

Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie
Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie der Pflanzen

Dissertation

Identifizierung und Charakterisierung
Zelltyp-spezifischer Gene
in der Grünalge *Volvox carteri*

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld

Vorgelegt von
Arash Kianianmomeni

Bielefeld, Dezember 2008

Inhaltverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	<i>Volvox carteri</i> als Modellorganismus für die Zelldifferenzierung	3
	2.1.1 Die Grünalge <i>Volvox carteri</i>	3
	2.1.2 Differenzielle Genexpression in <i>Volvox</i>	6
2.2	Die Rolle des Retinoblastoma-Proteins in der Entwicklung von <i>Volvox</i>	8
	2.2.1 Retinoblastoma-Protein	8
	2.2.2 Struktur und Regulation des RB-Proteins	9
	2.2.3 RB-Proteine in Pflanzen und Algen	11
2.3	Channelrhodopsine in <i>Volvox</i>	15
3	Zielsetzung dieser Arbeit	19
4	Diskussion der Ergebnisse	20
4.1	Quantitative Analyse der Zelltyp-spezifischen Genexpression in <i>Volvox</i>	20
4.2	Das geschlechtsspezifische Retinoblastoma-Protein1 in <i>Volvox</i> deutet auf eine zusätzliche Rolle der RB-Proteine bei der sexuellen Entwicklung hin	27
4.3	Channelrhodopsine in <i>Volvox</i>	39
5	Charakterisierung eines RNA-bindenden Proteins, NAB1, in <i>Volvox</i>	52
5.1	Einleitung	52
5.2	Material und Methoden	55
5.3	Ergebnisse	61
	5.3.1 <i>NABI</i> -Gen aus <i>Volvox</i>	61
	5.3.2 <i>LHCBM</i> -Gene in <i>Volvox</i>	64
	5.3.3 Differenzielles Spleißen des <i>NABI</i> -Gens	67
	5.3.4 Zelltyp-spezifische Expression des <i>NABI</i> -Gens	68

5.3.5	<i>NABI</i> -Expression während des Lebenszyklus von <i>Volvox</i>	70
5.4	Diskussion	73
6	Ausblick	77
7	Literatur	79
8	Anhang	97
8.1	Abkürzungen	97
8.2	<i>NABI</i> -Sequenz	99
9	Publikationen	112

1 Zusammenfassung

Die Grünalge *Volvox carteri* besteht aus nur zwei Zelltypen, die unterschiedliche Funktionen besitzen. Die klare Arbeitsteilung zwischen den Gonidien, die für die Reproduktion verantwortlich sind, und den für Bewegung spezialisierten Somazellen macht diese Alge zu einem interessanten Modellorganismus für die Untersuchung der Zelldifferenzierung. Die Aufklärung der Unterschiede zwischen diesen beiden Zelltypen bezüglich der Genexpression kann wichtige Auskünfte über die Funktionsweise der Zelldifferenzierung liefern. Durch die Verwendung von *Real Time* RT-PCR-Analysen wurde die Expression einer Gruppe von 39 Genen aus 170 bioinformatisch analysierten cDNA-Sequenzen in beiden Zelltypen gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass 16 dieser Gene signifikant stärker in Somazellen exprimiert werden, während weitere zehn Gene eine höhere Expression in Gonidien aufweisen. Der Zusammenhang zwischen der zelltypspezifischen Lokalisation von Soma-spezifischen Genen und ihrer Funktion wurde im Rahmen dieser Arbeit analysiert und diskutiert. Unter den in Somazellen exprimierten Genen befand sich ein Retinoblastoma-ähnliches Gen (*RBR1*). Die Untersuchungen, die im weiblichen Stamm *Eve10* durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass dieses Gen während der Embryogenese hoch exprimiert wird. *RBR1* wird in *Volvox* posttranskriptionell (durch differenzielles Spleißen) und posttranslationell (Phosphorylierung durch CDK-Cykline) reguliert. Die genauere Analyse von *RBR1* hinsichtlich der Expression in den beiden Zelltypen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryogenese konnte zeigen, dass dieses Gen in allen untersuchten Stadien stärker in den Somazellen als in Gonidien exprimiert wird. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass *RBR1* nicht nur an der Embryogenese sondern auch an der Seneszenz der Somazellen beteiligt sein könnte. Im Vergleich zum asexuellen Lebenszyklus wird *RBR1* im sexuellen Lebenszyklus deutlich stärker exprimiert, was auf dessen Rolle bei der sexuellen Entwicklung in *Volvox* hinweist. Daraufhin wurde vergeblich mit verschiedenen PCR-Ansätze (mit normalen und degenerierten Oligos) und Southern-Blot-Analyse nach *RBR1* in Männchen gesucht. Deshalb wurden als nächstes die Männchen (*Volvox*-Stamm *281-1*) mit *RBR1* von Weibchen transformiert, was zur Zunahme der Zellgröße bei den Somazellen, Gonidien und Spermienpaketen führte. Die Abwesenheit von *RBR1* in Männchen einerseits und die Funktionalität

des *RBR1* von Weibchen in Männchen andererseits deutet darauf hin, dass vermutlich ein funktionell analoges Gen zu *RBR1* in Männchen vorhanden ist, das jedoch an die neuen geschlechtlichen Anforderungen angepasst wurde. Die höhere Expression des *RBR1* während der Embryogenese in *Volvox* zusammen mit der Beobachtung der Zellgrößenveränderung bei den Transformanten lässt vermuten, dass *RBR1* an der Bestimmung der Zellgröße während der Zellteilung beteiligt ist. Die Messung der Zellgröße ist für die zeitliche Lokalisation der asymmetrischen Zellteilung im sexuellen und asexuellen Lebenszyklus von *Volvox* und ist darüber hinaus für die Bestimmung des Schicksals der Zellen nach der asymmetrischen Zellteilung (ob sie sich zu Gonidien oder zu Somazellen entwickeln) sehr bedeutend.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Channelrhodopsine (*CHR1* und *CHR2*) identifiziert und charakterisiert. Diese beiden Channelrhodopsine von *Volvox* zeigen Homologie zu den bekannten Bakteriorhodopsinen, die sich durch eine Ionen-Kanal-Aktivität auszeichnen. Die *Real Time* RT-PCR-Analyse zeigte, dass *CHR1* und *CHR2* fast ausschließlich in Somazellen exprimiert werden. Die Expression beider Gene ist während der Embryogenese, wenn die Zelldifferenzierung beginnt, sehr hoch und reagiert auf Umgebungsfaktoren wie Temperatur und Licht. Die Daten zeigen, dass *CHR1* und *CHR2* neben der Beteiligung bei den lichtinduzierten Reaktionen in *Volvox*, auch bei der Zelldifferenzierung eine zusätzliche Rolle spielen.

In den zwei Zelltypen von *Volvox* wird die Photosynthese auf verschiedene Art und Weise reguliert. Bezüglich der Zelltyp-spezifischen Regulation der Photosynthese in Gonidien und Somazellen, wurde das *NAB1*-Gen (nucleic acid binding) in Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Die zwei Spleißvarianten dieses Gens zeigen eine Zelltyp-spezifische Expression. Die erste Spleißvariante ist Gonidien-spezifisch und die zweite Spleißvariante ist Soma-spezifisch. Die Aminosäuresequenz von *NAB1* zeigt, dass dieses Gen zwei RNA-Bindedomänen (CSD und RRM) besitzt. Weiterhin konnte durch die Identifizierung der 14 *LHCBM*-Gene in *Volvox* gezeigt werden, dass sie in ihrer mRNA eine CSD-Konsensussequenz besitzen, die als Bindungsstelle der CSD-Domäne des *NAB1* dient. Die Expression der *LHCBM*-Gene wird vermutlich durch zwei zellspezifische *NAB1*-Spleißvarianten in beiden Zelltypen unterschiedlich kontrolliert.

