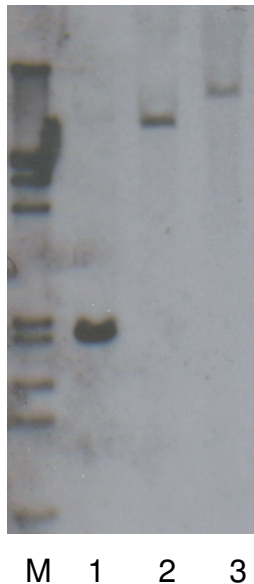
Es zeigte sich, dass die Marker np 1, sp 1 und sp 5 bereits in einem Bereich von unter 2 cM vom gesuchten Gen entfernt liegen. Dies entspricht in *Chlamydomonas reinhardtii* einer Entfernung von maximal 200 kb, was nahe genug für den Einsatz dieser Sonden für ein BAC-Screening ist. Das Vorhandensein der anderen Marker wurde nicht in allen Nachkommen überprüft, da die durchgeführten Analysen schon zeigten, dass diese Marker weiter vom Gen entfernt sind.

Mit Hilfe der AFLP-Methode wurden ganz offensichtlich sehr eng an das Gen gekoppelte Marker identifiziert, für keinen Marker wurden in den hundert von Nachkommen mehr als drei Rekombinationsereignisse beobachtet. Diese geringe Zahl von Rekombinationen läßt statistisch keine Rückschlüsse auf die Orientierung der Marker zueinander zu.

### 3.3. Screening einer BAC-Bibliothek

Die gefundenen hoch gekoppelten AFLP – Marker sollten zum Screening eines High density Macroarrays von ca. 15.000 BAC – Klonen von genomischer DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet werden.

Die AFLP-Marker np 1, sp 1 und sp 5 wurden für ein erstes Durchmustern der BAC-Bibliothek ausgewählt, da sie die geringste Rekombination zwischen Marker und gesuchtem Gen aufwiesen und jeweils nur einmal im Genom vorkamen. Dies wurde in Southern Blots mit genomischer DNA aus dem für die Bibliothek verwendeten Stamm cc 503 überprüft (Abb. 11).



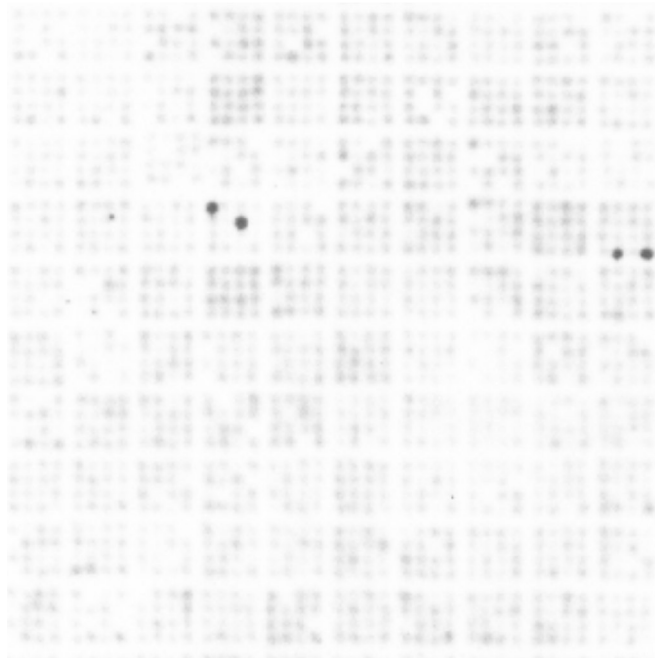
**Abb. 11: Southern Blot von cc 503, hybridisiert mit der Sonde np 1**

In den Spuren 1, 2 und 3 sind Restriktionen genomischer DNA aus dem Stamm cc 503 mit den Enzymen *Pst* I, *Bam*HI und *Eco*RI aufgetragen. Die Membran wurde mit der Sonde np 1 hybridisiert, es zeigt sich, dass dieser Marker nur einmal im Genom vorkommt.

Marker: Dig-Längenstandard III (Roche)

Der BAC-Membranfilter wurde nacheinander mit den drei alkalilabil Digoxigenin-markierten Markern hybridisiert und detektiert und nach jeder Hybridisierung durch Stripping wieder von den Signalen befreit. Auf der Membran sind jeweils acht verschiedene Klone in einem Quadrat von 16 Punkten doppelt aufgetragen, so dass positive Klone immer ein charakteristisches Muster von zwei Punkten ergeben. Aus der Anordnung der

Punkte zueinander und der Position des 16er Feldes ergibt sich die Bezeichnung des Klon, die aus der Nummer der Ursprungsmikrotiterplatte und den Koordinaten auf der Platte zusammengesetzt ist (Abb.12).



**Abb. 12: BAC-Membranfilter mit 2 positiven Klonen**

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einem Röntgenfilm des Membranfilters nach Hybridisierung mit der Sonde np 1 und Detektion. Es befinden sich zwei positive Klone auf dem Ausschnitt.

Mit Hilfe der drei Sonden wurden eindeutig je 8, 12 und 3 Klone identifiziert. Dies stimmt gut mit der Tatsache überein, dass das gesamte Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* ca. acht mal in der BAC – Bank enthalten sein soll, d. h. dass jeder genomische Abschnitt, der deutlich kleiner als die Inserts der BAC-Plasmide ist, in durchschnittlich acht Klonen vertreten sein sollte. Es zeigte sich außerdem, dass auch die nichtradioaktive Markierung und Detektion sehr klare Signale ohne Hintergrund lieferte.



**Tab. 3: Liste der identifizierten BAC - Klone**

Marker	Identifizierte BAC - Klone	Anzahl Klone
np 1	2b7, 12h7, 14a5, 19l2, 27p23, 28c12, 36c3, 40i23	8
sp 1	2c24, 2p17, 4a22, 4n19, 12d12, 14m18, 15g3, 15f16, 19j16, 26a11, 26m14, 40g19	12
sp 5	18p13, 31l23, 39n7	3

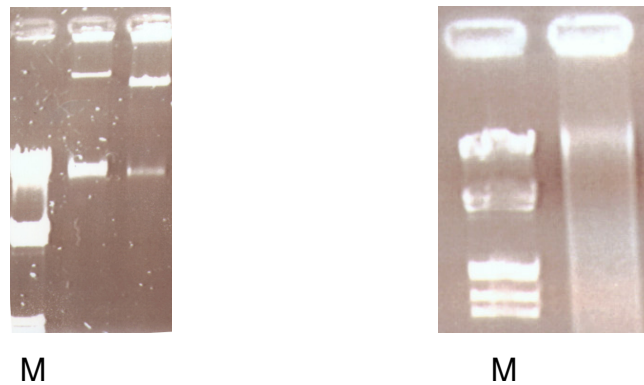
Für jede der drei Sonden sind die gefundenen Klone aufgelistet. Alle auf dem Membranfilter identifizierten BACs wurden auch in Southern Blots nochmals überprüft.

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, wurden mit jedem der drei Marker unterschiedliche Klone gefunden. Da keine alten Signale mehr mitdetektiert wurden, konnte so bereits darauf geschlossen werden, das zwischen den jeweiligen Klongruppen (Contigs) noch Lücken sein mußten, die es durch Identifizierung weiterer Klone zu schließen galt.

### 3.4. Chromosome walking mit BAC-Contig-Enden

#### 3.4.1. BAC-Plasmid-DNA

BAC-Plasmide lassen sich aufgrund ihrer immensen Größe nicht mit normalen Plasmidisolierungskits gewinnen. Die riesigen DNA-Moleküle binden viel zu stark an die Aufreinigungssäulen und lassen sich nicht wieder eluieren. Einige Firmen haben daher spezielle Kits für die BAC-Aufreinigung entwickelt, und drei davon wurden während dieses Projekts getestet. Bei den Kits der Firmen Sigma und Qiagen konnte trotz mehrmaliger Versuche und Rücksprache mit den Firmen keinerlei Plasmid-DNA gewonnen werden, beim NucleoBond BAC 100 Kit der Firma Macherey – Nagel konnte zwar einmal eine schwache Plasmid- Bande im Testgel nachgewiesen werden, die Ausbeute lag jedoch um Zehnerpotenzen unter der der Standardmethoden (Abb. 13) und stand in keinerlei Verhältnis zum bei diesem Kit doch recht großen Aufwand. Die zwei Banden, die in der Standardpräparation zu sehen sind, stellen die relaxierte (open circular) und überspiralisierte (supercoiled) Form des Plasmids dar.



**Abb. 13: BAC-Plasmid-DNA**

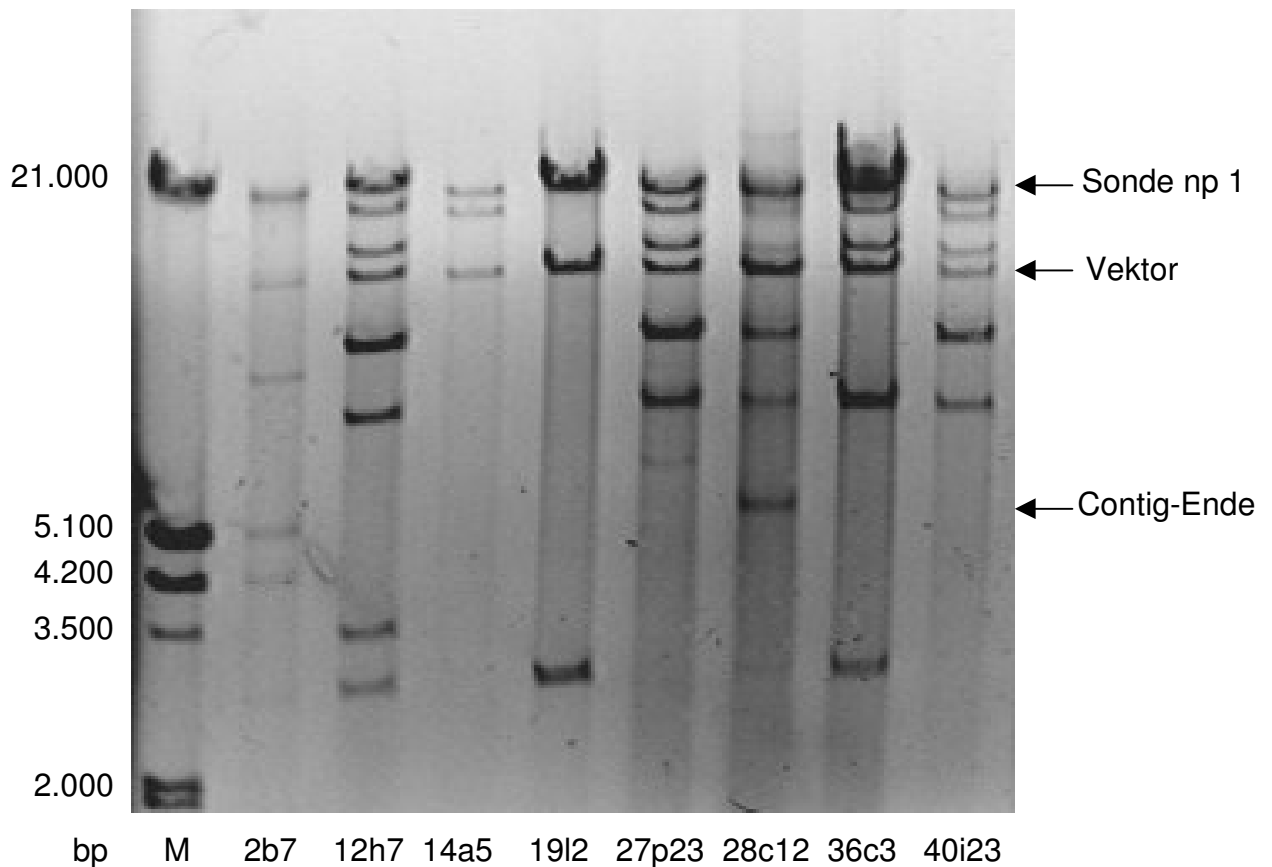
Links ist eine DNA-Präparation nach der Standardmethode, rechts eine mit dem NucleoBond 100 Kit gezeigt. Die Ausbeute und Qualität der Plasmid-DNA sind im Falle der Standardpräparation deutlich besser. Als Marker sind jeweils 6 µl Längenstandard III (Roche) aufgetragen. Als Ausgangsmaterial dienten je 500 ml Übernachtskultur, es ist 1/100 der Präparation aufgetragen.

Um die Lücken zwischen den einzelnen Klongruppen zu schließen, wurden die Klone jeder Sonde in sogenannten Contigs angeordnet. Hierzu wurden Restriktionsmuster für die einzelnen Klone bestimmt. Zur Herstellung der BAC-Bibliothek wurde die Gesamt-DNA nur partiell verdaut, so dass unterschiedlich große Fragmente in die BACs eingebaut wurden. Da alle Klone auf jeden Fall den zur Sonde komplementären genomischen Bereich enthalten, ist ein gewisser Teil der Restriktionsfragmente in allen BACs zu finden. Durch die unterschiedliche Größe der Inserts gibt es aber auch Fragmente, die nur in den längeren BACs auftauchen. Da diese längeren Stücke auf beiden Seiten der gemeinsamen Fragmente liegen können, lässt sich durch ein „Sortieren“ der Restriktionsmuster für die einzelnen BACs ein Contig erstellen, auf dem die beiden zu beiden Seiten längsten Klone identifiziert werden können.

Nutzt man nun diese Enden zur Herstellung neuer Sonden, können weitere Klone gefunden werden, die den Contig an den jeweiligen Enden verlängern.

## 3.4.2. Erstellung von Contigs anhand von Agarose-Gelelektrophoresen

Die besten Ergebnisse wurden erzielt bei einem einfachen Verdau mit *HindIII* und anschließender Auftrennung bei ca. 110 V in 0,6igen % TAE-Gelen. Diese sehr instabilen Gele sind zwar in der Handhabung etwas schwieriger, jedoch waren nur hier auch die häufig vorkommenden sehr großen Fragmente (über 10.000bp) deutlich getrennt sichtbar. Nach Anfärbung der Fragmente mit Ethidiumbromid wurden die Gele fotografiert und die Größen der Fragmente bestimmt (Abb. 14). Für einzelne BACs mußten mehrere Gelelektrophoresen mit unterschiedlichen Ausgangsmengen und Auftrennungszeiten durchgeführt werden, um alle Banden sicher zu erfassen.



