

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 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 Transformanden 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.