2 Einleitung

2.1 *Volvox carteri* als Modellorganismus für die Zelldifferenzierung

2.1.1 Die Grünalge *Volvox carteri*

Volvox carteri entstammt der Familie Volvocaceae und dient als Modellorganismus für Phototaxis, Physiologie, Genetik und Molekularbiologie (Oltmanns 1892; Holmes 1903; Starr 1970; Kirk 1997). Diese kugelförmige Grünalge besteht nur aus zwei Zelltypen, den somatischen sowie den reproduktiven Zellen (Gonidien). Neben der 2000-3000 kleineren Somazellen besitzt ein *Volvox*-Sphäroid ~16 große Gonidien (Starr, 1969, 1970), die durch Teilung neue Tochterkolonien bilden können. Die Gonidien sind innerhalb des Sphäroides in der extrazellulären Matrix (ECM) lokalisiert und haben keinen direkten Kontakt zum Umgebungsmedium. Die Somazellen, die sich dagegen an der Oberfläche des Sphäroides befinden, sind unter anderem für die Phototaxis und Chemotaxis verantwortlich (Kirk 1997; Hoops 1993).

Volvox carteri vermehrt sich normalerweise asexuell. Der asexuelle Lebenszyklus dauert unter Laborbedingungen 48 Stunden bei einem 16 h Licht / 8 h Dunkel-Rhythmus. In Abbildung 2-1 ist der asexuelle Lebenszyklus von *Volvox* dargestellt. Jedes Gonidium teilt sich zunächst fünf Mal symmetrisch, wobei 32 gleich große Zellen entstehen. 16 dieser Zellen teilen sich bei der sechsten Runde asymmetrisch und bilden Große und kleine Teilungsprodukte. Der Zeitpunkt der asymmetrischen Teilung ist für die Zelldifferenzierung sehr bedeutend (Kirk 1997). Die Untersuchungen zeigen, dass die Unterschiede in der Zellgröße und nicht in der Zusammensetzung des Cytoplasmas das Schicksal der Zellen bestimmen (Kirk et al. 1993; Kirk 1997). Die großen Zellen entwickeln sich im weiteren Verlauf des Lebenszyklus zu Gonidien, die kleineren zu somatischen Zellen. Die Gonidien teilen sich zwei oder drei weitere Male asymmetrisch und bilden weitere somatische Zellen. Die Somazellen hingegen teilen sich elf- bis zwölfmal symmetrisch weiter (Kirk 1997). Am Ende der Zellteilungen liegen die Gonidien an der Außenseite des Embryos, während die Basalkörper der Flagellenanlagen nach innen der Hohlkugel gerichtet sind. Im Rahmen der so

genannten Inversion stülpt sich die Alge komplett um, wodurch die Gonidien daraufhin im Inneren des Sphäroides und die Somazellen mit dem nach außen gerichteten Flagellen auf der Oberfläche des Sphäroides lokalisiert sind, also die Zellen im Embryo die gleiche Anordnung wie in der Mutterkolonie besitzen (Viamontes und Kirk 1977; Viamontes et al. 1979; Hallmann 2006a). Am Ende der Embryogenese sind die Zellen noch mit der Plasmamembran verbunden und der Embryo beinhaltet keine ECM. Nach der Inversion beginnt eine lange Wachstumsphase, in welcher die ECM synthetisiert wird. Am Ende des Lebenszyklus macht die ECM 95% des gesamten Volumens aus (Sumper und Hallmann 1998; Hallmann 2003). 30-36 Stunden nach Beginn der Zellteilung schlüpfen die Tochterkolonien aus der Mutterkolonie. Die Tochterkolonien wachsen weiter und beginnen ca. zehn Stunden nach ihrer Freisetzung aus der Mutterkolonie mit der Zellteilung. Der asexuelle Lebenszyklus ist in *Volvox* bei weiblichen und männlichen Individuen identisch. Die beiden Geschlechter sind in diesem Lebenszyklus nicht voneinander unterscheidbar. Im Gegensatz dazu ist das Teilungsprogramm in der sexuellen Entwicklung anders als in der asexuellen Entwicklung.

Der Zeitpunkt der asymmetrischen Zellteilung ist für die sexuelle Differenzierung in *Volvox* sehr wichtig. Unter extremen Bedingungen wie z.B. Trockenheit oder Stress schaltet der Organismus allerdings in den sexuellen Lebenszyklus um und bildet widerstandsfähige Zygoten, die in der Lage sind diese extremen Bedingungen zu überleben (Hallmann et al, 1998; Hallmann 2003). Der sexuelle Lebenszyklus wird durch ein 32 kD Glykoprotein (Sex-Induktor) eingeleitet, das schon ab einer Konzentration von 10^{-16} M aktiv ist (Starr und Jaenicke 1974; Tschochner et al. 1987; Mages et al. 1988). Dieses Glykoprotein wird in Spermien während des sexuellen Lebenszyklus oder in Somazellen der asexuellen Algen nach Hitzeschock produziert (Starr und Jaenicke 1974; Kirk und Kirk 1986). Im sexuellen Lebenszyklus findet die asymmetrische Zellteilung bei Weibchen im Vergleich zu dem asexuellen Lebenszyklus um eine Runde verzögert, also erst in der siebten Runde, statt, was zur Bildung von 32 Eizellen und ~2000-3000 Somazellen führt. Im sexuellen Lebenszyklus der Männchen findet die asymmetrische Zellteilung erst in der achten Runde statt, infolgedessen dann 128 Spermienpakete und 128 Somazellen gebildet werden. Jedes Spermienpaket beinhaltet 64 oder 128 Spermien (Hallmann et al. 1998). Die Spermienpakete

besitzen wie Somazellen zwei Flagellen und schwimmen nach der Freisetzung im Medium. Nach dem Kontakt mit einem weiblichen Sphäroid im sexuellen Lebenszyklus werden die Eizellen durch Spermien befruchtet. Dadurch gebildete Zygoten können in den extremen Umweltbedingungen wie z.B. Kälte und Hitze überleben (Hallmann 2003). Da *Volvox* sich als Modellorganismus für die Aufklärung der Zelldifferenzierung eignet und seit den 70er Jahren intensive genetisch und molekularbiologisch untersucht wird (Kirk 1988), ist die Suche nach neuen Zelltyp-spezifischen Genen und Untersuchung ihrer Rolle bei der Zelldifferenzierung von enormer Bedeutung. Im folgenden Kapitel soll ein Einblick in die Zelltyp-spezifische Genexpression in *Volvox* gegeben werden.