**Abb. 14: Agarosegel mit Restriktionsmuster zur Erstellung eines Contigs**

Gezeigt sind alle 8 *HindIII* – geschnittenen Klone, die mit der Sonde np 1 gefunden wurden. Die Pfeile markieren die Vektor- und die Sondenbande, die in allen Klonen vorkommen müssen, sowie eine nur in einem Klon vorkommende Bande, die ein Contig-Ende darstellt. (M: Längenstandard III (Roche)). Zur besseren Darstellung wurde das Originalbild invertiert.

Diese Ergebnisse wurden für jede mit einer Sonde gefundene Gruppe von Klonen in einer Tabelle zusammengefaßt (siehe Tab. 4). Alle aufgetretenen Fragmentgrößen wurden aufgelistet und das Vorhandensein einer entsprechenden Bande im jeweiligen Klon in der Tabelle vermerkt.

**Tab. 4: Tabellarische Darstellung eines Restriktionsmusters**

	np1			V								
Fragment- größe (kb)	22,5	19,1	15,1	13,4	10,3	8,4	7,7	5	4	3,4	3	2
BAC												
2b7	x			x		x		x	x		x	x
12h7	x	x	x	x	x		x			x	x	
14a5	x	x		x								
19l2	x			x							x	
27p23	x	x	x	x	x		x					
28c12	x	x	x	x	x		x	x			x	
36c3	x	x	x	x			x				x	
40i23	x	x	x	x	x		x					

In dieser Tabelle sind alle gefundenen Restriktionsfragmente eines *Hind*III-Verdaus der np 1-BAC-Klone der Größe nach geordnet aufgeführt. Für jeden BAC-Klon ist das Vorhandensein des entsprechenden Fragments eingetragen.

Diese Tabellen dienen dann als Grundlage für die Erstellung sogenannter Contigs, bei denen die BACs anhand ihrer Restriktionsmuster so zueinander angeordnet wurden, dass identische Fragmente jeweils untereinander liegen und die Fragmente, die nur in einigen BACs vorkamen, jeweils rechts und links von diesen gemeinsamen Bereichen zu liegen kommen (siehe Tab. 5a-c).

**Tab. 5 a - c: Contigs der einzelnen BAC-Klongruppen**

<b>a)</b>						np1	V						Gesamt- größe (kb)
Fragment- größe (kb)	2	8,4	4	5	3	22,5	13,4	19,1	15,1	7,7	10,3	3,4	120
BAC													
2b7	x	x	x	x	x	x	x						58,3
12h7					x	x	x	x	x	x	x	x	94,5
14a5						x	x	x					55
19l2					x	x	x						38,9
27p23						x	x	x	x	x	x		88,1
28c12				x	x	x	x	x	x	x	x		96,1
36c3					x	x	x	x	x	x			80,8
40i23						x	x	x	x	x	x		88,1

<b>b)</b>						V			sp 1								Gesamt- größe (kb)
Fragment- größe (kb)	3,4	6,3	7,5	9,8	1,8	13	8,4	20	4,4	12	1,9	4,9	16	5,8	5,2	3,5	124
BAC																	
2c24	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						89
2p17			x	x	x	x	x	x	x	x							79
4a22					x	x	x	x	x	x	x						62
4n19	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				110
12d12						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	82
14m18		x	x	x	x	x	x	x	x	x							83
15f16		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					90
15g3			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					84
19j16		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	121
26a11	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					94
26m14r		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					90
40g19	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			115

<b>c)</b>					sp5	V				Gesamt- größe (kb)
Fragment- größe (kb)	2	20	3	21	22	13	8,5	4	21,5	115
BAC										
18p13	x	x	x	x	x	x	x	x		93,5
31l23					x	x	x	x		47,5
39n7				x	x	x	x	x	x	90

In den Tabellen 5a-c sind die Restriktionsfragmente so angeordnet, das die nach beiden Seiten jeweils längsten BACs erkennbar sind. Die Reihenfolge der Fragmente ist jedoch beliebig. Die Vektorbande und die Bande, die die zur verwendeten Sonde komplementäre Sequenz enthält, sind jeweils angegeben.

a) Sonde np 1; b) Sonde sp 1; c) Sonde sp 5;

### 3.4.3. Umwandlung von Contig-Enden in neue Marker

Ausgehend von den drei mit den AFLP-Markern gefundenen Contigs sollte ein zusammenhängender Gesamtcontig erstellt werden, der alle Marker und das gesuchte Gen enthält. Dazu wurden aus den Enden der einzelnen Contigs neue Sonden erstellt, mit denen die BAC-Bibliothek erneut durchgemustert wurde. Beispielhaft soll dies für den np 1-Contig näher dargestellt werden. Das Ende des Klon 2b7 wurde nach Linearisierung mit *NheI* durch eine T7-Transkription mit Dig-markierten Nukleotiden in eine Sonde verwandelt. Diese wurde mit Y bezeichnet. Das andere Ende des Contigs im Klon 12h7 wurde zunächst mit der ChemLink-Methode direkt markiert und in einem Southern

Blot mit Gesamt – DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* auf Kopienzahl im Genom überprüft. Nachdem sich herausstellte, dass es nur in einer Kopie vorliegt, wurde es subkloniert und durch In-Vitro-Transkription in eine alkalilabil markierte, d.h. wieder von der Membran zu entfernende Sonde (Z) verwandelt. Mit diesen BAC – End – Sonden wurden neue Klone auf dem BAC – Filter identifiziert, die mit dem Ursprungscontig überlappen. Der so auf 266 kbp vergrößerte np 1 - Contig ist in Abb. 15 dargestellt. Tab. 6 a – c zeigt alle mit neuen BAC – Endsonden erstellten Contigs. Eine schematische Darstellung der drei Ursprungscontigs und ihrer Erweiterungen durch diese Contigs ist in Abb. 16 zu sehen.

**Tab. 6 a - c: Contigs der einzelnen BAC-Klongruppen**

<b>a)</b>			X			V			Gesamt- größe (kb)
Fragment- größe (kb)	4	5	5,5	6	22	13	3,7	10	69,2
BAC									
13m10	x	x	x	x	x	x		x?	65,5
13n8	x	x	x	x	x	x			55,5
16d24			x	x	x	x	x		50,2

<b>b)</b>							Y		V					Gesamt- größe (kb)
Fragment- größe (kb)	30	6	5	9	4	24	1,7	49	14	10	4,3	8	19	184
BAC														
11a23					x	x	x	x	x	x	x			107
11e5							x	x	x					64,7
15h22							x	x	x	x	x	x		87
16d20							x	x	x	x	x			79
19a5						x	x	x	x	x	x		x?	122
22h4							x	x	x	x	x			79
22o18							x	x	x			x?		72,7
29e18	x	x	x	x	x	x	x	x	x					142,7

c)						V	Z							Gesamt- größe (kb)
Fragment- größe (kb)	6	4,2	15	13	3,5	13	4	10	18	8	14	17	3	128,7
BAC														
12h7						x	x	x	x	x	x	x	x	84
4d3					x	x	x	x	x	x				56,5
6j20						x	x	x	x					45
28l20	x	x	x	x	x	x	x							58,7
30l10					x	x	x	x	x					48,5

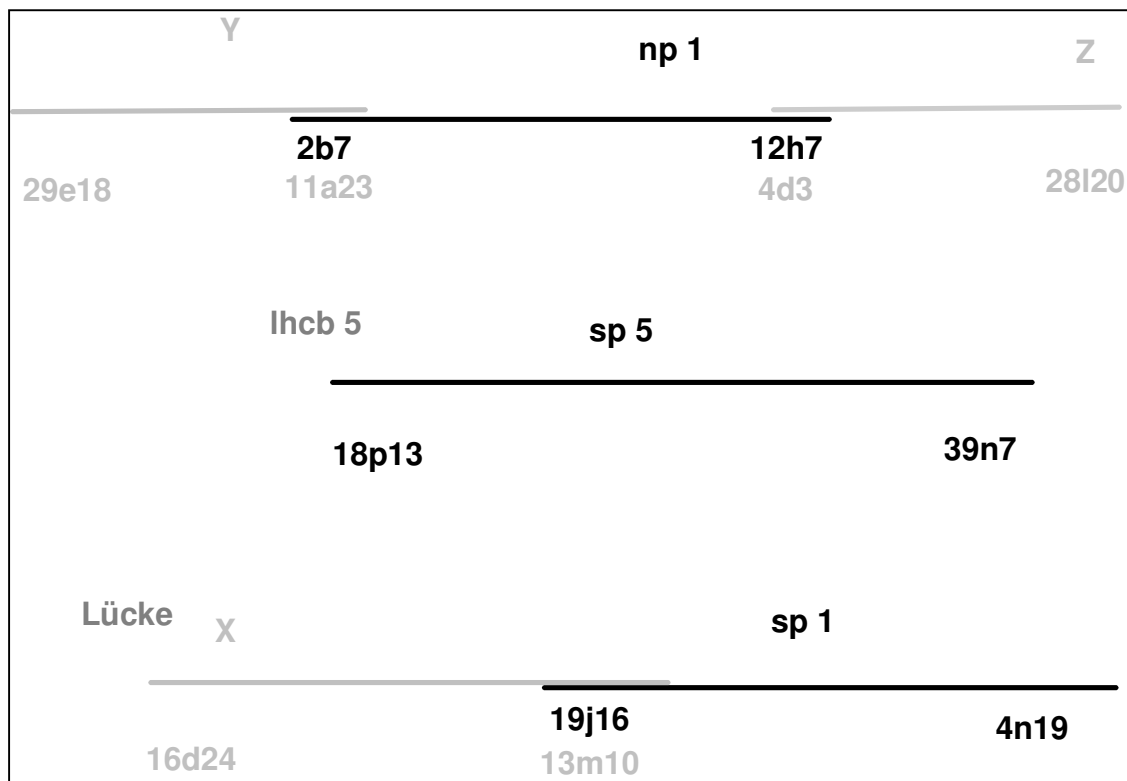
Auch in diesen Tabellen sind die Restriktionsfragmente so angeordnet, das die nach beiden Seiten jeweils längsten BACs erkennbar sind. Die Reihenfolge der Fragmente ist jedoch beliebig. Die Vektorbande und die Bande, die die zur verwendeten Sonde komplementäre Sequenz enthält, sind jeweils angegeben.

a) Sonde X; b) Sonde Y; c) Sonde Z;

Der Contig np 1 konnte in beide Richtungen verlängert werden (Abb. 15). Der sp 1- Contig konnte zu einer Seite hin verlängert werden, diese Verlängerung endete aber in einer „Sackgasse“. Mit einer Endsonde aus 16d24 wurde beim Screening der Bibliothek wieder nur dieser Klon gefunden, hier scheint also der statistisch unwahrscheinliche, aber mögliche Fall aufgetreten zu sein, das trotz des zufälligen partiellen *HindIII*-Verdaus bei Erstellung der Bibliothek keine Fragmente einkloniert wurden, die nicht an genau der gleichen Stelle geschnitten wurden.



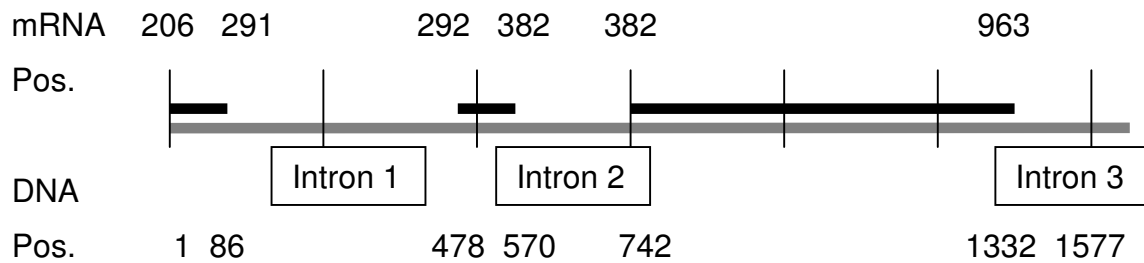




### Abb.16: Schematische Übersicht über die Contigs

Die drei ursprünglichen Contigs, die jeweils längsten BAC-Klone und die mit BAC-Endsonden gefundenen neuen Contigs sind schematisch dargestellt. Am Ende des X-Contigs ist eine Lücke in der BAC-Bibliothek, das eine Ende des sp 5-Contig besteht aus der lhcb5-Sequenz.

Aus dem 39n7 – Ende des sp 5- Contig konnte in mehreren Versuchen keine geeignete Sonde hergestellt werden. Die andere Seite dieses Contigs lies sich zwar in eine Sonde verwandeln, bei der routinemäßigen Sequenzierung stellte sich jedoch heraus, das es sich um Teile des *lhcb5*- Gens handelte. Dieses ist ein Mitglied einer Genfamilie mit sehr ähnlichen Sequenzen, so dass es nicht ohne weiteres möglich ist, eine Sonde zu konstruieren, die nur an der richtigen Stelle im Genom binden würde. Da von diesem Gen bisher nur eine mRNA – Sequenz bekannt ist, wurden Teile des Gens, die noch auf den subklonierten Fragmenten des BAC-Klons 18p13 lagen, sequenziert. Dabei konnten zwei vollständige und der Anfang eines dritten Introns identifiziert werden. Eine Übersicht über neu sequenzierte und bereits bekannte Bereiche findet sich in Abb. 17, die gesamte Sequenz ist im Anhang D dargestellt.