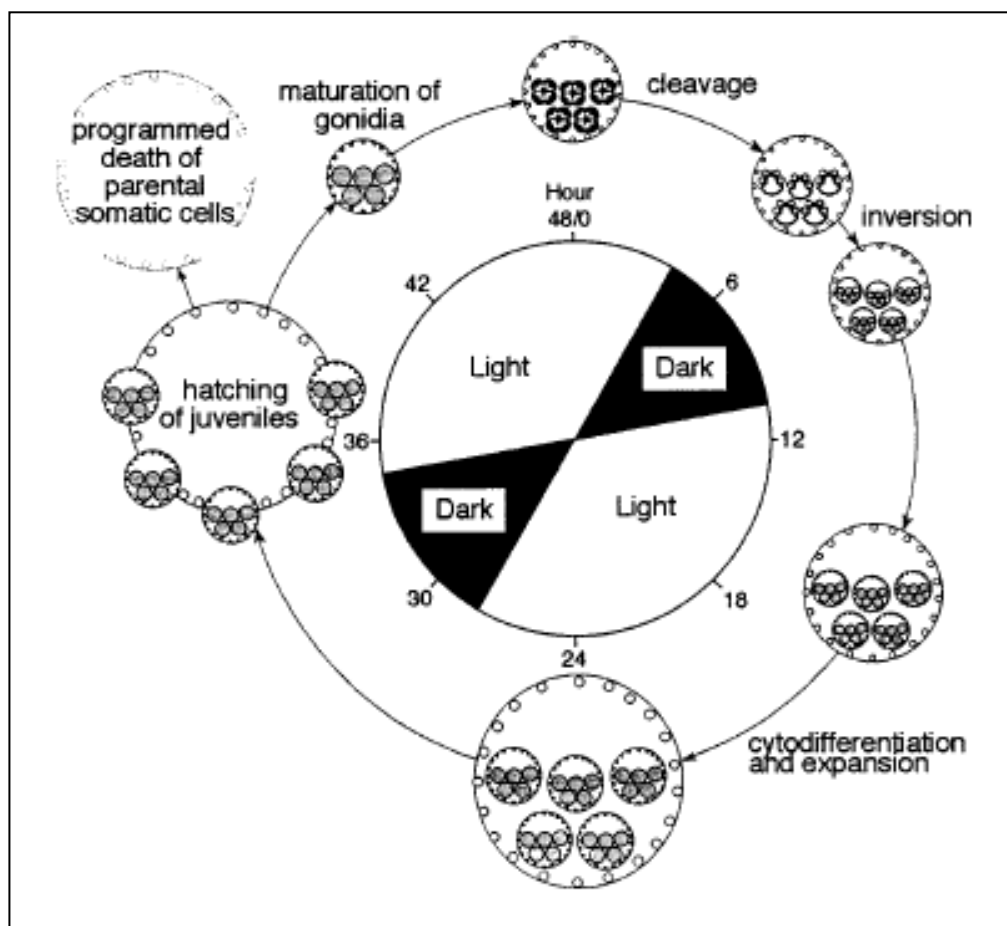


Abbildung 2-1: Darstellung des asexuellen Lebenszyklus von *Volvox* (Kirk 1997).

Die Dauer des asexuellen Lebenszyklus von *Volvox* beträgt 48 Stunden bei einem 16 h Licht / 8 h Dunkel-Rhythmus. Die Zellteilung beginnt in der Lichtphase und dauert ~ 6 Stunden. Die etwa 45 minütige Inversion beginnt daran anschließend (Hallmann 2006a). Nach der Inversion wachsen die Tochterkolonien innerhalb der Mutterkolonie und werden am Schluss freigesetzt.

2.1.2 Differenzielle Genexpression in *Volvox*

Um die genetischen Hintergründe der Zelldifferenzierung zu untersuchen bildet ein einfacher Mikroorganismus wie *Volvox* enorme Vorteile. Im Gegensatz zu höheren Organismen wie z.B. *Arabidopsis* oder *Drosophila*, besitzt *Volvox* nur zwei Zelltypen mit einer klaren Arbeitsteilung. Während die für die Bewegung spezialisierten Somazellen nach zwei bis drei Tagen anhand einer programmierten Seneszenz sterben, teilen sich die Gonidien weiter, um neue Tochterkolonien zu bilden (Pommerville und Kochert 1981, 1982; Kirk 1997). Die beiden Zelltypen unterscheiden sich in ihrer Größe. Die Gonidien haben einen Durchmesser von ~ 55 µm, wohingegen der Durchmesser der Somazellen ~7 µm beträgt. Durch diesen Größenunterschied können die beider Zelltypen anhand mechanischer Methoden im Labor relativ einfach voneinander getrennt werden (Kirk et al. 1993; Tam und Kirk 1991). Diese Trennung erlaubt die Untersuchung Zelltyp-spezifischer Expression verschiedener Gene, was wertvolle Kenntnisse über die mögliche Funktion der jeweiligen Gene liefern kann.

Die ersten Studien über die Zelltyp-spezifische Genexpression in *Volvox* zeigten, dass eine Gruppe von Genen in beiden Zelltypen unterschiedlich exprimiert wird (Tam und Kirk 1991; Tam et al. 1991). Die Expressionsanalyse von 31 Genen in Somazellen und Gonidien zu verschiedenen Zeitpunkten des asexuellen Lebenszyklus von *Volvox* zeigte, dass 19 dieser Gene, wie z.B. *G167* und *G1*, überwiegend in Gonidien und 13 dieser Gene, wie z.B. *S1* und *S4* stärker in Somazellen exprimiert werden (Tam und Kirk 1991). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass die meisten der Gonidien-spezifischen Gene an der Photosynthese beteiligt sind (Choi et al. 1996; Meissner et al. 1999). Die genauere Expressionsanalyse der Soma-spezifischen Gene lässt vermuten, dass manche dieser Gene an der früheren und die anderen an der späteren Entwicklung der Somazellen beteiligt sind (Tam et al. 1991).

Obwohl die Ermittlung weiterer Zelltyp-spezifischer Gene in *Volvox* große Bedeutung hätte, konnten bislang nur wenige Untersuchungen dieser Art durchgeführt werden. Gegenwärtig sind die Untersuchungen, die gleichzeitig eine große Zahl der Gene auf ihre Zelltyp-spezifische Expression überprüfen, wünschenswert. Die Untersuchung der Genexpression in *Volvox* während des Lebenszyklus oder in zwei verschiedenen Zelltypen wurde bislang nur mit

Methoden wie Northern Blot oder *in situ* Hybridisierung durchgeführt (Tam und Kirk 1991; Tam et al. 1991). Diese Methoden weisen jedoch einige Nachteile auf, die sie für den Einsatz in der globalen Expressionsanalyse ungeeignet machen. Solche Großansätze benötigen neue Verfahren, die einfach, schnell, sensitiv, genau, spezifisch und kostengünstig sind. Zurzeit werden hauptsächlich zwei Methoden für die Untersuchung einer großen Anzahl von Genen eingesetzt, nämlich die Analyse mittels *Microarrays* und *Real Time* RT-PCR (Skena et al. 1995; Giulietti et al. 2001; Mocellin et al. 2003). Obwohl bei *Microarrays*-Analysen wesentlich größere Mengen an Daten bearbeitet werden können, ist die Durchführung sehr kostspielig und Informationen zum kompletten Genom oder cDNA Daten müssen verfügbar sein (Durinck 2008). Zudem müssen die Ergebnisse der *Microarrays*-Analysen bezüglich der Expressionsanalysen anschließend mit präziseren Methoden wie der *Real Time* RT-PCR bestätigt werden. Die quantitative *Real Time* RT-PCR ist von daher eine Methode, die allen Anforderungen gerecht werden kann, welche an ein Schnellverfahren gestellt werden. Diese Methode wird deswegen sehr häufig zur Untersuchung der differentiellen Genexpression in verschiedenen Organismen eingesetzt (Schenk et al. 2003; Shi et al. 2003; Lee et al. 2008; Zhou et al. 2008). Durch die Anwendung dieser Methode zur quantitativen Analyse der Genexpression in *Volvox* kann der Zusammenhang zwischen der differentiellen Genexpression und der Funktion bestimmter Gene bezüglich der Zelldifferenzierung analysiert und erforscht werden. Der erste Teil dieser Arbeit (Nematollahi et al. 2006) beschäftigt sich mit der bioinformatischen Analyse und Charakterisierung eines *Sets* von verschiedenen Gen-Kategorien. Darauf folgend soll die Expression dieser Gene mittels *Real Time* RT-PCR-Verfahren in den Somazellen und in den Gonidien untersucht werden.

2.2 Die Rolle des Retinoblastoma-Proteins in der Entwicklung von *Volvox*

2.2.1 Retinoblastoma-Protein

Die Regulation der Zellteilung gehört zu den komplexesten Prozessen der Natur, bei der die Bestimmung der Zellgröße, die Zahl der Zellteilungen und die Reparatur genetischer Defekte während der Zellteilung in Vordergrund stehen (Stals und Inzé 2001). Das Retinoblastoma-Gen, das als erstes bei den Menschen entdeckt wurde und dessen Defekt als Ursache für verschiedene Krebsarten gilt, kodiert für das Retinoblastoma-Protein (RB), das einer der Hauptregulatoren der Zellteilung ist (Lee et al. 1987; Fung et al. 1987; Friend et al. 1986; Weinberg 1995). Das Retinoblastoma-Protein ist ein im Kern lokalisiertes Phosphoprotein, das die Expression mancher Gene verhindert, die für den Übergang der Zelle von G1- in die S-Phase nötig sind (Weinberg et al. 1995). Dies geschieht durch die Bindung des RB-Proteins an E2F-Transkriptionsfaktoren, wodurch deren Funktion unterdrückt wird (Hiebert et al. 1992; Flemington et al. 1993; Nevins 1998; Dyson 1998). Die letzteren sind für den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase entscheidend, da sie die Expression von Genen, die an der Zellteilung, DNA-Synthese und Replikation beteiligt sind, kontrollieren (Menges et al. 2002; Ren et al. 2002). Neben den E2F-Transkriptionsfaktoren gibt es weitere RB-Interaktionspartner wie z.B. DP1 und DP2 (Trimarchi und Lees 2002). E2F- und DP-Proteine binden gemeinsam an E2F-Bindungsstellen, was zur Stabilität der Anbindung beiträgt (Dyson 1998). Außer einer direkten Bindung an E2F-Transkriptionsfaktoren und der darauf folgenden Runterregulation der Genexpression können bestimmte Chromatin-remodellierende Faktoren wie DNA-Methyltransferase (DNMT), Histon-Deacetylase (HDAC) und Histon-Methyltransferase (HMTase) durch Interaktion mit dem RB-E2F-Komplex die Transkription der Gene blockieren (Abbildung 2-2; Robertson et al. 2000; Ferreira et al. 2001; Nicolas et al. 2001; Steele-Perkins et al. 2001; Dunaief et al. 1994; Morris und Dyson 2001).

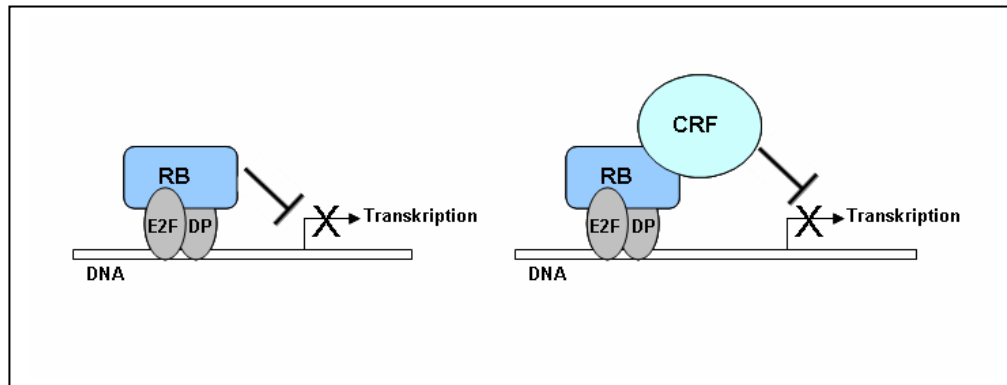


Abbildung 2-2: Unterdrückung der Genexpression durch RB während der G1-Phase.

Durch direkte Bindung an den E2F-DP-Komplex wird die transkriptionelle Aktivität von E2F verhindert und die Genexpression reprimiert (links). Darüber hinaus können die Chromatinremodellierende Faktoren (CRF) wiederum an den RB-E2F-DP-Komplex binden (rechts) und dadurch die Expression der Zielgene von E2F blockieren (verändert nach Harbour und Dean 2000).

2.2.2 Struktur und Regulation des RB-Proteins

Das RB-Protein besitzt drei verschiedene Regionen, den N-Terminus, einer Zentralregion mit zwei Domänen (A und B), die in allen bis jetzt identifizierten RB-Proteinen verschiedener Organismen konserviert ist, und einen C-Terminus (Durfee et al. 2000; Dick 2007). Die N- und C-Terminus des RB sind für die Aktivität des Proteins sehr wichtig. Außerdem werden diese beiden Regionen zum Teil als Bindungsstelle für Interaktionspartner des RB-Proteins vermutet (Durfee et al. 1994; Riley et al. 1997; Dick und Dyson 2003). Die essentielle Region für die Interaktion zwischen RB-Protein und anderen Proteinen liegt aber im Zentrum des Proteins. Die A- und B-Domänen sind notwendig für die Funktion des RB-Proteins bzw. dessen Bindung an die interagierenden Proteine E2F, DP und andere. Die B-Domäne beinhaltet eine LxCxE-Bindungsstelle, die für die Bindung an den Proteinen wie z.B. E2F, die ein LxCxE-Motiv enthalten, verantwortlich ist (Dyson et al. 1989; Münger et al. 1989; Lee et al. 1998). Die Veränderung dieser Bindungsstelle durch Punktmutation oder die Blockierung durch Bindung viraler Proteine, wie z.B. menschliches Papillomavirus E7 führen zur Inaktivierung des RB (Dick 2007).

Die Regulation des RB-Proteins erfolgt durch Phosphorylierung. Nur das hypophosphorylierte RB kann an E2F binden und so dessen transkriptionelle Aktivität unterdrücken (Dyson 1998; Morris und Dyson 2001), d.h. das RB-

Protein kann nur in hypophosphorylierter Form an Interaktionspartner in der G1-Phase binden. Mit dem Beginn der S-Phase wird RB durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) und deren Interaktionspartner (CyclinD, CyclinE und CyclinA) phosphoryliert und diese hyperphosphorylierte Form kann nun nicht mehr an E2F und andere an der Zellteilung beteiligte Proteine binden (Sherr 1996; Harbour und Dean 2000; Shen 2002). Die Inaktivierung des RB-Proteins führt zum Übergang der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase, bevor die optimale Größe für die Teilung erreicht wird oder DNA-Schäden repariert werden (Lundberg und Weinberg 1998). Die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und deren Interaktionspartner wird durch Wachstumssignale reguliert (Mittnacht 1998). Abbildung 2-3 zeigt verschiedene Formen des RB in G1- und S-Phase.

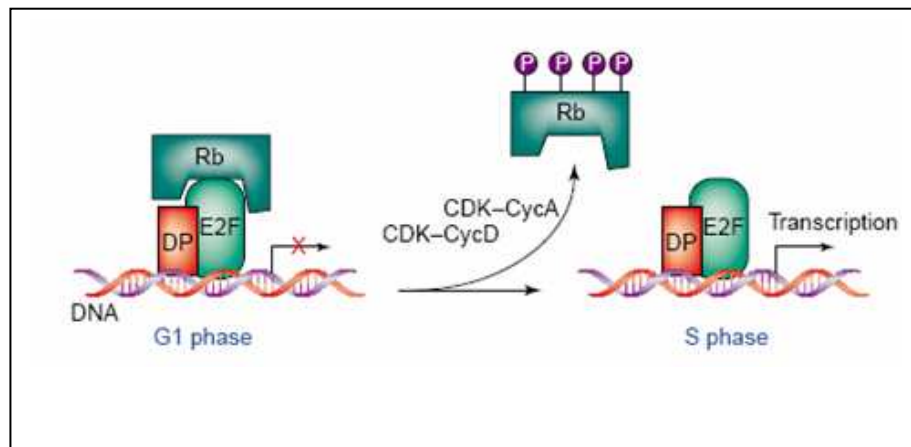


Abbildung 2-3: Die Aktivität des RB-Proteins in hypodephosphorylierter und hyperphosphorylierter Form während der G1- und S-Phase.

Während der G1-Phase ist RB hypophosphoryliert und bindet an den E2F-DP-Komplex. Dies verhindert die transkriptionelle Aktivität von E2F. Am Ende der G1-Phase und mit dem Beginn der S-Phase wird RB durch CDK-Cyclin-Komplexe phosphoryliert (hyperphosphorylierte Form). Durch diese Phosphorylierung trennt sich RB vom E2F-DP-Komplex. Nach diesem Schritt werden die Zielgene von E2F, die an Zellteilungsregulation, DNA-Synthese und Replikation beteiligt sind, exprimiert (Shen 2002).