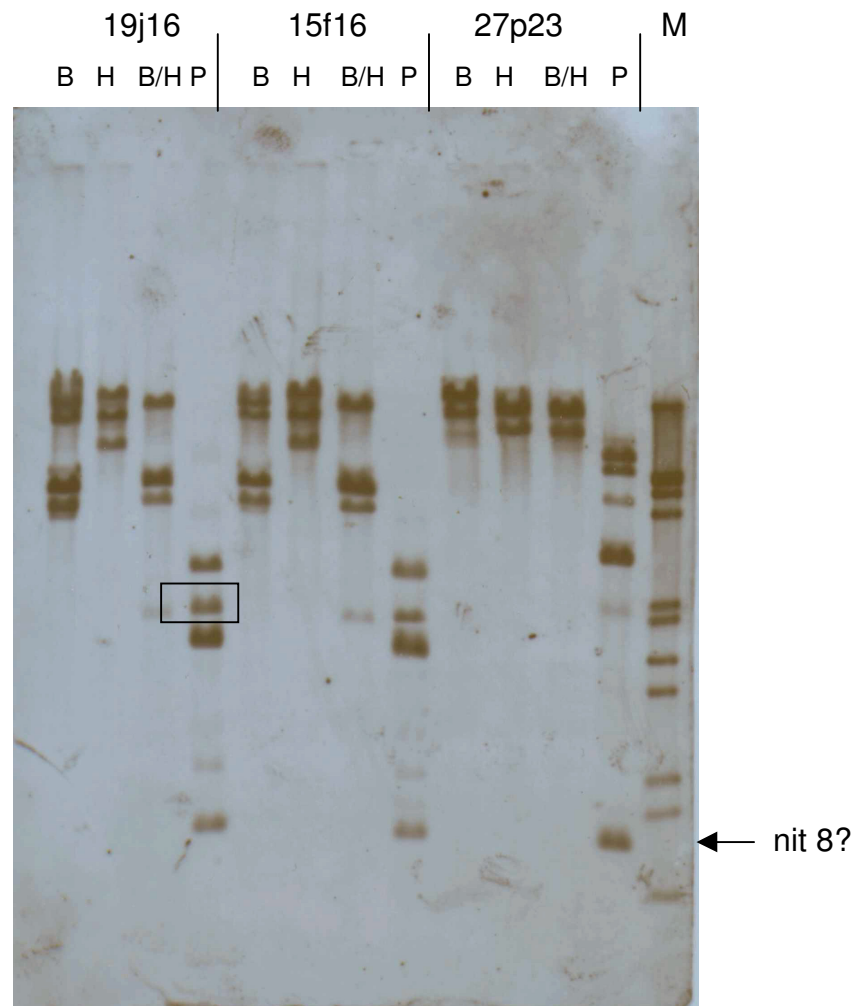


**Abb. 17: Schematische Übersicht *lhcb 5***

Als grauer Balken ist schematisch der neu sequenzierte genomische Bereich dargestellt, die schwarzen Balken markieren die Lage der jeweiligen Exons aus der mRNA – Sequenz. Introns sind als Kästchen dargestellt. Die jeweiligen Positionen in der mRNA – und DNA – Sequenz sind ebenfalls angegeben.

### 3.5. Identifizierung und teilweise Sequenzierung eines Kandidatengens

Zur Vorbereitung möglicher Transformationsexperimente mit BAC-Plasmiden wurden einige Klone auf das Vorhandensein möglicher Kandidatengene überprüft. Hierzu wurde ein Southern Blot mit verschiedenen Restriktionsverdau von BAC-Klone 19j16, 15f16 und 27p23 mit einer sog. Eberwine-Sonde hybridisiert. Diese Sonde wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. Werner zur Verfügung gestellt. Sie besteht aus Dig-markierter Gesamt-mRNA einer synchronen Kultur von *Chlamydomonas reinhardtii*, d. h. sie bindet zu allen zum Zeitpunkt der Probennahme transkribierten Genen (Abb. 18).



**Abb. 18: Southern Blot Hybridisierung von BAC-Plasmid-DNA mit einer Eberwine-Sonde**

Die BAC-Klone 19j16, 15f16 (sp 1) und 27p23 (np 1) wurden jeweils mit *Bam*HI, *Hind*III, *Bam*HI/*Hind*III und *Pst* I verdaut, aufgetrennt und geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Eberwine-Sonde, die zu allen transkribierten Genen bindet. In allen Klonen fanden sich mehrere positive Signale. Marker: Dig-λEcoHind (Roche)

Die Hybridisierung zeigte in allen drei Klonen positive Signale. Für die beiden sp 1 – Klonen 19j16 und 15f16 ergab sich wie erwartet ein identisches Muster, überraschend ist die ca. 700 bp große Bande, die in allen BACs vorkommt. Die Klonierung und Sequenzierung dieser Bande sowohl aus dem Klon 19j16 als auch aus dem Klon 27p23 (np 1) zeigte, dass es sich tatsächlich um identische Fragmente handelt. Die Sequenz enthält einen UG – Repeat. Möglicherweise handelt es sich hierbei um das nit8 – Gen, das bei

Konstruktion der Bibliothek als Marker in den Vektor eingebaut wurde (P. Kathir, pers. Mitt.). Die vollständige Sequenz befindet sich im Anhang E.

Die in der Abbildung eingerahmte Bande wurde ebenfalls kloniert und sequenziert. Auch sie enthält einen UG – Repeat. Ein Vergleich mit der EST-Datenbank für *Chlamydomonas reinhardtii* zeigte, dass die gefundene Sequenz Teil eines Contigs aus mehreren ESTs war. Dieser Contig enthält in der Nähe des ersten einen weiteren UG-Repeat in der 3' - untranslatierten Region. Diese Repeats können in *Gonyaulax* und *Chlamydomonas reinhardtii* als Bindungsstelle für *clock controlled translational regulators* (CCTRs) dienen (Mittag, 1996). Die Sequenz des EST – Contigs und des klonierten Kandidatengens befindet sich im Anhang F.

### 3.6. Erzeugung von Doppelmutanten für Transformations-experimente

Um Kandidatengene eindeutig auf ihre Eigenschaft als Periodikgen überprüfen zu können, wurden durch Kreuzungen Stämme erzeugt, die sowohl nitratreduktasedefizient sind als auch den Periodentyp der Mutante zeigen. Dazu wurde der Stamm cc 2678<sup>+</sup>, der sowohl einen Zellwanddefekt aufweist als auch nitratreduktasedefizient ist, mit dem Kurzperiodikstamm 9.2.3<sup>-</sup> gekreuzt. Durch den Zellwanddefekt konnten die Zellen nicht wie üblich auf Agarplatten verschoben werden, sondern mussten speziell ausplattiert werden. Insgesamt wurden 283 Kreuzungsnachkommen erzeugt, 240 wurden aus Kolonien von ausplattierten und ausgekeimten Zygoten isoliert, weitere 43 durch vorsichtiges Verschieben der ersten 4 bzw. 8 Tochterzellen einer Zygote. Die bei der Kreuzung entstandenen nitratreduktasebedürftigen Stämme wurden durch Anzucht auf selektivem Medium identifiziert. 26 % der ausplattierten und 40 % der verschobenen Nachkommen erwiesen sich als bedürftig. Diese 80 bedürftigen Stämme wurden mit Hilfe der Photoakkumulationsreaktion auf ihre Periodenlänge überprüft. 10 Stämme konnten eindeutig als nitratreduktasedefiziente Kurzperiodikstämme identifiziert werden. Damit steht nun das Ausgangsmaterial für Rescue – Experimente durch Kotransformation von Kandidatengenen zusammen mit dem Nitratreduktasegen zur Verfügung.

## 4. Diskussion

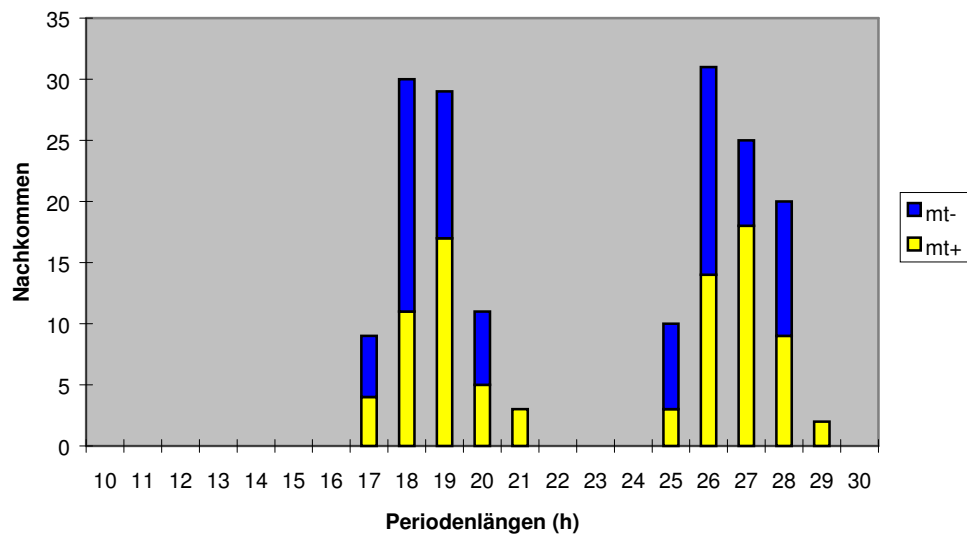
Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wird schon seit mehr als 30 Jahren als Modellorganismus in der Erforschung circadianer Systeme benutzt. Seither sind sehr viele circadian gesteuerte physiologische Vorgänge beschrieben worden, und es existieren mehrere Periodenlängenmutanten (Bruce, 1972, Mergenhagen, 1984). Außerdem stehen zahlreiche gut etablierte molekularbiologische Methoden zur Verfügung (Übersicht in Werner, 2002), und vor ca. zwei Jahren wurde begonnen, sowohl eine expressed sequence tag (EST) – Datenbank aufzubauen als auch das gesamte Genom zu sequenzieren. Trotzdem ist bisher noch sehr wenig über molekulare Mechanismen der inneren Uhr in *Chlamydomonas reinhardtii* bekannt.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der hohe GC-Gehalt des Genoms von *Chlamydomonas reinhardtii* den routinemäßigen Einsatz einiger in höheren Pflanzen angewendeten Methoden verhindert oder zumindest erschwert. Dies gilt z. B. für den Einsatz von Luziferase als Reporter gen für die Analyse der Genexpression, aber auch für Standardmethoden wie PCR, DNA - Präparation oder die durchschnittliche Häufigkeit von Restriktions-schnittstellen. Einige dieser Schwierigkeiten konnten im Rahmen dieser Arbeit durch Anpassung an die spezielle Situation in *Chlamydomonas reinhardtii* überwunden werden.

Mit dieser Arbeit sollte versucht werden, diese Diskrepanz zwischen der Fülle von physiologischen Daten und dem Fehlen einer molekularbiologischen Aufklärung zu schließen, indem das Periodik – Gen *Uhr1* kartiert und Vorbereitungen zu seiner Klonierung getroffen wurden.

In unserem Labor steht eine Periodenlängenmutante (9.2.3<sup>-</sup>) mit deutlich verkürzter Periodenlänge zur Verfügung, die physiologisch sehr gut charakterisiert ist (Mergenhagen, 1984). Dieser Stamm entstand aus einer Rückkreuzung von Nachkommen einer Kreuzung zwischen dem Wildtypstamm 137c und der spontan entstandenen Kurzperiodik – Mutante s<sup>-</sup> mit dem Wildtyp. Diese Rückkreuzung wurde durchgeführt, da bei der ursprünglichen Kreuzung zwar 50% der Nachkommen wieder die Wildtyp – Periodenlänge zeigten, die anderen 50% der Nachkommen jedoch nur zur Hälfte wieder eine verkürzte Periode zeigten. Die anderen 25% der Nachkommen waren arhythmisch. Nach der Rückkreuzung spalteten die Nachkommen nach der Mendelschen Regel immer je zur Hälfte in solche mit Kurzperiodik und Wildtyp – Phänotyp auf, die Arhythmizität eines Teils der Nachkommen war also auf einen Faktor zurückzuführen, der nur im Wildtyp vorkam und durch die Rückkreuzung wegfiel. Nachkommen von Kreuzungen zwischen wt<sup>+</sup> und 9.2.3<sup>-</sup>, die die Grundlage für diese Arbeit bildeten (Stämme 102.X.X, 103.X.X), ließen sich immer eindeutig einem der beiden Periodentypen zuordnen. Dies ist möglich, da der Periodenlängenunterschied zwischen beiden Stämmen größer ist als die in *Chlamydomonas reinhardtii* zu beobachtende recht große Streubreite an Periodenlängen in individuellen Messungen. So liegen die für den Wildtyp gemessenen Periodenlängen zwischen 24 und 28 h, mit einem Durchschnitt von 26,2 h. Für den Stamm 9.2.3<sup>-</sup> liegt der Mittelwert bei 18,4 h (D. Mergenhagen, pers. Mitt.).

In hunderten von überprüften Nachkommen wurden keine Stämme gefunden, die eine Periodenlänge zwischen 21 und 22 h zeigten, so dass der Periodentyp immer eindeutig zu bestimmen war. Außerdem zeigten immer 50% der Nachkommen einer Zygote den einen, die anderen den anderen Periodentyp (Abb. 19).



**Abb. 19: Häufigkeitsverteilung der mittleren Periodenlängen von Kreuzungsnachkommen der Kurzperiodik-Mutante mit dem Wildtyp**

Dargestellt sind die gemessenen Periodenlängen in Nachkommen von Kreuzungen zwischen Wildtyp und Kurzperiodikmutante, eingeteilt in Klassen von je 1 h. Trotz großer Streubreite für die jeweiligen Periodentypen ist eine eindeutige Zuordnung zu einem Periodentyp möglich, da keine Überlappung zwischen den einzelnen Gruppen auftritt.

Dies deutet ganz stark darauf hin, dass nur ein Genort für den Unterschied in der Periodenlänge verantwortlich ist. Solche Periodenlängenmutanten waren die Grundlage für die Isolierung und Charakterisierung von Komponenten des zentralen Oszillators in verschiedenen Organismen.

Momentan steht noch keine Methode zur Verfügung, mit Hilfe eines Promotor – Luziferase – Konstrukts wie in *Synechococcus* (Kondo et al., 1993) oder *Arabidopsis* (Millar et al., 1995) automatisiert und schnell eine große Anzahl von Stämmen auf ihre Periodenlänge hin zu untersuchen. Dies würde eine nähere Bestimmung des Genorts *Uhr1* durch Rescue – Experimente mit Gesamt – DNA – Banken ermöglichen, indem ein Kurzperiodikstamm mit einer solchen Bank aus Wildtyp - DNA transformiert wird und solche Transformanten identifiziert werden, die wieder die Wildtyp – Periodenlänge aufweisen. In *Chlamydomonas reinhardtii* ist eine Überprüfung des Periodentyps jedoch nicht im Hochdurchsatz möglich, und die Periodenlänge an sich stellt auch keinen im Labor großmaßstäblich selektierbaren Phänotyp dar.

Daher sollten in dieser Arbeit mit Hilfe der AFLP-Methode molekulare Marker gefunden werden, die nahe genug an diesem Genort liegen, um sie für das Durchmustern einer BAC-Bibliothek von *Chlamydomonas reinhardtii* zu benutzen. Dadurch sollte es ermöglicht werden, den gesuchten Genort möglichst genau zu kartieren, damit dann durch Kotransformation möglicher Kandidatengene in nitratreduktasedefiziente Stämme eine spätere Klonierung des Periodik – Gens *uhr 1* erfolgen kann.