2.2.3 RB-Proteine in Pflanzen und Algen

Das Vorkommen von RB-Proteinen in Menschen und Tieren zusammen mit der Entdeckung ihrer Rolle in der Regulation der Zellteilung deutet darauf hin, dass diese Proteine eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Organismen spielen. Auf der Suche nach RB-Proteinen in anderen Organismen berichteten Grafi et al. (1996) von dem ersten pflanzlichen RB-Protein in Mais. Die Ähnlichkeit zwischen diesem Protein und den RB-Proteinen der Säugetiere, die Interaktion mit viralen Proteinen und die Phosphorylierung durch eine S-Phase-Kinase weisen darauf hin, dass die Funktion der RB-Proteine in Pflanzen ähnlich zu der in Tieren ist (Grafi et al. 1996). Weitere Untersuchungen zeigten, dass pflanzliche und tierische RB-Proteine hinsichtlich der Struktur, Regulation und Funktion Ähnlichkeiten besitzen. Die wichtigsten Bindungsdomänen (A- und B-Domäne) zuzüglich einer Leucin-reichen Region im N-Terminus der RB-Proteine, die vermutlich für die subzelluläre Lokalisation der RB-Proteine und auch ihre Interaktion mit den RB-Partnern wie z.B. Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) notwendig ist, sind während der Evolution konserviert geblieben (Sternier et al. 1995; Xie et al. 1996; Ach et al. 1997; Durfee et al. 2000; Lendvai et al. 2007). Auch die Interaktionspartner sind zum großen Teil bei Pflanzen und Tieren gleich. Dazu gehören z.B. E2F, DP, Cycline, chromatingebundene und virale Proteine (Huntley et al. 1998; den Boer und Murray 2000; Rossi und Varotto 2002; Shen 2002). Die Aktivität des RB-Proteins wird bei den Pflanzen wie bei den Tieren durch Cyclin-CDK Komplexe reguliert (Nakagami et al. 1999). Im Gegensatz zu Säugetieren, bei denen die Phosphorylierung des RB-Proteins durch CDK-Cyclin-D (CycD), CDK-Cyclin-E (CycE) und CDK-Cyclin-A (CycA) durchgeführt wird (Harbour und Dean 2000; Trimarchi und Lees 2002), wurden jedoch bei den Pflanzen bislang nur CycD und CycA identifiziert (Shen 2002). In *Arabidopsis* gibt es z.B. zehn CycD Homologe, die meist das LxCxE-Bindeelement besitzen (Vandepoele et al. 2002). Die Ähnlichkeit der pflanzlichen und tierischen RB-Proteine einerseits und das Vorhandensein konservierter Interaktionspartner wie z.B. E2F und Cycline andererseits sind ein zusätzlicher Hinweis für die Ähnlichkeit der Rolle der RB-Proteine in den Pflanzen und Tieren. Der Zusammenhang zwischen zelltyp- und entwicklungspezifischer Expression der RB-Proteine in Pflanzen und den

Entwicklungsprozessen wie z.B. Wurzelwachstum und Gametophyt konnte bereit nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zeigen, dass eine kontinuierliche Expression des RB-Proteins für die Regulation des Ausgleichs zwischen der Differenzierung und der Erneuerung der Wurzelzellen in *Arabidopsis* notwendig ist. Darüber hinaus führen die Mutationen im Retinoblastoma-Gen von *Arabidopsis* zur Störungen bei dem Gametophyt (Ebel et al. 2004; Dinnery und Benfey 2005; Lendvai et al. 2007).

Auch bei der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde ein zu dem Retinoblastoma-Protein homologes Protein gefunden. Die Untersuchung bestimmter *Mating Type Locus*-Mutanten, deren Zellgröße im Vergleich zum Wildtyp kleiner war, zeigte, dass in diesen Mutanten das *MAT3* Gen (homolog zum Retinoblastoma-Protein) ausgeschaltet war (Armbrust et al. 1995; Umen und Goodenough 2001). *mat3* Mutanten teilen sich bevor die optimale Größe erreicht wird. Die Zahl der Zellteilungen während der S-Phase im Vergleich zum Wildtyp nimmt zu und die Zellen nach der Zellteilung sind ~25-35 % kleiner als die des Wildtyps (Umen und Goodenough 2001). Die Erhöhung der Zellteilungsanzahl in *mat3* Mutanten liegt sehr wahrscheinlich daran, dass eine Überexpression an E2F- und DP-Proteinen vorliegt. Die Überexpression dieser Proteine führt nämlich zu zusätzlichen Zellteilungen in *Arabidopsis* (De Veylder et al. 2002).

Obwohl bei Säugetieren ein RB-Defekt zur Abkürzung der G1-Phase und einem frühzeitigen Übergang zur S-Phase führen kann, ist die Dauer der G1-Phase in *mat3* Mutanten länger als im Wildtyp, was dadurch begründet ist, dass die kleinere *mat3* Mutante mehr Zeit zum Erreichen der optimalen Größe für die Zellteilung benötigt. Während Wildtyp-Algen nur eine 1,5 fache Zunahme des Zellvolumens brauchen, um die optimale Größe zu erreichen, benötigen die *mat3*-Mutanten eine 4-fache Vergrößerung des Zellvolumens (Umen und Goodenough 2001). Diese Ergebnisse zeigen, dass MAT3 an der Kontrolle der Zellgröße in *Chlamydomonas* beteiligt ist. Die Identifizierung von CDK und Cyclin-Proteinen im Genom von *Chlamydomonas* deutet darauf hin, dass die Regulation von MAT3 wie bei Säugetieren und Pflanzen eventuell durch Phosphorylierung kontrolliert wird (Bisova et al. 2005). Andererseits zeigt die Existenz von weiteren RB-Interaktionspartnern wie z.B. E2F und DP1, dass sowohl die Zellteilung als auch der RB-Zyklus in Algen, Pflanzen und Säugetieren in ähnlicher Weise kontrolliert wird (Fang et al. 2006). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass weitere

nicht bekannte Proteine, wie z.B. SMT in *Chlamydomonas* am RB-Zyklus beteiligt sein können (Fang und Umen 2008). Eine Mutation des SMT-Gens führt zur Veränderung der Zellgröße in *mat3* Mutanten, was einen weiteren Hinweis für die Beteiligung dieses Gens an der Zellteilung und der Kontrolle der Zellgröße in *Chlamydomonas* liefert (Fang und Umen 2008). Im Gegensatz zu *Chlamydomonas* besitzt *Volvox* neben einer symmetrischen Zellteilung, was der Zellteilung in *Chlamydomonas* entspricht, eine zusätzlich asymmetrische Zellteilung. Wie schon beschrieben spielt diese asymmetrische Zellteilung eine sehr wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung, der sexuellen bzw. der asexuellen Entwicklung von *Volvox* (Kirk et al. 1993; Kirk 1997; Hallmann 1998). Das Schicksal durch diese asymmetrische Zellteilung entstehender Zellen wird anhand ihrer Größe bestimmt (Abbildung 2-4). So entwickeln sich die größeren Zellen zu Gonidien und die kleineren zu Somazellen (Siehe auch 2.1.1).

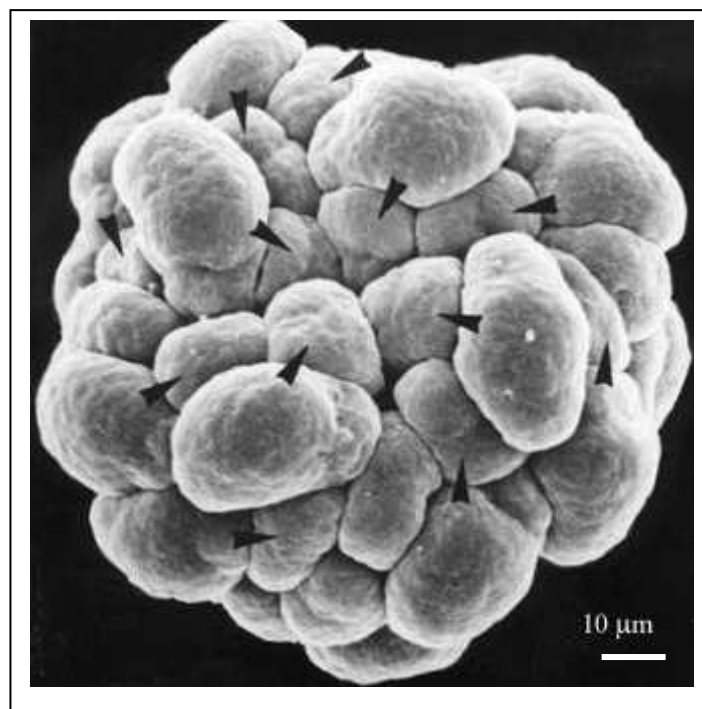


Abbildung 2-4: *Volvox*-Embryo im 64-Zellstadium im asexuellen Lebenszyklus.