AFLPs wurden bereits erfolgreich z. B. in *Elaeis guineensis* (Singh, 1998) und *Arabidopsis* (Vos, 1998) für die Generierung molekularer Marker eingesetzt, in *Sorghum* (Klein et al., 2000) wurden mit AFLP-Markern BAC-Contigs für ein Sequenzierungsprogramm erstellt. In *Chlamydomonas reinhardtii* wurden bereits zahlreiche Gene anhand von RFLP-Markern kartiert (Ranum et al., 1988). AFLPs haben jedoch den großen Vorteil, dass sie durch die beiden zusätzlichen Amplifikationsschritte eine direkte Markierung der Fragmente erlauben, so dass anders als bei RFLP-Analysen keine Sonden benötigt werden. Es ist also vorab keinerlei Sequenzinformation nötig. Die Methode wurde in unserem Labor zunächst anhand der Identifizierung von Markern für den Paarungstyp für *Chlamydomonas reinhardtii* optimiert (Werner, 2001). Wie bereits von P. Vos (1998) beschrieben, ist eine wichtige Voraussetzung für die AFLP-Analyse, dass für die Restriktion DNA in guter Qualität zur Verfügung steht, so dass sich tatsächlich die gesamte DNA vollständig schneiden läßt. Für *Chlamydomonas reinhardtii* stand zu Beginn dieser Arbeit kein kommerziell erhältliches DNA-Präparationskit zur Verfügung, das diesem Anspruch genügt hätte. So mußte auf die zeitaufwändige Standardmethode nach Newman et al. (1990) zurückgegriffen werden, die nicht ohne Phenol auskommt. Inzwischen wurde jedoch von der Firma PeqLab ein DNA-Extraktionskit auf Basis einer Silikagelmatrix und spezieller Pufferlösungen entwickelt, mit dem DNA in ausreichender Qualität extrahiert und eventuelle Enzyminhibitoren inaktiviert werden konnten. Die Zellaufschlußmethode war jedoch für Pflanzengewebe optimiert und mußte für die einzellige Alge *Chlamydomonas reinhardtii* angepaßt werden. Es zeigte sich, dass die Verwendung der Aufschlußmethode nach Newman et al. (1990) mit SDS-EB-Puffer die Probleme beim Materialaufschluß beseitigen konnte. Nun steht also



auch ein für den Hochdurchsatz geeignetes System für die DNA-Präparation aus *Chlamydomonas reinhardtii* zur Verfügung.

Ein weiterer entscheidender Punkt für das Gelingen von AFLPs ist eine effiziente Restriktion und Ligation der Adapter für die anschließenden PCR-Amplifikationen. Dies wird erreicht, indem nach dem Schneiden im gleichen Ansatz Adapter ligiert werden, die die Erkennungssequenz für das jeweilige Enzym zerstören. Da das Restriktionsenzym ebenfalls weiterhin aktiv ist, werden religierte Restriktionsfragmente solange wieder geschnitten, bis statt eines genomischen Fragments ein Adapter ligiert ist. In der Praxis hat sich jedoch gezeigt, dass sich wohl durch Methylierung von Schnittstellen manche Proben auch in mehreren Versuchen nicht effizient schneiden ließen. Diese mußten von der weiteren Analyse ausgeschlossen oder mit anderen Methoden (STS-, CAPS-PCR) überprüft werden.

Außerdem mußte die Anzahl an verwendeten selektiven Basen im zweiten Amplifikationsschritt an das relativ kleine Genom (ca. 100 MB) von *Chlamydomonas reinhardtii* angepaßt werden. Durch die Anzahl dieser selektiven Basen wird die Menge an amplifizierten Fragmenten beeinflusst, da jede Base, die in das Insert hereinragt, dazu führt, dass der entsprechende Primer nur noch zu ca. einem Viertel der Fragmente vollständig komplementär ist. Für *Chlamydomonas reinhardtii* erwies sich eine selektive Base auf der Seite des *EcoRI* – Primers und 2-3 selektive Basen auf der *Mse I* – Seite als geeignet (Werner, 2001). Bei Verwendung der selektiven Basen –CA ergab sich eine ausreichend kleine Anzahl von Fragmenten für eine Auftrennung in Polyacrylamidgelen. Waren die ersten beiden selektiven Basen jedoch –GG, wurden zu viele Fragmente amplifiziert, so dass eine weitere Base angehängt werden mußte. Dies erklärt sich leicht über den hohen GC-Gehalt des Genoms.

Insgesamt wurden Analysen mit 15 verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt, bei Verwendung der Primer –CA konnten die Marker np 1 und sp 1 gefunden werden, die Primer –GGA führten zur Entdeckung der Marker np 2, np 4, sp 5 und sp 6. Mit dem Überhang –GGT zeigten sich die Marker np 3 und sp 4.

Alle Sequenzen wurden auch einer Datenbankanalyse unterzogen, um zu überprüfen, ob die Marker zu eventuell schon bekannten Sequenzbereichen

aus *Chlamydomonas reinhardtii* homolog sind. Tatsächlich fand sich eine Homologie des Markers np 3 zum 3' - Ende des *ida 7* Locus (Yang and Sale, 1998), der für eine Komponente des Flagellenaufbaus kodiert. Dieses Gen wurde bereits auf dem äußeren Ende des Chromosoms 18 lokalisiert (Abb. 20). Mit Hilfe dieser Information war klar, dass sich auch das gesuchte Gen *Uhr1* und die dafür gefundenen Marker am Ende dieses Chromosoms befinden müssen. Beim späteren Durchmustern der BAC-Bibliothek von *Chlamydomonas reinhardtii* mit den AFLP-Markern wurden außerdem BAC-Klone identifiziert, die auch den Marker GP 431 enthalten, der von Dr. C. Silflow (University of Minnesota) ebenfalls in dieser Region kartiert wurde.



#### Abb. 20: Karte eines Teils der Linkage Group XVIII

Die Abbildung zeigt einen Arm des Chromosoms 18. Die Abstände zwischen den einzelnen Markern sind in cM angegeben. Einer der gefundenen AFLP-Marker, np 3, zeigt Homologie zum 3' -Ende des Gens *ida 7*, das laut dieser Karte am äußeren Ende des Chromosoms liegt. Der Bereich, in dem die gefundenen Marker und das gesuchte Gen liegen, ist grau unterlegt.

Klassische Kreuzungsversuche mit Stoffwechselmutanten zur Kartierung von *Uhr1* wurden zwar durchgeführt, es konnten aber keinerlei Kopplungen zwischen kartierten Stoffwechselmutationen und der Periodenlänge gefunden werden. Anhand dieser Karte wird auch deutlich, warum diese Versuche fehlschlagen mussten. Die in der Nähe liegenden Marker GP 431 und 223 sowie J 134 und CNB 21 stellen lediglich zufällige genomische Fragmente dar, die nicht näher phänotypisch charakterisiert sind. IDA 7 und DHC 8 markieren zwar die Lage zweier bekannter Gene, beide kodieren jedoch für Bestandteile des Flagellenaufbaus, so dass die entsprechenden Mutanten unbeweglich sind. Solche Mutanten können nicht durch die Photoakkumulationsreaktion auf ihre Periodenlänge hin überprüft werden, da nicht mobile Zellen keine

Phototaxis zeigen können. Es mussten also neue molekulare Marker auf anderem Weg gefunden werden, und dies gelang mit Hilfe der AFLP – Analyse.

Um den Kopplungsgrad der AFLP – Marker an das gesuchte Gen möglichst genau zu bestimmen, mussten sehr viele Kreuzungsnachkommen getestet werden. Hierfür wurden aus den Sequenzen der AFLP-Marker Primer für STS- und CAPS-Marker abgeleitet, die ein schnelles Screening vieler Kreuzungsnachkommen erlaubten. Dabei stellte sich heraus, dass alle Marker tatsächlich sehr hoch an das gesuchte Gen gekoppelt sind, keiner der Marker zeigt Rekombinationshäufigkeiten von über 5%, die meisten liegen deutlich darunter. Für keinen Marker in den z. T. über hundertfünfzig getesteten Nachkommen konnten mehr als 3 Rekombinationsereignisse beobachtet werden, daher ist es nicht möglich, Aussagen über die Orientierung der Marker zueinander zu machen. Es läßt sich lediglich feststellen, dass die Marker sp 1 und np 1 mit nur 0,6% Rekombination am nächsten zum gesuchten Gen liegen. Für das Markerpaar sp 5 / np 4 wurden 168 Nachkommen getestet, sie liegen weiter entfernt als np 1 und sp 1, wobei der Marker sp 5 mit 1,7% Rekombination der drittnächste am Gen zu sein scheint. Da für die restlichen Marker noch keine STS-Marker entwickelt wurden, ist die Zahl der untersuchten Nachkommen nicht so groß. Dies macht bei nur wenigen Nachkommen die statistische Auswertung unsicherer, da ein einziges zusätzliches Rekombinationsereignis das Ergebnis um ganze cM verschieben kann. In diesem Fall ist dies jedoch unerheblich, da für alle diese Marker schon bei den wenigen untersuchten Nachkommen genausoviele bzw. mehr Rekombinationen auftraten als für die anderen Marker. Dies bedeutet, dass selbst für den Fall, dass alle noch nicht untersuchten Nachkommen keine Rekombinationen aufweisen, die entsprechenden Marker nicht näher am Gen liegen sollten als sp 1, np 1 und sp 5.

In *Chlamydomonas reinhardtii* entsprechen Rekombinationshäufigkeiten von 1% in nicht rekombinationssupprimierten Bereichen einem Abstand von ca. 75 kbp (Vashishtha et al., 1996). Da aus den Sequenzvergleichen bereits bekannt war, dass sich die Marker am Ende der Kopplungsgruppe XVIII und nicht in der Nähe des Centromers, einem Bereich mit verminderter Rekombination befinden, wurde angenommen, dass die Marker sp 1, np 1 und

sp 5 so nahe am Gen liegen, dass mit ihnen das Durchmustern einer BAC-Bibliothek mit Klonen einer durchschnittlichen Größe zwischen 50 und 120 kbp möglich sein sollte. Um die Marker jedoch als Sonden für dieses Screening einsetzen zu können, mußte überprüft werden, dass sie nur zu jeweils einer Stelle im Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* hybridisieren. Dies war für alle drei Marker der Fall. Hätten die Marker Sequenzbereiche enthalten, die mehrmals im Genom vorkommen, wären zuviele Klone identifiziert worden, von denen nur ein Teil tatsächlich die gesuchte Stelle im Genom repräsentierten. In diesem Fall hätten alle gefundenen BACs nochmals mit Hilfe einer AFLP-Analyse überprüft werden müssen, um diejenigen Klone zu bestimmen, die genau das richtige polymorphe Fragment enthalten, das ja durch eine genau definierte Länge zwischen den beiden in der AFLP-Analyse verwendeten Schnittstellen charakterisiert ist.

Für das Durchmustern der BAC-Bibliothek empfiehlt der Hersteller die Verwendung radioaktiv markierter Sonden und rät von einem Stripping der Membran ab, da dies bei den harten Bedingungen eines Strippings radioaktiver Sonden die Lebensdauer der Membran drastisch verkürzen würde. Da in unserem Labor jedoch schon lange und sehr erfolgreich mit Digoxigenin - markierten Sonden gearbeitet wurde, sollte diese Methode auch für das Durchmustern des Makroarrays etabliert werden. Es zeigte sich, dass sich die vom Hersteller verwendete Membran problemlos auch mit dem Dig-System hybridisieren und detektieren ließ. Die positiven Signale waren stets klar und deutlich zu erkennen, und es zeigte sich nur ein schwacher Hintergrund. Auch das Entfernen der markierten Gruppen stellte keine Schwierigkeit dar, da das Stripping unter sehr milden Bedingungen erfolgen kann. Mittlerweile wurde die Membran mehr als zehnmal verwendet und wieder gestrippt, und es zeigen sich immer noch klare Signale bei wenig Hintergrund. Ein großer Vorteil der Möglichkeit zur Entfernung alter Signale vor der erneuten Hybridisierung ist die Möglichkeit einer internen Kontrolle neuer Sonden. Wurden aus den Enden bereits identifizierter Klone neue Sonden hergestellt, wurde stets auch der Ursprungsklon mitidentifiziert. Außerdem konnte so bereits vom Hybridisierungsergebnis auf dem Filter auf eine mögliche Überlappung zwischen einzelnen Contigs geschlossen werden.

Aus diesen Sets von mit einer bestimmten Sonde gefundenen Klonen wurden Contigs erstellt, bei denen die jeweils identischen, in mehreren Klonen vorkommenden Fragmente untereinander angeordnet wurden. Zwar entspricht die Reihenfolge der Fragmente nicht unbedingt der tatsächlichen Anordnung im Genom, es lassen sich so aber die Klone bestimmen, die auf beiden Seiten die größte Ausdehnung haben. Auch hier mußten standardmäßig in anderen Organismen eingesetzte Protokolle an *Chlamydomonas reinhardtii* angepaßt werden. So werden die BAC-Plasmide üblicherweise mit dem selten schneidenden Enzym *Not* I, das eine 8 bp lange Sequenz erkennt, herausgeschnitten, um ihre Größe zu bestimmen (Budiman et al.; 2000). Da diese Erkennungssequenz (GCGGCCGC) jedoch nur aus Guanin- und Cytidin-Basen besteht und das Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* sehr GC-reich ist, ergaben sich bei einem Verdau der ersten BAC-Klone deutlich mehr als 20 Banden pro Klon, die auch in einem Pulsfeld-Elektrophoresegelel nicht klar getrennt werden konnten. Zu dieser Zeit begannen die Labore von Dr. C. Silflow und Dr. P. Lefebvre, Karten bereits erstellter BAC-Contigs für andere Marker im Internet zu veröffentlichen. Hierfür wurden routinemäßig *Bam*HI / *Hind*III-Doppelverdaus durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass die mit unseren Sonden gefundenen Klone in den meisten Fällen deutlich größer waren als diejenigen, die in den veröffentlichten Contigs auftauchten. So liegt die Größe der meisten in dieser Arbeit untersuchten einzelnen Klone im Bereich der Größe ganzer Contigs aus dem Silflow-Labor. Ein Doppelverdau führte somit zu so vielen Banden, dass eine Auswertung sehr schwierig wurde. Letzlich wurden die Contigs dann mit Hilfe von *Hind*III-Restriktionen und einer Auftrennung in 0,6% TAE-Agarosegelen erstellt. In den meisten Fällen konnten so in sich stimmige Contigs ermittelt werden, in zwei Fällen blieben jedoch Banden übrig, die sich nicht sinnvoll in den Contig einordnen ließen. Es läßt sich nicht klar sagen, ob dies an einem nicht vollständigen Verdau mancher Klone durch schlecht zugängliche Restriktionsschnittstellen liegt oder ob andere Gründe vorliegen, dieses Phänomen tritt jedoch auch bei den im Netz veröffentlichten Klonen gelegentlich auf.

Eine Möglichkeit zum Überprüfen der Richtigkeit der erstellten Contigs ergab sich ab März 2002 durch die Veröffentlichung sämtlicher BAC-Endsequenzen durch das DOE Joint Genome Institute. So konnten durch den Vergleich der

Endsequenzen von in den Contigs als gleich lang identifizierten Klonen Teilergebnisse verifiziert werden. Außerdem erwies sich der mit der Sonde np 1 gefundene Contig als größtenteils identisch mit einem von Dr. C. Silflow im Internet veröffentlichten Contig um den Marker GP 431.

Aus den Enden der Klone, die am weitesten in eine Richtung aus einem Contig ragten, wurden wiederum neue Sonden erstellt, um so in einem chromosomal walk einen Gesamtcontig zu erhalten, der die gesuchten Marker in ihrer Anordnung zueinander und das gesuchte Gen enthält. Diese Endsonden wurden routinemäßig sequenziert, und in den meisten Fällen ließen sich auch diese Sequenzen wieder den entsprechenden BAC-Endsequenzen aus dem Netz zuordnen. Wo dies nicht der Fall war, lagen entweder die von uns sequenzierten Bereiche der subklonierten Endfragmente nicht nahe genug am äußersten Ende des Inserts, so dass sich bei den teilweise nur recht kurzen Endsequenzen keine Überlappungen ergaben, oder es lagen *HindIII* – Schnittstellen so nahe am Ende eines Inserts, dass sich Fragmente ergaben, die so klein waren, dass sie auf den verwendeten Gelen für die Contigerstellung nicht mehr enthalten waren.

Durch diese Endsonden konnte der np 1 – Contig in beide, der sp 1 – Contig zumindest in eine Richtung verlängert werden. Eine weitere Verlängerung des sp 1 – Contig scheiterte daran, dass mit dem Klon 16d24 offensichtlich eine Lücke in der BAC-Bibliothek erreicht ist. Eine aus diesem Klon erstellte Endsonde hybridisierte wieder nur mit diesem Klon, es konnten keine weiteren Signale entdeckt werden. Statistisch gesehen ist jeder Bereich des Genoms von *Chlamydomonas reinhardtii* ca. 8 – 10 mal in der Bibliothek vorhanden, und durch den unvollständigen *HindIII*-Verdau bei der Erstellung dieser Bibliothek sollten so alle Bereiche mehrmals auf jeweils verschieden langen Klonen liegen. Offensichtlich existiert jedoch kein Klon, der die *HindIII* – Schnittstelle am Ende von 16d24 inmitten des Inserts enthält. Durch diese fehlende Überlappung ist eine Fortsetzung des Contigs mit Hilfe von BAC-Klonen hier nicht möglich, es müsste zuerst eine größere Region direkt aus dem Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* sequenziert werden, die über das Ende von 16d24 hinausgeht, so dass dann jenseits der Lücke neue Sonden entwickelt werden könnten. Hierfür müsste die genomische DNA zunächst mit Restriktionsenzymen geschnitten werden. An diese Schnittstellen

könnten dann Adapter mit einer bekannten Sequenz ligiert werden. In einer ersten PCR würde eine Amplifikation mit einem aus der bereits bekannten Sequenz am Ende von 16d24 abgeleiteten Primer und einem Adapterprimer erfolgen. Dabei würden Amplifikate entstehen, die das Ende von 16d24 und daran anschließend zusätzliche genomische Sequenz bis zur verwendeten Restriktionsschnittstelle enthalten. Um eventuelle Hintergrundamplifikate zu reduzieren, müsste eine zweite sogenannte nested PCR mit einem weiter innen liegenden Adapterprimer durchgeführt werden. Die so erhaltenen Amplifikate könnten dann zur Sequenzierung verwendet werden (Siebert et al., 1995). Auf diese Weise ließen sich genomische Sequenzen jenseits des Endes von 16d24 erhalten, aus denen dann weitere Sonden abgeleitet werden könnten.

Im Falle des Contigs sp 5 ergaben sich Schwierigkeiten dadurch, dass das Contigende von dem Gen *lhcb 5* gebildet wurde, welches Mitglied einer ganzen Familie von ähnlichen *lhcb*-Genen mit hochkonservierten Sequenzbereichen ist, so dass sich nicht ohne weiteres eine spezifische Sonde ableiten ließ.

Die *lhcb*-Gene sind in zahlreichen höheren Pflanzen und Algen circadian reguliert (Piechulla, 1999, Millar and Kay, 1991), für *lhcb* – mRNA wurde von Koppstech 1985 (Koppstech, 1985) zum ersten Mal eine circadiane Rhythmik in der Menge von mRNA beobachtet. Auch in *Chlamydomonas reinhardtii* wurde sowohl für *lhca* – als auch *lhcb* – Gene gezeigt, dass die entsprechenden mRNA – Level circadiane Rhythmen aufweisen (Hwang and Herrin, 1994, Jacobshagen and Johnson, 1994).

Da von diesem Gen bisher nur die 1,7 kbp große mRNA-Sequenz veröffentlicht war, wurde mit einer Sequenzierung der genomischen Bereiche begonnen, die noch auf dem subklonierten BAC-Ende lagen. Dabei konnten auf einer Länge von 1,5 kb zwei vollständige Introns mit einer Länge von 392 bzw. 172 bp und der Anfang eines dritten Introns (mind. 245 bp) in den ersten 900 bp der mRNA - Sequenz identifiziert werden. Aus diesen Intronbereichen, die meist für das jeweilige Mitglied einer Genfamilie spezifisch sind, könnten ebenfalls geeignete Sonden für ein weiteres BAC – Screening abgeleitet werden.

Ein Zusammenfügen der einzelnen Contigs wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vollendet. Dies hat mehrere Gründe: Zum einen beträgt die Gesamtgröße des verlängerten np 1 – Contigs bereits ca. 260kb, die des sp 1 + X –Contigs ca. 200kb. Nach den aus dem Markerscreening von 168 Kreuzungsnachkommen errechneten Rekombinationshäufigkeiten müßten also zumindest die Marker sp 1 und np 1 bereits auf einem Contig liegen, selbst wenn sie auf unterschiedlichen Seiten des Gens lokalisiert sind. Natürlich besteht die Möglichkeit, dass in diesem Bereich des Chromosoms, obwohl es kein centromernaher Bereich ist, die Rekombinationshäufigkeit nicht dem statistischen Mittel entspricht, so dass ein Abstand von 0,6 cM mehr als 200 kb entspricht. Es könnte aber auch sein, dass die beiden Contigs bereits an der Lücke nach Klon 16d24 zusammenstoßen. Dafür sprechen folgende Hinweise: In allen untersuchten Kreuzungsnachkommen wurde nie eine Rekombination zwischen den Markern np 1 und sp 1 gefunden, immer nur zwischen einem der beiden Marker und *Uhr1*. Beide Marker liegen also wohl auf einer Seite des gesuchten Gens. Für beide Marker wurden Rekombinationshäufigkeiten von ca. 0,6% relativ zu *Uhr1* gefunden, sie müssen also sehr dicht beieinander liegen. Ein Blick auf die Chromosomenkarte in Abb. 20 zeigt, dass auch die bereits gefundenen Rekombinationshäufigkeiten zwischen dem Marker IDA 7 und GP 431 für diese Theorie sprechen. Ihr Abstand beträgt 3,6 cM. Nimmt man nun an, dass der Marker np 3, der zum Marker IDA 7 homolog ist, auf der anderen Seite des Gens *Uhr1* liegt als np 1, der mit dem Marker GP 431 übereinstimmt, so ergeben die jeweiligen in dieser Arbeit gefundenen Rekombinationshäufigkeiten von 3% für np 3 und 0,6% für np 1 genau den Abstand zwischen IDA 7 und GP 431. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass das gesuchte Gen in Richtung Centromer nahe am Marker np 1 liegt und dass der mit der Sonde sp 1 gefundene Contig direkt an das andere Ende des verlängerten np 1 - Contigs anschließt.

Eine endgültige Klärung dieser Frage wird möglich sein, sobald Anfang 2003 die gesamte Sequenz von *Chlamydomonas reinhardtii* veröffentlicht wird. Dann kann anhand der BAC-Endsequenzen und der Sequenzen der von uns verwendeten Endsonden eine genaue Anordnung der einzelnen Contigs und Marker durch Alignment mit der genomischen Sequenz erfolgen.



Parallel zur Erstellung des Gesamtcontigs liefen Vorbereitungen zur Identifizierung und Überprüfung erster Kandidatengene. Hierzu wurden drei verschiedene BAC-Klone, zwei aus dem sp 1- und einer aus dem np 1 – Contig, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und mit einer sogenannten Eberwine – Sonde hybridisiert. Diese Sonde besteht aus markierter Gesamt- mRNA. In diesem Versuch wurde die zugrundeliegende mRNA zum Zeitpunkt CT 2 aus einer synchronen Kultur von *Chlamydomonas reinhardtii* gewonnen.

Diese Sonde bindet also an allen Genen, die zum Zeitpunkt der mRNA-Gewinnung für die Sondenherstellung exprimiert wurden. In allen drei Klonen zeigten einige Banden ein deutliches Hybridisierungssignal. Wie erwartet, ergab sich für die beiden Klone 19j16 (ca. 120 kbp) und 15f16 (ca. 90 kbp), die aus dem gleichen Contig (sp 1) stammen und somit zu einem großen Teil identische Bereiche des Genoms abdecken, ein sehr ähnliches Bild. Der längere Klon wies lediglich im *Bam*HI – Verdau eine mehr als 10 kbp große zusätzliche Bande auf. Der Klon 27p23 (ca. 90 kb) zeigte ebenfalls durchschnittlich drei bis vier positive Banden, die jedoch eine andere Größe aufwiesen, da sie aus anderen Bereichen des Genoms stammen.

Was jedoch auffiel, war eine Bande von ca. 700 bp Länge, die in allen drei Klonen zu finden war. Durch Klonierung und Sequenzierung wurde bestätigt, dass die Fragmente in allen Klonen identisch sind. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hierbei um die Sequenz des *nit 8* – Gens, das von Dr. P. Lefebvre bei der Erstellung der BAC-Bank als möglicher Selektionsmarker in den pBeloBACmn – Vektor eingebracht worden ist. Da diese Sequenz jedoch nirgends veröffentlicht ist und auch auf mehrmaliges Nachfragen sowohl bei der Firma Incyte Genomics als auch bei P. Lefebvre nicht zu erhalten war, kann dies nicht endgültig geklärt werden.

Aus dem Klon 19j16 wurde ein weiteres Fragment mit einer Größe von ca. 2 kbp subkloniert und von beiden Seiten ansequenziert. Auch dieses Fragment enthält einen Repeat von 20 UGs. Die Sequenz ist zum 3' - Ende eines EST – Contigs aus *Chlamydomonas reinhardtii* homolog, der in unmittelbarer Nähe einen weiteren UG – Repeat aufweist. Solche UG – Repeats wurden erstmals in *Gonyaulax* beschrieben (Mittag et al., 1994). Dieser Dinoflagellat zeigt Biolumineszenz, und die mRNA - Expression des Luziferin – Bindeproteins

(LBP) ist circadian reguliert (Morse et al., 1989). Die Regulierung erfolgt jedoch nicht auf transkriptioneller Ebene wie bei der *lhc* – mRNA in *Arabidopsis* (Millar and Kay, 1991), sondern durch translationelle Kontrolle. Ein RNA – Bindeprotein interagiert als sogenannter circadian controlled translational regulator (CCTR) mit einer bestimmten Sequenz im 3' – untranslatierten Bereich der *lbp* – mRNA (Mittag et al., 1994). Die Bindekapazität dieses Faktors ist zu verschiedenen Tageszeiten unterschiedlich hoch, so dass er als circadian gesteuerter Repressor der Translation dienen kann. Die Erkennungssequenz für diesen CCTR besteht in *Gonyaulax* aus einer Sequenz von 22 Nukleotiden, zusammengesetzt aus einer siebenfachen Wiederholung von UGs mit einem zusätzlichen U vor dem fünften Repeat. Solche UG – Repeats wurden mittlerweile in den 3' – untranslatierten Bereichen (UTRs) vieler Organismen identifiziert, und in *Chlamydomonas reinhardtii* konnte sogar ein Analog zum CCTR mit dem Namen Chlamy 1 gefunden werden (Mittag, 1996). Dieses RNA – Bindeprotein erkennt ebenfalls spezifisch UG – repeats in 3' – UTRs von *Chlamydomonas reinhardtii* – mRNA (Mittag and Waltenberger, 1997). Es wurden bereits acht verschiedene mRNAs mit UG – Repeats zwischen 7 und 16 Wiederholungen auf Bindung von Chlamy 1 getestet (Waltenberger et al., 2001). Alle zeigten ein gewisses Maß an Bindung, wobei die Stärke nicht von der Anzahl der UG – Repeats abhängig zu sein scheint. Auch das zusätzliche U vor einem Repeat ist für eine effiziente Bindung von Chlamy 1 nicht notwendig. Viele dieser durch Chlamy 1 regulierten mRNAs kodieren für Komponenten von Stoffwechselkreisläufen, unter anderem aus dem Stickstoffkreislauf. Dies wäre ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei dem oben erwähnten, in allen drei BAC – Klonen gefundenen Fragment um eine Nitratreduktase handeln könnte, da ja auch diese Sequenz einen UG – repeat aufwies.

Diese Vorversuche haben gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, mit Hilfe der Eberwine – Sonde exprimierte Gene auf BAC – Klonen zu finden. Diese Methode könnte auch für entsprechende Experimente in anderen Organismen hilfreich sein, für die eine Sequenzierung des gesamten Genoms noch nicht in Aussicht ist. Auch in *Chlamydomonas reinhardtii* könnte man so mit einer

intensiveren Suche nach dem Periodikgen *Uhr1* beginnen, sollte sich die Vollendung des Genomprojekts noch weiter hinauszögern. Eine erste Fassung der gesamten Sequenz war ursprünglich für Juni dieses Jahres projektiert, im Moment ist sie für Anfang nächsten Jahres in Aussicht gestellt.

Die fertige komplette genomische Sequenz würde die recht aufwändige Kandidatengensuche über die Eberwine – Sonde vereinfachen. Eine Analyse der im Bereich der Marker liegenden Sequenzen könnte bereits erste Hinweise nicht nur auf exprimierte Gene im allgemeinen, sondern speziell auf solche Gene, die Bestandteil des Oszillators sein könnten, geben.