Nach fünf symmetrischen Zellteilungen findet eine asymmetrische Zellteilung statt. Bei diesem Schritt teilen sich 16 Zellen asymmetrisch und bilden unterschiedlich große Tochterzellen. Die größeren Zellen werden zu Gonidien und die kleineren zu Somazellen. In dieser Abbildung (Kirk und Kirk 2004) sind die Zellen nach der asymmetrischen Zellteilung gezeigt. Die Pfeile zeigen zwei unterschiedlich große Zellen infolge der asymmetrischen Zellteilung in *Volvox*.

Aufgrund der Tatsache, dass in *Chlamydomonas* die Zellgröße und die Zahl der Zellteilungen durch MAT3 kontrolliert werden, wäre eine Beteiligung der RB-Proteine an der Zellteilung bei *Volvox* möglich. Die Erforschung des Zusammenhangs zwischen der asymmetrischen Zellteilung und den RB-Proteinen könnte weitere Details über die Funktionsweise der Zelldifferenzierung einerseits und Hinweise für die Entwicklung dieses Systems in einem Einzeller wie *Chlamydomonas* bis hin zu einem Vielzeller wie *Volvox* liefern.

Die Regulation der Zelldifferenzierung in *Volvox* ist nicht nur auf asymmetrische Zellteilung zurückzuführen, sondern auch auf physiologische Prozesse danach, die durch Umgebungsfaktoren wie z.B. das Licht kontrolliert werden. Am Ende der Zellteilung in *Volvox* bleiben die beiden Zelltypen undifferenziert bis das Licht ankommt. Das folgende Kapitel soll von daher einen Einblick in den Zusammenhang zwischen dem Licht und der Zelldifferenzierung in *Volvox* geben.

2.3 Channelrhodopsine in *Volvox*

Freibewegliche Mikroorganismen sind in der Lage, ihr Verhalten in Abhängigkeit vom Licht zu ändern. Die Reaktionen der Mikroorganismen auf Licht variieren je nach Lichtintensität und Lichtrichtung. Diese lichtinduzierten Reaktionen spielen eine überlebenswichtige Rolle für die Organismen und werden in verschiedene Kategorien eingeteilt. Eine von diesen Reaktionen ist Phototaxis, bei der Organismus seine Schwimmrichtung in Anhängigkeit von der Lichtquelle ändert (Diehn et al. 1977). Die Phototaxis wird in positive Phototaxis (Bewegung in Richtung höherer Beleuchtungsstärke) und negative Phototaxis (Bewegung in Richtung niedrigerer Beleuchtungsstärke) unterteilt. Photokinese (lichtabhängige Veränderung der Schwimgeschwindigkeit) und photophobische Reaktionen (plötzliche Veränderung in Bewegungsrichtung oder Einstellung des Schwimmens wegen höherer Lichtintensität) sind neben der Phototaxis zwei weitere lichtinduzierte Reaktionen bei den Grünalgen (Diehn et al. 1977; Kreimer 1994). Die Bestimmung der Lichtrichtung in Grünalgen ist als erstens wegen der Photosynthese sehr wichtig. Darüber hinaus dient sie auch als ein Regulationssignal für viele verschiedene zelluläre Prozesse wie beispielsweise Genexpression, Protein- und Lipid-Synthese, Zellteilung und Gametendifferenzierung (Kirk und Kirk 1985; Binder und Anderson 1986; Weissig und Beck 1991; Gloeckner und Beck 1995; Grossman et al. 2004; Guschina und Harwood 2006; Moulager et al. 2007). Die Lichtdetektion und die Signaltransduktion für phototaktische und photophobische Reaktionen in Grünalgen werden durch Rhodopsine vermittelt, die in der Plasmamembran vordem Augenfleck lokalisiert sind (Foster et al. 1984; Hegemann 2008). Rhodopsine sind lichtsensitive Membranproteine, die in der Augenfleck-Region (Augenfleck plus Plasmamembran) von Grünalgen als dominante Proteine vorkommen (Deininger et al. 1995; Schmidt et al. 2006). Bisher wurden zwei Rhodopsine mit Ionenkanal-Aktivität in *Chlamydomonas* identifiziert. Anhand der Homologie zum Ionenkanal der bakteriellen Rhodopsine (bacterioopsin (Bop) von *Halobacterium salinarum*) wurden diese Proteine Channelrhodopsin-1 (CHR1) und Channelrhodopsin-2 (CHR2) benannt (Nagel et al. 2002; Sineshchekov et al. 2002; Suzuki et al. 2003; Nagel et al. 2003). Die Repression dieser Channelrhodopsine mittels RNA-Interferenz (RNAi) zeigt, dass diese beiden

Proteine an phototaktischen und photophobischen Reaktionen beteiligt sind (Sineschchekov et al. 2002). Die Autoren schlagen ein Model vor, in dem CHR1 für photophobische Reaktionen bei hohen Lichtintensitäten verantwortlich ist, wohingegen CHR2 an phototaktischen Reaktionen bei schwachen Lichtbedingungen beteiligt ist (Sineschchekov et al. 2002). Andere Untersuchungen zeigen, dass CHR2 im Gegensatz zu CHR1 im Dauerlicht schnell inaktiv wird, insbesondere wenn das extrazelluläre Millieu basisch ist (Hegemann 2008). Die Beteiligung von CHR2 an der Phototaxis wird von Kateriya et al. 2004 in Frage gestellt. Aufgrund der Tatsache, dass die zeitliche Verzögerung zwischen Lichtanregung und Lichtstrom durch CHR2 im Mikrosekundenbereich und andererseits für die phototaktische Reaktion in *Chlamydomonas* unter schwachem Licht im Millisekundenbereich liegen, gehen die Autoren davon aus, dass sowohl CHR1 als auch CHR2 an photophobischen Reaktionen beteiligt sind und ihre Beteiligung an phototaktischen Reaktionen von *Chlamydomonas* nur auf indirekte Weise geschieht (Kateriya et al. 2004; Hegemann 2008). Es ist noch nicht erwiesen, welchem dieser Proteine die entscheidenden Funktionen für die phototaktischen und photophobischen Reaktionen zugeschrieben werden können, allerdings wird CHR1 als dominanter Photorezeptor für phototaktische und photophobische Reaktionen in *Chlamydomonas* vermutet, da dieses Protein einerseits in einem weiten pH-Wert-Bereich von pH 4 bis pH 9 aktiv ist und andererseits das Absorptionsmaximum dieses Proteins mit dem Absorptionsmaximum des Photorezeptors in *Chlamydomonas* korreliert (Zacks und Spudich 1994; Hegemann und Tsunoda 2007; Berthold et al. 2008).