Kandidaten hierfür wären z. B. Transkriptionsfaktoren wie *lhy* und *cca1* oder Proteinkinasen wie *per* in *Drosophila* oder *ck2* in *Arabidopsis*. PAS – Domänen zur Protein – Protein – Interaktion wurden bisher in allen untersuchten circadianen Systemen gefunden (zusammengefaßt in McClung, 2001).

Die beiden Gene *lhy* und *cca1*, die wohl einen zentralen Bestandteil des Oszillators in *Arabidopsis* ausmachen, kodieren für nahe verwandte MYB Transkriptionsfaktoren (Carre and Kim, 2002). Beide enthalten jedoch nur eine MYB Domäne und nicht zwei bis drei Wiederholungen, wie man sie in den meisten anderen MYB Proteinen findet. Beide Proteine binden speziell zu einem sogenannten evening element, einer konservierten DNA-Sequenz, die in vielen circadian regulierten Genen zu finden ist, z. B. auch in einem weiteren Bestandteil der inneren Uhr von *Arabidopsis*, *toc 1*.

Proteinkinasen spielen eine Rolle bei der Regulation des Phosphorylierungsgrades von PERIOD in *Drosophila*, der für die Abbaurate des Proteins verantwortlich ist. Unterschiedliche Phosphorylierung durch die mutierte Proteinkinase DOUBLETIME kann die Periodenlänge verändern (Bao et al., 2001). In *Arabidopsis* wurde ebenfalls eine Proteinkinase gefunden, die an der Regulation von Periodikgenen beteiligt zu sein scheint (Sugano et al., 1998). Diese CASEIN KINASE 2 (CK 2) interagiert mit CCA 1, einem der zentralen Bestandteile der inneren Uhr, und führt *in vitro* wie DOUBLETIME zu einer Phosphorylierung dieses Proteins. Pflanzen, die eine erhöhte CK 2 – Aktivität aufweisen, zeigen eine verkürzte Periode im Rhythmus der *cca 1* – und *lhy* – mRNA - Akkumulation (Sugano et al., 1999).

PAS-Domänen finden sich z. B. in den *white collar* Genen aus dem Oszillator von *Neurospora* oder in *period* und *tim* aus dem circadianen System von *Drosophila* (Dunlap, 1999). Diese PAS – Domänen ermöglichen eine Heterodimerisierung von PERIOD und TIMELESS, die nur so komplexiert in den Nucleus gelangen können, wo sie mit den ebenfalls über PAS – Domänen dimerisierten Proteinen CLOCK und CYCLE interagieren und so deren Bindung an DNA verhindern (Überblick in Harmer et al., 2001).

Eine Suche nach solchen Genen und Motiven in dem in dieser Arbeit mit Hilfe von AFLP – Markern und BAC – Klonen kartierten Bereich des Genoms von *Chlamydomonas reinhardtii* könnte Gene zutage fördern, die wahrscheinliche Kandidaten für Bestandteile der inneren Uhr in dieser Grünalge sind. Durch Sequenzierung des entsprechenden Bereichs in der Kurzperiodikmutante könnte außerdem vorab geklärt werden, ob für das entsprechende Gen tatsächlich Unterschiede in der Sequenz vorliegen. Sollten sich solche Unterschiede finden, wurden im Rahmen dieser Arbeit die nötigen Voraussetzungen geschaffen, um das Periodikgen *Uhr1* in Rescue – Experimenten zu überprüfen und endgültig zu identifizieren.

## 5. Literatur

Bao, S., Rihel, J., Bjes, E., Fan, J. Y., and Price, J. L. (2001). The *Drosophila* double-time<sup>S</sup> mutation delays the nuclear accumulation of period protein and affects the feedback regulation of period mRNA. *J Neurosci* **21**, 7117-26.

Bruce, V. G. (1970). The biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Protozool.* **17**, 328-334.

Bruce, V. G. (1972). Mutants of the biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **70**, 537-48.

Bruce, V. G., and Bruce, N. C. (1978). Diploids of clock mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **98**, 225-233.

Bünning, E. (1936). Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **54**, 590-607.

Carre, I. A., and Kim, J. Y. (2002). MYB transcription factors in the *Arabidopsis* circadian clock. *J Exp Bot* **53**, 1551-7.

de Mairan, J. J. (1729). Observation botanique. In *Histoire de l'Academie Royale de Sciences* (Paris, pp. 35ff.)

Devlin, P. F. (2002). Signs of the time: environmental input to the circadian clock. *J Exp Bot* **53**, 1535-50.

Diener, D. R., Curry, A. M., Johnson, K. A., Williams, B. D., Lefebvre, P. A., Kindle, K. L., and Rosenbaum, J. L. (1990). Rescue of a paralyzed-flagella mutant of *Chlamydomonas* by transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5739-43.

Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-90.

Feldman, J. F., and Hoyle, M. N. (1973). Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **75**, 605-13.

Gorman, D. S., and Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanine: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 1665-1669.

Goto, K., and Johnson, C. H. (1995). Is the cell division cycle gated by a circadian clock? The case of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* **129**, 1061-9.

Harris, E.H. (1989). The *Chlamydomonas* source book. Academic Press. San Diego

Hicks, K. A., Albertson, T. M., and Wagner, D. R. (2001). EARLY FLOWERING3 encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1281-92.

Hudock, G. I. (1967). Experiments in modern genetics (New York: Wiley and Sons).

Hutner, S. H., Provasoli, L., Schatz, A., and Haskins, C. P. (1950). Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Amer. Phil. Soc.* **94**, 152-170.

Hwang, S., and Herrin, D. L. (1994). Control of *lhc* gene transcription by the circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* **26**, 557-69.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-8.

Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C. R., Tanabe, A., Golden, S. S., Johnson, C. H., and Kondo, T. (1998). Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* **281**, 1519-23.

Iwasaki, H., Taniguchi, Y., Ishiura, M., and Kondo, T. (1999). Physical interactions among circadian clock proteins KaiA, KaiB and KaiC in cyanobacteria. *Embo J* **18**, 1137-45.

Jacobshagen, S., and Johnson, C. H. (1994). Circadian rhythms of gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*: circadian cycling of mRNA abundances of cab II, and possibly of beta-tubulin and cytochrome c. *Eur J Cell Biol* **64**, 142-52.

Kindle, K. L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1228-32.

Klein, P. E., Klein, R. R., Cartinhour, S. W., Ulanich, P. E., Dong, J., Obert, J. A., Morishige, D. T., Schlueter, S. D., Childs, K. L., Ale, M., and Mullet, J. E. (2000). A high-throughput AFLP-based method for constructing integrated genetic and physical maps: progress toward a sorghum genome map. *Genome Res* **10**, 789-807.

Kloppstech, K. (1985). Diurnal and circadian rhythmicity in the expression of light-induced plant nuclear messenger RNAs. *Planta* **165**, 502-506.

Kondo, T., and Ishiura, M. (1994). Circadian rhythms of cyanobacteria: monitoring the biological clocks of individual colonies by bioluminescence. *J Bacteriol* **176**, 1881-5.

Kondo, T., Strayer, C. A., Kulkarni, R. D., Taylor, W., Ishiura, M., Golden, S. S., and Johnson, C. H. (1993). Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5672-6.

Kondo, T., Tsinoremas, N. F., Golden, S. S., Johnson, C. H., Kutsuna, S., and Ishiura, M. (1994). Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* **266**, 1233-6.

Konopka, R. J., and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2112-2116.

Liu, Y., Tsinoremas, N. F., Johnson, C. H., Lebedeva, N. V., Golden, S. S., Ishiura, M., and Kondo, T. (1995). Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes Dev* **9**, 1469-78.

Martinez-Garcia, J. F., Huq, E., and Quail, P. H. (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* **288**, 859-63.

Mergenhagen, D. (1984). Circadian clock: genetic characterization of a short period mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Cell Biol* **33**, 13-8.

Mergenhagen, D. (1980). Circadian rhythms in unicellular organisms. *Curr Top Microbiol Immunol* **90**, 123-47.

Millar, A. J., Carre, I. A., Strayer, C. A., Chua, N. H., and Kay, S. A. (1995). Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* **267**, 1161-3.

Millar, A. J., and Kay, S. A. (1991). Circadian Control of *cab* Gene Transcription and mRNA Accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **3**, 541-550.

Millar, A. J., Short, S. R., Chua, N. H., and Kay, S. A. (1992). A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* **4**, 1075-87.

Minors, D. S., and Waterhouse, J. M. (1984). The sleep-wakefulness rhythm, exogenous and endogenous factors (in man). *Experientia* **40**, 410-6.

Mittag, M. (2001). Circadian rhythms in microalgae. *Int Rev Cytol* **206**, 213-47.

Mittag, M. (1996). Conserved circadian elements in phylogenetically diverse algae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14401-4.

Mittag, M., Lee, D. H., and Hastings, J. W. (1994). Circadian expression of the luciferin-binding protein correlates with the binding of a protein to the 3' untranslated region of its mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5257-61.



Mittag, M., and Waltenberger, H. (1997). In vitro mutagenesis of binding site elements for the clock-controlled proteins CCTR and Chlamy 1. *Biol Chem* **378**, 1167-70.

Morse, D., Milos, P. M., Roux, E., and Hastings, J. W. (1989). Circadian regulation of bioluminescence in *Gonyaulax* involves translational control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 172-6.

Myers, M. P., Wager-Smith, K., Wesley, C. S., Young, M. W., and Sehgal, A. (1995). Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. *Science* **270**, 805-8.

Newman, S. M., Boynton, J. E., Gillham, N. W., Randolph-Anderson, B. L., Johnson, A. M., and Harris, E. H. (1990). Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics* **126**, 875-878.

Piechulla, B. (1999). Circadian expression of the light-harvesting complex protein genes in plants. *Chronobiol Int* **16**, 115-28.

Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B., and Young, M. W. (1998). *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* **94**, 83-95.

Purton, S., and Rochaix, J. D. (1994). Complementation of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant using a genomic cosmid library. *Plant Mol Biol* **24**, 533-7.

Ranum, L. P., Thompson, M. D., Schloss, J. A., Lefebvre, P. A., and Silflow, C. D. (1988). Mapping flagellar genes in *Chlamydomonas* using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics* **120**, 109-22.

Reddy, P., Zehring, W. A., Wheeler, D. A., Pirrotta, V., Hadfield, C., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1984). Molecular analysis of the period locus in *Drosophila*

melanogaster and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* **38**, 701-10.

Rutila, J. E., Suri, V., Le, M., So, W. V., Rosbash, M., and Hall, J. C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* **93**, 805-14.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning* (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning*, 3 Edition (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I. A., and Coupland, G. (1998). The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**, 1219-29.

Singh, R. C., S.-C.; Rahman, R. A. (1998). Generation of molecular markers in oil palm (*Elaeis guineensis*) using AFLP Analysis. *Focus* **20**, 26f.

Somers, D. E., Devlin, P. F., and Kay, S. A. (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **282**, 1488-1490.

Somers, D. E., Schultz, T. F., Milnamow, M., and Kay, S. A. (2000). ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* **101**, 319-29.

Somers, D. E., Webb, A. A., Pearson, M., and Kay, S. A. (1998). The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**, 485-94.

Sueoka, N. (1960). Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 83 - 91.

- Sugano, S., Andronis, C., Green, R. M., Wang, Z. Y., and Tobin, E. M. (1998). Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the Arabidopsis circadian clock-associated 1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11020-5.
- Sugano, S., Andronis, C., Ong, M. S., Green, R. M., and Tobin, E. M. (1999). The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12362-6.
- Suzuki, L. J., C. H. (2001). Algae know the time of day: circadian and photoperiodic programs. *J. Phycol.* **37**, 933-942.
- Thain, S. C., Hall, A., and Millar, A. J. (2000). Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Curr Biol* **10**, 951-6.
- Vashishtha, M., Segil, G., and Hall, J. L. (1996). Direct complementation of *Chlamydomonas* mutants with amplified YAC DNA. *Genomics* **36**, 459-67.
- Vos, P. (1998). AFLP fingerprinting of Arabidopsis. *Methods Mol Biol* **82**, 147-55.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**, 4407-14.
- Waltenberger, H., Schneid, C., Grosch, J. O., Bareiss, A., and Mittag, M. (2001). Identification of target mRNAs for the clock-controlled RNA-binding protein Chlamy 1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genomics* **265**, 180-8.
- Wang, Z. Y., and Tobin, E. M. (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**, 1207-17.
- Wei, F., Gobelman-Werner, K., Morroll, S. M., Kurth, J., Mao, L., Wing, R., Leister, D., Schulze-Lefert, P., and Wise, R. P. (1999). The Mla (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed

recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. *Genetics* **153**, 1929-48.

Werner, R. (2002). *Chlamydomonas reinhardtii* as a unicellular model for circadian rhythm analysis. *Chronobiology International* **19**, 325-343.

Werner, R., Olschewski, J. Mergenhagen, D. (2001). Identification and cloning of amplified fragment length polymorphism markers linked to the mating type locus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Phycology* **37**, 427-432.

Yang, P., and Sale, W. S. (1998). The Mr 140,000 intermediate chain of *Chlamydomonas* flagellar inner arm dynein is a WD-repeat protein implicated in dynein arm anchoring. *Mol Biol Cell* **9**, 3335-49.

## 6. Anhang

### Anhang A: Verwendete Primer

In dieser Tabelle sind die verwendeten Primer, ihre Sequenz und die verwendete Annealing – Temperatur angegeben.

Primer	Sequenz	opt. Annealing-Temp.
M13F	5´ -GTAAAACGACGGCCAG-3´	55°C
M13R	5´ -CAGGAAACAGCTATGAC-3´	55°C
np 1 up	5´ -TTAACAAGCTGCTGTTC-3´	48°C
np 1 low	5´ -GAATTACACGAGTGAG-3´	50°C
np 4 up	5´ -GGCGCACGCAAGACCGGTG-3´	70°C
sp 5 up	5´ -CGAACGCAAGACTGGCCAT-3´	70°C
sp 5 low	5´ -TGGTGCGTGAGCGGCCAAC-3´	70°C
sp 1 up	5´ -CATAAACTCCCTCTGTACGA-3´	54°C
sp 1 low	5´ -ATAGCCGTGGCCTGCTC-3´	54°C
T 3	5´ - AATTAACCCTCACTAAAGGGAAC-3´	57°C
KG1A low	5´ - AGCCGCCGCGCCTTCTGCCTCTC-3´	71°C
KG 1A up	5´ - CGCGCTGTCGTTCCCCTCCTA-3´	70°C
KG 1B low	5´ - ATGCGCAGTGTCCAATAGTTCC-3´	60°C
KG 1B up	5´ - CGCGCCGGCACCTCC-3´	71°C
lhca1 up	5´ - ACCATGAAGGCGGGCAACTG-3´	61°C
lhca1 low	5´ - TTATAGAAGAAGGGGACGGAGATG-3´	61°C
lhca1 up2	5´ - GCTACGGCAACTGGTACGAT-3´	59°C
lhca1 low2	5´ - CTCCCGCTATCAGGAGATCA-3´	59°C

## Anhang B: Sequenzen der AFLP-Marker

Im folgenden sind die Sequenzen der acht klonierten AFLP-Marker inklusive der verwendeten Primersequenzen dargestellt. Sofern vorhanden, sind auch Homologien zwischen den Markern erwähnt.

### AFLP-Marker np 1:

Consensus Sequenz

Länge: 243 bp

AFLP Primer-Kombination: Dig-Eco-A / Mse-CA

```
TGATGAGTCCTGAGTAACAAGCTGCTGTTCCCGCCCCGAAACCAACCTCATCTTCGGTCCC
ATCGACATTCCGTGCCAGGCTACCGTGACAGCCAGCACCACGGCCACAAACAACACGGGC
GGCAAGGGTGCGTTTGCATACAGGGGAACGAAGTAACGTTTGGGCAATAACGCCACAATG
CATGCCTGGCTAAGTATCAGCACCAGAGAATGCCCATCTCACTCGTGTGAATTGGTACGC
AGT
```

### AFLP-Marker np 2:

Consensus Sequenz

Länge: 99 bp

AFLP Primer-Kombination: Dig-Eco-A / Mse-GGA

```
GATGAGTCCTGAGTAAGGAACAGTCAGGCAGAGGGTAGGGGTTGGTGTGGGCAGTGTTG
GTCAGGAGGTGTATTCCATCTGCTGAATTGGTACGCAGC
```

### AFLP-Marker np 3:

Consensus Sequenz

Länge: 145 bp

AFLP Primer-Kombination: Dig-Eco-A / Mse-GGT

```
GATGAGTCCTGAGTAAGGTCCTGAATGCGCCAAGACATTACTCTATTGCCGATGAGGAA
ACTAACACTTTCTGGGCACCAACAGTTCGCCCCGGTGAATTGGCTCAGCCAAACAACATT
CTTGCAAGCTTGAATTGGTACGCAGTC
```

### AFLP-Marker np 4:

**Consensus Sequenz**

Länge: 404 bp

AFLP Primer-Kombination: Dig-Eco-A / Mse-GGA

Homolog zu Marker SP5

GATGAGTCCTGAGTAAGGAGTTTCGTTCAACAGCTTCGCCGGCACAGGAGACAGCAGGAG  
 GCACCAGGCGCACGCAAGACCGGTGCGAGACAGCGCCCGAACGGTTCGGCATCATTTCGTA  
 AGTCGGGTTTTCGATCTCCATGTTTCGTGAACCGGAGAGCGGTTGGCCGAAACCAACGGCT  
 GGCCTGCGCGCGCTACTACGGTACTGCTGAGCACCAGCGAACAACCTTGAGCTGGTTGCTT  
 CGATGGTATGCAGCCACTGTTTGTATATGCGTTCAAGATCAAGTCAGCCATTCGAGGAGT  
 CAATCCACAATCACGAACCTGACGACGGTTGGCCGCTCACGCACCAATAAATCGAGTTCTT  
 TGCAGGCTCCCTTTGGTAGCTGATACTTGAATTGGTACGCAGTC

AFLP-Marker sp 1:

**Consensus Sequenz**

Länge 396 bp

AFLP Primer-Kombination: Dig-Eco-A / Mse-CA

TGATGAGTCCTGAGTAACATAAACTCCCTCTGTACGACGCGTGCGCACCTGCCAGCTCA  
 CAAGTTGGCCACATTTTTCTCTGCTTGCCACGCTCTGTCACCACCGCACGCTTGCGAGCAT  
 TGCAAGATGGCACAGCCAGGGCGTGACGACAGGAGCCCTCAACTCCGGGCTCCGAACT  
 CCATGCAAAATAATTGACATTATGGCTCTGATTTTATGTCACTGGAATTTTATTCCTAA  
 GCCTGGCAAACACCCAGTGTACCCACCCCAACAAGACACACCCTGAGGAGGAGGCCCA  
 ACACGGCACTGCACAACAACGTTTTGGTTACTACGCATAAAACAACCTTGCCGGCATGCA  
 AAGGGGCCATGAGCAGGCCACGGCTATGAATTGGTACGCAGT

AFLP-Marker sp 4:

**Consensus Sequenz**

Länge: 152 bp

AFLP Primer-Kombination: Dig-Eco-A / Mse-GGT

GATGAGTCCTGAGTAAGGTCCTGAATGCGCCAAGACATTACTCTATTGCCGATGAGGAA  
 ACTAACACTTTTCTGGGCACCAACAGGCAACAGTTTCGCCCAGGTGAATTGGCTCAGCCAAA  
 CAACATTCTTGCAAGCTTGAATTGGTACGCAGTC

**AFLP-Marker sp 5:****Consensus Sequenz**

Länge: 410 bp

AFLP Primer-Kombination: Dig-Eco-A / Mse-GGA

Homolog zu Marker NP4

GATGAGTCCTGAGTAAGGAGTTTCGTACAACAGCTGGAAGAGCGAGGCAACAGGAGACCG  
 CAAGGCAGGCGAACGCAAGACTGGCCATGCGAGAACAGCGCCCGAACGGTTCGGCATCAT  
 TCGTAAGTCGGGTTTGCGATCTCCATGTTCGTGAACCGGAGAGCGGTTGGCCGAAACCAA  
 CGGCTGGCCTGCGCGCGCTACTACGGTACTGCTGAGCACCAGCGAACAACCTTGAGCTGGT  
 TGCTTCGATGGTATGCAGCCACTGTTTGTATATGCGTTCAAGATCAAGTCAGCCATTCTGA  
 GGAGTCAATCCACAATCACGAACGTGACGACGGTTGGCCGCTCACGCACCAATAAATCGAG  
 TTCTTTGCAGGCTCCCTTTGGTAGTTGATACTTGAATTGGTACCGCAGTC

**AFLP-Marker sp 6:****Consensus Sequenz**

Länge: 127 bp

AFLP Primer-Kombination: Dig-Eco-A / Mse-GGA

GACTGCGTACCAATTCAGAATTGACAGGGAGCGAACTGTCAGCAAAGGGATGGATGACG  
 TAGCGCAGGCGCTATTATACTGTACGTGCAGCCTGCCTGTGAATGCATGTCCTTACTCA  
 GGACTCATC



## Anhang C: Markerverteilung in den Kreuzungsnachkommen

Die Ergebnisse der Markeranalysen sowohl mit AFLP als auch STS und CAPS sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefaßt. Tabelle A beinhaltet die Nachkommen der Kreuzung 102, Tabelle B die der Kreuzung 103. Die Nummerierung der Nachkommen setzt sich aus zwei Zahlen zusammen, die erste Zahl bezeichnet die Zygote, aus der die Nachkommen hervorgegangen sind, die zweite steht für die jeweiligen Nachkommen. Bei einigen Zygoten sind nicht alle 4 Tochterzellen erhalten geblieben.

Der Paarungstyp wurde mit Hilfe einer PCR-Analyse nach Werner und Mergenhagen (1998) bestimmt. Die Daten über den Periodentyp wurden durch Analyse des Photoakkumulationsverhaltens von Herrn Prof. Dr. Mergenhagen und Frau Heidrun Meyer ermittelt.

**Tabelle A: Kreuzung 102**

	Nachk.	mt	PTX	CAPS / STS				MSE-CA		MSE-GG					
				np1	np4	sp5	sp1	np1	sp1	sp4	sp5	sp6	np2	np3	np4
1	2.1	mt+	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
2	2.2	mt+	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
3	2.3	mt-	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
4	2.4	mt-	sp	s	0		sp1		sp1	sp4	sp5		0	0	
5	3.1	mt-	np	wt	np4	0	0								
6	3.2	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
7	3.3	mt+	np	wt	np4	0	0								
8	3.4	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
9	5.1	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
10	5.2	mt-	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
11	5.3	mt+	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
12	5.4	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
13	8.1	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
14	8.2	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
15	8.3	mt-	np	wt	np4	0	0								
16	8.4	mt+	np	wt	np4	0	0	np1	0	0	0		np2	np3	
17	9.1	mt+	np		np4	0	0	np1	0						
18	9.2	mt-	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
19	9.3	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
20	9.4	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	

	Nachk.	mt	PTX	CAPS / STS				MSE-CA		MSE-GG					
				np1	np4	sp5	sp1	np1	sp1	sp4	sp5	sp6	np2	np3	np4
21	10.1	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
22	10.2	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
23	10.3	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
24	10.4	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
25	11.1	mt-	np	wt	np4	0	0								
26	11.2	mt-	np	wt	np4	0	0	np1	0	0	0		np2	np3	
27	11.3	mt+	sp	s		sp5	sp1								
28	11.4	mt+	sp	s		sp5	sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
29	13.1	mt+	np	wt	np4	0	0								
30	13.2	mt-	sp			sp5	sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
31	13.3	mt-	sp			sp5	sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
32	16.1	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
33	16.2	mt-	np	wt	np4	0	0								
34	16.3	mt+	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
35	17.1	mt+	np	wt	np4	0	0								
36	17.2	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		0	np3	
37	17.3	mt-	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
38	18.1	mt-	np	wt	np4	0	0								
39	18.2	mt+	sp		0	sp5	sp1	0	sp1						
40	18.3	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
41	19.1	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
42	19.2	mt-	np		np4	0	0	np1	0	0				np3	
43	19.3	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
44	20.1	mt+	np	wt	np4		0	np1	0	sp4	0		np2	np3	
45	20.2	mt-	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
46	20.3	mt+	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
47	21.1	mt+	np	wt	np4	0	0								
48	21.2	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
49	21.3	mt-	np	wt	np4		0			0	0		np2	np3	
50	22.1	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
51	22.2	mt+	np	wt	np4	0	0								
52	22.3	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
53	23.1	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
54	23.2	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
55	23.3	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
56	24.1	mt+	np	wt	np4	0	0								
57	24.2	mt-	np	wt	np4	0	0								
58	24.3	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
59	25.1	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
60	25.2	mt+	np	wt	np4	0	0								
61	25.3	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
62	27.1	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
63	27.2	mt-	sp		np4	sp5	sp1	np1	sp1	sp4	sp5		np2	np3	
64	27.3	mt+	np	wt	np4	0	0								
65	28.1	mt-	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
66	28.2	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
67	28.3	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								

	Nachk.	mt	PTX		np4	sp5	sp1	MSE-CA		MSE-GG					
								np1	sp1	sp4	sp5	sp6	np2	np3	
68	29.1	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
69	29.2	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
70	29.3	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
71	31.1	mt+	np	wt	np4	0	0	np1	0		<b>sp5?</b>	0	0		np4
72	31.2	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
73	31.3	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
74	33.1	mt+	np	<b>s</b>	np4	<b>0</b>	0	np1	0		0	0	np2		np4
75	33.2	mt-	sp		0	sp5	sp1	0	sp1		sp5	sp6	0		0
76	33.3	mt+	np	wt	np4	<b>0</b>	0				0	0	np2		np4
77	34.1	mt-	np		np4	0	0	np1	0		0	0	np2		np4
78	34.2	mt+	np		np4	0	0	np1	0		0	0	np2		np4
79	34.3	mt-	sp	s	0	sp5	sp1	<b>np1?</b>	<b>sp1</b>		sp5	sp6	<b>np2</b>		<b>0</b>
80	35.1	mt-	np		np4	0	0	np1	0		0	0	np2		np4
81	35.2	mt+	sp		0	sp5	sp1	0	sp1		sp5	sp6	0		0
82	35.3	mt-	sp	s	0	sp5	sp1	<b>np1?</b>	<b>sp1</b>		sp5	sp6	<b>np2</b>		<b>0</b>
83	36.1	mt-	np		np4	0	0	np1	0		0	0	np2		np4
84	36.2	mt+	sp		0	sp5	sp1	0	sp1		sp5	sp6	0		0
85	37.1	mt-	sp	s	0	sp5	sp1	<b>np1?</b>	<b>sp1</b>		sp5	sp6	<b>0</b>		<b>0</b>
86	37.2	mt+	np	wt	np4	0	0								
87	37.3	mt-	sp		0	sp5	sp1	0	sp1		sp5	sp6	0		0
88	38.1	mt+	np		np4	0	0	np1	0		0	0	np2		np4
89	38.2	mt-	sp		0	sp5	sp1	0	sp1		sp5	sp6	<b>np2</b>		0
90	38.3	mt+	sp		0	sp5	sp1	0	sp1		sp5	sp6	0		0
91	39.1	mt-	sp		0	sp5	sp1	0	sp1		sp5	sp6	0		0
92	39.2	mt-	np		np4	0	0	np1	0		0	0	np2		np4
93	39.3	mt+	np	wt	np4	0	0	np1	0		0	<b>sp6</b>	np2		np4
94	40.1	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
95	40.2	mt-	np	wt	np4	0	0								
96	40.3	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
97	41.1	mt-	np	wt	np4	0	0								
98	41.2	mt+	sp	s	<b>np4</b>	<b>0</b>	sp1								
99	41.3	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
100	42.1	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
101	42.2	mt-	np	wt	np4	0	0								
102	42.3	mt+	np	wt	np4	0	0								
103	42.4	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
104	43.1	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
105	43.2	mt-	np	wt	np4	0	0								
106	43.3	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								

	Nachk.	mt	PTX		np4	sp5	sp1	MSE-CA		MSE-GG				
								np1	sp1	sp4	sp5	sp6	np2	np3
107	46.1	mt-	sp	s	0	sp5	sp1							
108	46.2	mt+	np	wt	np4	0	0							
109	46.3	mt+	sp	s	0	sp5	sp1							
110	47.1	mt+	np	wt	np4	0								
111	47.2	mt+	sp	s	0	sp5	sp1							
112	47.3	mt-	np	wt	np4	0	0							
113	48.1	mt-	sp	s	0	sp5	sp1							
114	48.2	mt+		wt	np4	0	0							
115	48.3	mt+	np	wt	np4	0	0							
116	48.4	mt-	sp	s	0	0	sp1							
117	49.1	mt-	sp	s	0	sp5	sp1							
118	49.3	mt-	sp	s	0	sp5	sp1							
119	49.4	mt+	np	wt	np4	0	0							
120	50.2	mt+/n	sp	s		sp5	sp1							
121	50.3	mt+/n	np	wt		0	0							