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Aktionspotentiale zu erzeugen und darüber hinaus in Tieren die Neuroaktivität zu kontrollieren, sind Channelrhodopsine mittlerweile für die Neurobiologie sehr wichtig. Durch heterologe Expression der Channelrhodopsine in neuronalen Geweben kann die Neuroaktivität erforscht werden (Zhang et al. 2006). Dies bezüglich wurde bis jetzt CHR2 und NpHR (Halorhodopsin von *Natronomonas pharaonis*) heterolog in verschiedene Zelllinien exprimiert und deren Fähigkeit zur Erzeugung des Aktionspotentials untersucht (Bi et al. 2006; Boyden et al. 2005; Ishizuka et al. 2006; Li et al. 2005). CHR2 ist ein Kationen-Kanal und Kationen wie z.B. Na^+ und Ca^{2+} können durch diesen Kanal nach der Aktivierung bei 470 nm Blaulicht transportiert werden. NpHR ist ein Chloridkanal und die Cl^- -Ionen werden durch diesen Kanal nach der

Aktivierung bei 570 nm Gelblicht transportiert. Durch die Expression der Kationen-Pumpe CHR2 zusammen mit einer Chlorid-Pumpe NpHR (Halorhodopsin von *Natronomonas pharaonis*) konnte in *C. elegans* die bidirektionale Bewegung des Wurms durch verschiedene Lichtqualitäten (Blau- und Gelblicht) kontrolliert werden (Zhang et al. 2007). Dies führt zur Akkumulation der negativen Ionen in der Zelle (Cytoplasma) und dadurch zur Hyperpolarisation und Suppression der Aktivität des Neurons. Han und Boydem (2007) berichteten, dass durch die Kombination von Halorhodopsin von *Natronomonas pharaonis* (Halo) mit einem Absorptionsmaximum bei 570 nm und CHR2 mit einem Absorptionsmaximum bei 470 nm das zelluläre Membranpotential anhand der Änderungen der Intensität und des Verhältnisses zwischen 470 nm und 570 nm Licht ganz präzise kontrolliert werden kann (Han und Boyden 2007) (Abbildung 2-5). Durch die Aktivierung des CHR2 mit 470 nm Blaulicht werden die Kationen wie z.B. Na⁺ und Ca²⁺ auf die innere Seite der Plasmamembran (Cytoplasma) transportiert, was zur Abnahme des Membranpotentials (z.B. von -70 auf -50 mV) führt. Dies wird in der Neurobiologie als Depolarisation bezeichnet. Dahingegen werden die Cl⁻-Ionen durch die Aktivierung von NpHR bei 570 nm auf die innere Seite der Plasmamembran transportiert. Dies führt zur Zunahme des Membranpotentials (z.B. von -50 auf -70 mV), was als Hyperpolarisation definiert wird. Bezüglich dieser neuen Anwendungsmöglichkeiten der Channelrhodopsine von Grünalgen ist die Suche nach neuen Channelrhodopsinen von großem Interesse. Es ist besonders erwünscht, neue Channelrhodopsine zu finden, die eine erhöhte Ionenkanal-Aktivität aufweisen, in einem größeren pH-Spektrum aktiv sind oder andere Absorptionsspektren aufweisen. Aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen *Volvox* und *Chlamydomonas* ist es sinnvoll, als erstes nach neuen Channelrhodopsinen in *Volvox* zu suchen. Interessanterweise unterscheiden sich die lichtinduzierten Reaktionen bei diesen beiden Algen. Die lichtinduzierten Bewegungen der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas* sind viel schneller im Vergleich zu der vielzelligen Alge *Volvox* (Braun und Hegemann 1999), was ein Hinweis darauf wäre, dass die Lichtrezeptoren wie Channelrhodopsine in beiden Algen unterschiedliche Eigenschaften haben.

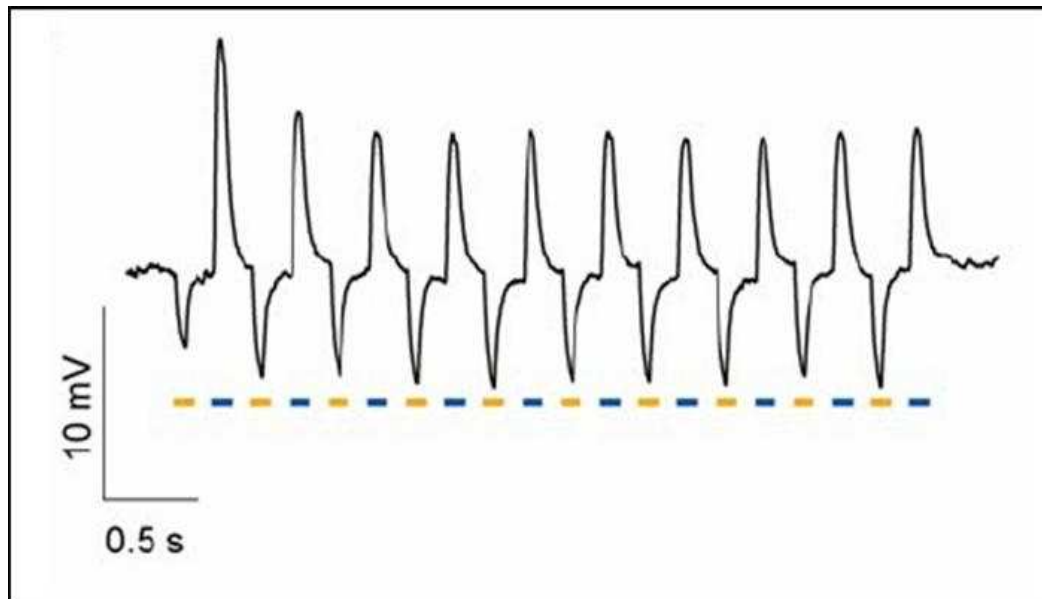


Abbildung 2-5: Einsatz von CHR2 und Halo zur Hyperpolarisation und Depolarisation der Membran.

Durch die Expression von CHR2 und Halo kann das Membranpotential präzise kontrolliert werden. Halo ist eine Chlorid-Pumpe, deren Aktivität (gelb markiert) zur Hyperpolarisation der Membran führt. CHR2 ist eine Kationen-Pumpe, durch die die Membran depolarisiert werden kann (blau markiert). Das Absorptionsmaximum von Halo liegt bei 570 nm und von Chr2 bei 470 nm (Han und Boyden 2007).

2008 berichteten Ernst et al. vom ersten Channelrhodopsin in *Volvox* (VChR). Das Absorptionsmaximum von VChR liegt bei 470 nm und die gemessene Leitfähigkeit bei pH-Werten von 4, 6 und 7,5 zeigte, dass dieser Ionenkanal für H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+} permeabel ist (Ernst et al. 2008). Nach unseren heutigen Kenntnissen über die Sequenz von VChR ist dieses Protein ein Hybrid aus Channelrhodopsin-1 und Channelrhodopsin-2 von *Volvox*. Deswegen entsprechen die gemessenen Eigenschaften dieses Proteins wie z.B. Ionenkanal-Aktivität und Absorptionsmaximum keinem weiteren in der Natur vorhandenen Protein, sondern deuten eher auf ein Hybridprotein hin. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Channelrhodopsin-1 und Channelrhodopsin-2 in *Volvox* identifiziert, kloniert und näher charakterisiert werden.

3 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer, bislang unbekannter Zelltyp-spezifischer Gene in der Grünalge *Volvox carteri* und die Charakterisierung ihrer jeweiligen Rolle im Zusammenhang mit der Zelltyp-spezifischen Expression. Die Identifizierung neuer *Volvox*-Gene sollte anhand der bioinformatischen Analyse vorhandener cDNA-Klone, unterstützt durch die Daten der *Volvox*-Genomdatenbank von JGI begonnen werden. Die identifizierten Gene sollten zunächst mittels *Real Time* RT-PCR auf ihre differentielle Expression in beiden Zelltypen, nämlich den somatischen und reproduktiven Zellen, von *Volvox* untersucht werden, wozu zunächst diese Methode in *Volvox* etabliert werden sollte. Die Zelltyp-spezifische Expression dieser Gene könnte brauchbare Information über ihre mögliche Funktion und ihre potentielle Rolle im Zusammenhang mit der Zelldifferenzierung liefern.

Basierend auf diesen Informationen sollten anschließend einige dieser Gene für weitere Untersuchungen ausgewählt werden. Als Kriterium für diese Auswahl diente die mögliche Funktion der Gene bezüglich der Zellteilung, der asexuellen und sexuellen Entwicklung und der Zelldifferenzierung. Die Funktion ausgewählter Gene sollte dann durch verschiedene Versuchsansätze ermittelt und deren Rolle bei der Zelldifferenzierung und Entwicklung analysiert und diskutiert werden.