Tabelle B: Kreuzung 103

	Nachk.	mt	PTX	CAPS / STS				MSE-CA		MSE-GG					
				np1	np4	sp5	sp1	np1	sp1	sp4	sp5	sp6	np2	np3	np4
1	1.1	mt-	np	wt	np4	0	0								
2	1.2	mt-	np	wt	np4	0	0								
3	1.3	mt+	sp		0	sp5	sp1	0	sp1						
4	2.1	mt+	np	wt	np4	0	0								
5	2.2	mt-	sp		0	sp5	sp1	0	sp1						
6	2.3	mt-	np	wt	np4	0	0								
7	2.4	mt+	sp		0	sp5	sp1	0	sp1						
8	3.1	mt+	np		np4	0	0	np1	0						
9	3.2	mt-	sp		0	sp5	sp1	0	sp1						
10	3.3	mt+	sp		0	sp5	sp1	0	sp1						
11	6.1	mt-	<b>np</b>	<b>s</b>	0	sp5	sp1								
12	6.2	mt-	np	s	np4	0	0								
13	6.3	mt+	np	wt	np4	0	0								
14	7.1	mt+	np	wt	np4	0	0								
15	7.2	mt+	np	wt	np4	0	0								
16	7.3	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
17	8.1	mt+	np	wt	np4	0	0								
18	8.2	mt-	np	wt	np4	0	0								
19	8.3	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								
20	8.4	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
21	9.1	mt-	sp	s	0	sp5	sp1								
22	9.2	mt-	np	wt	np4	0	0								
23	9.3	mt+	np	wt	np4	0	0								
24	9.4	mt+	sp	s	0	sp5	sp1								

	Nachk.	mt	PTX	CAPS / STS				MSE-CA		MSE-GG					
				np1	np4	sp5	sp1	np1	sp1	sp4	sp5	sp6	np2	np3	np4
25	10.1	mt-	np		np4	0	0	np1	0	0	0		np2	np3	
26	10.2	mt-	sp		0	sp5	sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
27	10.3	mt+	sp		0	sp5	sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
28	11.1	mt+	sp		0	sp5	sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
29	11.2	mt+	np		0	<b>sp5</b>	0	np1	0	0	<b>sp5</b>		0	0	
30	11.3	mt-	sp		<b>np4</b>	0	sp1	<b>np1</b>	0	0	0		<b>np2</b>	<b>np3</b>	
31	12.1	mt-	np		np4	0	0	np1	0	0	0		np2	np3	
32	12.2	mt+	sp		0	sp5	sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
33	12.3	mt-	sp		0	sp5	sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
34	12.4	mt+	np		0	0	0	np1	0	0	0		np2	np3	
35	13.1	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
36	13.2	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
37	13.3	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
38	13.4	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
39	16.1	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
40	16.2	mt+	<b>sp</b>		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
41	16.3	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
42	19.1	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
43	19.2	mt+	np		0	0	0	np1	0	0	0		np2	np3	
44	19.3	mt+	sp	s	0		sp1			sp4	sp5		0	0	
45	20.1	mt-	sp		np4	0	0	np1	0	0				np3	
46	20.2	mt-	np		0	sp5	sp1?	0	sp1	sp4				0	
47	20.3	mt+	np		0	0	0	np1	0	0				np3	
48	21.1	mt-	arhyt.		0	sp5	sp1	0	sp1	sp4				0	
49	21.2	mt-	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
50	21.3	mt+	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
51	22.1	mt-	np		np4	<b>sp5</b>	<b>sp1</b>	np1	0						
52	22.2	mt-	np		np4	0	0	np1	0	0	0		np2	np3	
53	22.3	mt+	sp		0	0	sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
54	23.1	mt-	sp		0		sp1	0	sp1	sp4	sp5		0	0	
55	23.2	mt-	np		0	0	0	np1	0						
56	23.3	mt+	sp		0	sp5	sp1	0	sp1						
57	23.4	mt+	np		np4		0	np1	0	0	0		np2	np3	
	cc503					0		np1	0						

## Anhang D: Teilsequenz des Gens *lhcb 5*

Dargestellt ist der in dieser Arbeit sequenzierte Teilbereich der genomischen Sequenz des Gens *lhcb 5*. Aus der bereits veröffentlichten mRNA – Sequenz bekannte Exonbereiche sind hervorgehoben.

Pos.1: GGCCCCGACCGCAAGCTGTTCTGCCCAGCGGCCTGTACGACCGCTCGGA  
 Pos.51: GATCCCCGAGTACCTGAACGGCGAGCTGGCTGGCGAGTGAGTCGGGAAAT  
 Pos.101: GCGCAGCGCTGGGATACCTGCTCTCGATCAGCGATTTCGTTACGGAGTG  
 Pos.151: GGGCCTCAAGACTGTTTAGGACCCGTCTCAGCCTTGATAGCTTCAGATCA  
 Pos.201: AGGGGTCTGAAGCTGGGTCATTGCGGGCCATCTACGCAGYCGCGATGTGG  
 Pos.251: CACCCACTCGNCGGCCTTGGTTCGGCGCTCAAAGCATCACTTTGCGAGTC  
 Pos.301: GACTAAAGAATGCCTAGCCAAGAACCCTGGGCTGGGGACGGCGTCCTTGC  
 Pos.351: GTTACTANGTGATGGGCCANGTGCTGCCAGCGTGGCTGCCAGCGGACCAG  
 Pos.401: CTATCTCTGTGCCCCGTGCTGCTTTGAGTCGCTTTGTAACCCCTCCCCTC  
 Pos.451: CCCGCTTCACTCTTGTGTCCTTTCTCAGCTACGGCTATGACCCTCTGGGC  
 Pos.501: CTGGGCAAGGACCCCGAGACCGTGGCCAAGTACCGCGAGAACGAGCTGCT  
 Pos.551: GCACGCCCCGCTGGGCCATGTGAGTAGGGGGCTGCTGCACTTCTTGTCTG  
 Pos.601: TGCGCTGGGTTGGTCATGGCGTACAGCTAGGACGGCCATTACAGCTTTCA  
 Pos.651: GTCAGCTTGCACTGGCACTCGATTGCGCTGGTGCAGCGCCGTGCAGCCGCCG  
 Pos.701: TCTGACGTCCCATCCCTTGCTGCGTCCTCCTGCCCCGCAGGCTTGCCGC  
 Pos.751: TGCCGGTATCCTGATCCCCGAGGGCCTGCAGGCCAACGGTGCCAACATCA  
 Pos.801: AGGGTGGCACCTGGTTCGAGACCGGCGCTGAGATGCTCAACGGCGGTACC  
 Pos.851: CTGAACTACTTCGCCGGTGCCTTGGGGCATTGTGTCCAACCCCCcTGCCCC  
 Pos.901: TGTTGACGGTCATCGCCGTTNAGGTCGNCCTNATGGGNGGCCGTGGAGTT  
 Pos.951: CTACgCgCCAGCAAGGGCACCGGCCNCGCAGGCTACTCCCCGGGCATTGG  
 Pos.1001: CAAGTTCAACTAGTCGGTNTTCGACGGCNTGGACCCCTGTACCCCGGNG  
 Pos.1051: GCCCNNTTCGACCCCTGGGCCTTGGCTNACGACCCCGAGGTCTGCAGGA  
 Pos.1101: GCTGAAGGTCAAGGAGATCAAGAACGGCCGCTGGCCATGGTTTCCGTGA  
 Pos.1151: TGGGCTTCNCCNTCCAGTCCTACGTGACCGGCGAGGGCCCCCTACGCCAAC  
 Pos.1201: TGGACCAAGCACGTGGCCGACCCCTTCGGCTACAACCTGCTGACCGTCCT  
 Pos.1251: GGGCGCCGAGGAGCGCACCCCCACCCTGTAAATGCCTTTTCCAGCTACAG  
 Pos.1301: CCTGAGTCATTGTGATGAAATGCGTAGAGGAGAGGAGCGGGGAGGAGTTG  
 Pos.1351: GCGGCGGCGGAGGTGGGCGNCGGCAGCCTGCGGCTAGGGCTCCGCCCTG  
 Pos.1401: TTGTGCGGCGGGCGACTCGCGGCGGCGGCTGGGAACATTTCGTGCTGCGGT  
 Pos.1451: GCGCGTGTTGTGAGGCTTGCTGTGATTAAATTGGGCGCGTGCCCCTGCA  
 Pos.1501: GGGACATCCCGGGTGGTGTAGGTNTGCAGAGGGTACGGATGGGTGGAGAC  
 Pos.1551: GGCCCTTGGGCCGGATTGAGGGTTGGG

## Anhang E: Teilsequenz des putativen *nit 8* – Gens

Dargestellt ist eine Consensussequenz aus den jeweils aus beiden Richtungen sequenzierten Fragmenten aus den BAC – Klonen 19j16 und 27p23. Die UG – Repeats sind unterstrichen.

Pos.1 - 717:

TGCAGACCGCGGATGAGGTGACCGACGCCATCCTCTACCCCGAAGTCTGCGTCATCTGCA  
 CCTTCCCCGACGGCTCAACCGACTACTG-CCAGTGCGACCGCCGCAACGGTGCCACCAA-  
 CTACCTGTCAGTCGAGACCATCGTACAGGACTCCATCACTCCCGCCATGCGCGCCGCCGC  
 CATCGCGCTCTCCGTCTTCTCGCCGCTCTTCCTCATMTTCTACGCCACTGCCGACACGCT  
 CTATTTCCGCAACACGGGTAAATCGCTGCGCATCGGCCACATMTAAAGGATTCGAGCTAG  
 GCACCAGTTGCTGTAGCTGCTATACGGTGTTTGGCTTTTGTGCCGGCTGCTTTTGTGCCG  
 GTGGGGGCTAGTTGGGCACAGCCTGTTGTTGTGTTGGGACGGCTGGAGACCTGCAATCCA  
 TGC GTTGTGCCGCCGGGAAACCGGTGTGTGGAGGGAGCGGAGTGATGTGACTCGTAGCAT  
 GAACGGTGTTGAATCGCAATGCTGATGGTTTGTGTGTAACCGTGTGTGACAAGGACATCG  
 GGAGACGAGAGCAGTGGCAGCGCGATTGTGCACAGAGCTGCCGCCCTGCCTGCATGTGT  
 GCATGCTTgTGTGCGTGTGGTCTGTGACTATGGGGTCGCGCGCGTGTGTGTGTGTGTGTG  
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGCTTGCCTGACGAGAGACTTCTCAACTCTGCAG

## Anhang F: Teilsequenz des Kandidatengens KG 1

Diese Sequenz stellt das 3' - Ende eines Contigs ab Position 631 aus mehreren EST – Sequenzen dar, der im Rahmen eines EST – Projekts an der Duke University (USA) erstellt wurde. Grau unterlegt ist der Teil, der mit dem in dieser Arbeit sequenzierten Kandidatengen übereinstimmt. Die UG – Repeats sind unterstrichen.

Pos.631 – 1278

```

GGAGGCGGAGCCCGCGCCGCGCGCCGCGCCCCCGCGTGGCTGCCC GG GCGACTGCAGCGG
CCACGGGCTTTGCAACGTGGCTGCGGGCACGTGCCTGTGCGGGGCCGGGTACGAGGGAGA
GGACTGCAGCGAGAGGCAGAAGGCGCGGCGGCTGCGTGGCAATTAGTTCGTGCCTGAGGA
AGAGGAAGAGGAAGACGGGGCATTGTTGGTAACCATCGTTGGGATGAGTGCACGCAGGAC
TTTCAGTAGTGTGTCATGTGCATATGGTGCAGCGGGACAGTAGGGTTTGCATGGCATGGA
CTGCGGAGCAATGCATGTGTCTGTGTCTTGAGACGTAGCAAGTACTTTGACATACCGGT
GCATGTCTTTGTGTTGATAAAAGCAGGAACACAAGCAGAAAGGTTGCTACCACTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TAAAGAGCACAAGGAAAACGTTGC
GCAAAGACAGTGTATGCGATGCAGCAAAGCGACGGTTTACGGGTGTTACCTGAAGTTACC
TCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TAGGAAAAGCAC
AAGGGA ACTATTGGACACTGCGCATATGCGAAGACAATGGTCAAAAAA

```



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis November 2002 im Arbeitsbereich Zellbiologie des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg durchgeführt und von Okt. 1999 bis Sept. 2001 durch das DFG-Projekt We 2365/2-1 gefördert. Ich möchte hiermit allen danken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Mergenhagen danke ich für die Bereitstellung sämtlicher Daten über die Periodenlängen der Kreuzungsnachkommen und seine kompetente Einführung in die Theorie der circadianen Rhythmik sowie die Bereitschaft, als Dissertationsgutachter zur Verfügung zu stehen.

Herrn Prof. Dr. Mühlbach danke ich für viele lobende Worte und für die Tätigkeit als Disputationgutachter.

Frau Prof. Dr. Pratje danke ich dafür, dass sie als Dissertationsgutachterin zur Verfügung stand.

Herrn Prof. Dr. Lörz möchte ich danken, dass er bereit war, auch kurzfristig noch als Disputationgutachter zu fungieren.

Besonders danke ich natürlich Herrn Dr. Ralf Werner für die Bereitstellung des Themas und der Arbeitsstelle, seine Einführung in die praktische und theoretische Molekularbiologie, für die Beantwortung von unzähligen Fragen und kompetente Hilfe bei allen Computerproblemen. Ohne seine zahllosen Ideen wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Frau Jasna Olschewski gilt mein Dank für die Einführung in die praktischen Details der AFLP-Analyse und für viele hilfreiche Gespräche.

Frau Heidrun Meyer möchte ich ganz herzlich danken für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Pflege der zahlreichen Kreuzungsnachkommen und der Durchführung der Photoakkumulationsmessungen sowie ihre Geduld bei der Einweisung in die hohe Kunst des Zygotenverschiebens.

Frau Khanh Le danke ich für wertvolle Dienste als studentische Hilfskraft, ihre zuverlässige Mitarbeit bei der Anzucht der Kulturen sparte mir viel Zeit.

Frau Dr. Anya Ipsen danke ich für seelisch – moralische und molekularbiologische Hilfestellung in den letzten drei Jahren.

Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsbereiche Genetik und Zellbiologie danke ich für hilfreiche Tips an einen Anfänger in der Molekularbiologie sowie für die nette Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonderer Dank gebührt meinem Mann Martin, der mich nicht nur an so manchem Wochenende ins Institut begleitete, sondern mich auch finanziell und moralisch unterstützte und der inzwischen sogar *Chlamydomonas reinhardtii* sagen kann!