4 Diskussion der Ergebnisse

4.1 Quantitative Analyse der Zelltyp-spezifischen Genexpression in *Volvox*¹

Um mehr über die Rolle der noch nicht untersuchten Gene in *Volvox* zu erfahren, sollen in diesem Teil der Arbeit neue *Volvox* Gene identifiziert und anhand der Zelltyp-spezifischen Expression deren Zusammenhang mit der Zelldifferenzierung diskutiert werden.

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchung der differentiellen Genexpression standen zellspezifische cDNA-Sequenzen (120 Gondien-spezifische und 30 Soma-spezifische cDNAs) von *Volvox* zur Verfügung (Amann 2002; Schmidt 2004). Um eine Basis für molekulargenetische Experimente zu schaffen, sollten diese cDNAs als erstes bioinformatisch analysiert werden. Durch Verwendung von DNASIS-Software (Version 7,00; Hitachi Software Engineering, South San Francisco, CA) wurden die kleinen cDNA Fragmente miteinander verglichen um überlappende Fragmente rauszufinden und dadurch möglichst größere cDNA-Fragmente zu bekommen. Durch diese Analyse wurde die Zahl der cDNAs auf 105 reduziert. Da die vorhandenen cDNA-Sequenzen immer noch kurze Fragmente darstellten, wurden zunächst diese cDNA-Fragmente mit den genomischen DNA-Sequenzen von JGI (Joint Genome Institute; *Volvox* whole-genome shotgun reads) verglichen. Anhand dieses Vergleichs konnten ausgehend von den kurzen cDNA-Fragmenten die zugehörigen genomischen DNA-Sequenzen ermittelt werden. Anhand des Vergleiches zwischen cDNA und genomischer Sequenz zusamment unter Anwendung des Genannotationsprogramms FGENESH (Softberry, Mount Kisco, NY) konnte dann die vollständige Intron-Exon-Struktur bestimmt werden. Schließlich wurde mit diesen Sequenzen nach orthologen Sequenzen bzw. Genen in der *Chlamydomonas*-Gendatenbank des JGI (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=Chlre2&advanced=1>), sowie in der NCBI-Gendatenbank

¹ Ghazaleh Nematollahi, **Arash Kianianmomeni**, Armin Hallmann (2006) Quantitative analysis of cell-type specific gene expression in the green alga *Volvox carteri* (BMC Genomics 7: 321)

(National Center for Biotechnology Information) gesucht. Dieser Vergleich lieferte viele brauchbare Anhaltspunkte zu möglichen Funktionen dieser Gene in *Volvox*. Zusätzlich zu diesen Genen wurden 26 weitere Gene, deren Zusammenhang mit der Entwicklung in *Volvox* anhand vorheriger Untersuchung oder ihrer Homologie zu bekannten Genen anderer Organismen vermutet werden konnte, in die Untersuchungen miteinbezogen. Aus den 176 bearbeiteten cDNA-Klonen bzw. Genen wurde ein Pool von 39 Genen/Proteinen für die Untersuchung Zelltyp-spezifischer Genexpression zusammengestellt.

Dieser Pool bestand aus:

- 1) Genen, deren zellspezifische Expression in *Volvox* anhand vorheriger Studien bekannt waren und in dieser Studie als Kontrolle eingesetzt wurden (5 Gene: *ACTA* (Cresnar et al. 1990), *SSGA* (Ertl et al. 1989), *REGA* (Kirk et al. 1999), *GON30* (Tam und Kirk 1991), *GON167* (Tam und Kirk 1991));
- 2) Genen, deren Funktion und deren Status der Zelltyp-spezifischen Expression anhand ihrer Homologie zu bekannten Genen (in diesem Fall *REGA*) in *Volvox* vorhersehbar waren (1 Gen: *RLSA*);
- 3) Genen, deren Zelltyp-spezifische Expression anhand erster Studien (Schmidt 2004) vermutet werden konnte (4 Gene: *CSRPI*, *ARD1*, *MRP2*, *GSPK47*);
- 4) bekannten *Volvox* Genen mit unbekanntem Status der Zelltyp-spezifischen Expression (1 Gen: *NITA*);
- 5) Genen, die zum ersten Mal in dieser Arbeit identifiziert wurden und deren Zelltyp-spezifische Expression anhand ihrer Homologie zu anderen Genen voraussagbar war (7 Gene: *DYHA*, *KLPA*, *FER1*, *NAB1*, *RAP41*, *FBP1*, *CP12*);
- 6) Genen, die zum ersten Mal in dieser Arbeit identifiziert wurden, aber deren Zelltyp-spezifische Expression nicht vorhersehbar war (15 Gene: *PRFA*, *FSD1*, *RPL37*, *GLU1*, *HSP70B*, *HSP40A*, *UBCA*, *PONA*, *RBR1*, *VPEA*, *SAC1*, *RCD1*, *ADCA*, *NIPA*, *LCIB*);
- 7) Neuen *Volvox*-Genen, für die kein homologes Gen in anderen Organismen gefunden werden konnte und deren Zelltyp-spezifischer Status deswegen nicht vorhersehbar war (6 Gene: *UPF1*, *UPF2*, *UPF3*, *UPF4*, *UPF5*, *UPF6*).

Die Messung der Genexpression der oben genannten Gene in Somazellen und Gonidien erfolgte mit Hilfe der quantitativen *Real Time* RT-PCR. Diese Methode ist ein schnelles und präzises Verfahren zur quantitativen Messung der Genexpression in verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen (Higuchi et al. 1993; Heid et al. 1996; VanGuilder et al. 2008). Dazu wurden die Somazellen und Gonidien vor der ersten Zellteilung mechanisch voneinander getrennt. Außerdem wurden die Primer - wenn möglich- so ausgewählt, dass die beiden Oligonukleotide in verschiedenen Exons positioniert sind. Im Falle einer DNA-Kontamination wiesen amplifizierte Produkte eine größere Länge und eine modifizierte T_m (Schmelztemperatur) auf. Dadurch wurde ermöglicht, dass eine eventuelle DNA-Kontamination anhand der Agarose-Gelelektrophorese oder der Analyse der *Melting*-Kurven der *Real Time* RT-PCR detektiert werden konnte. Die *Real Time* RT-PCR wurde zuerst für alle 39 Gene optimiert. Die Optimierung erfolgte durch Variation verschiedener Parametern wie z.B. *Annealing*-Temperatur, Additiva (DMSO, Glycin) und die Menge an eingesetzter RNA. Die Expressionsmessung der jeweiligen Gene in Somazellen und Gonidien wurde dann mit Hilfe eines *One-Step Real Time* RT-PCR Kits (Qiagen, Germany) unter der Verwendung genspezifischer Oligonukleotide für jedes Gen und 300 ng RNA von Somazellen oder Gonidien durchgeführt. Alle Reaktionen wurden dreifach gemessen. Als Kontrolle wurden bei jeder Messung zwei Negativekontrollen durchgeführt: ein Ansatz ohne Template (non template control) und einer ohne Zugabe von Reverser Transkriptase (RT Minus). Die Ergebnisse wurden mittels der $\Delta\Delta C_t$ Methode analysiert, um die Expression in einem Zelltyp im Vergleich zu anderem Zelltyp unter der Verwendung des *Aktin*-Gens als Kontrolle zu bestimmen (Bustin 2000; Pfaffl 2001). Die Expressionsdaten des *Aktin*-Gens in diesen Experimenten und früheren Studien zeigten, dass dieses Gen in Somazellen und Gonidien in gleicher Stärke exprimiert wird und deswegen kann dieses Gen als Referenzgen für die Zelltyp-spezifische Expressionsanalyse in *Volvox* verwendet werden (Cresnar et al. 1990). Die Analyse der Ergebnisse zeigte, dass 26 Gene eine signifikante Differenz in den Expressionsstärken (höher als Faktor zwei) zwischen den Somazellen und den Gonidien aufweisen. Zehn dieser Gene werden überwiegend in den Gonidien exprimiert, während 16 Gene ein höheres Expressionsniveau in den Somazellen aufweisen (Abbildung 4-1).

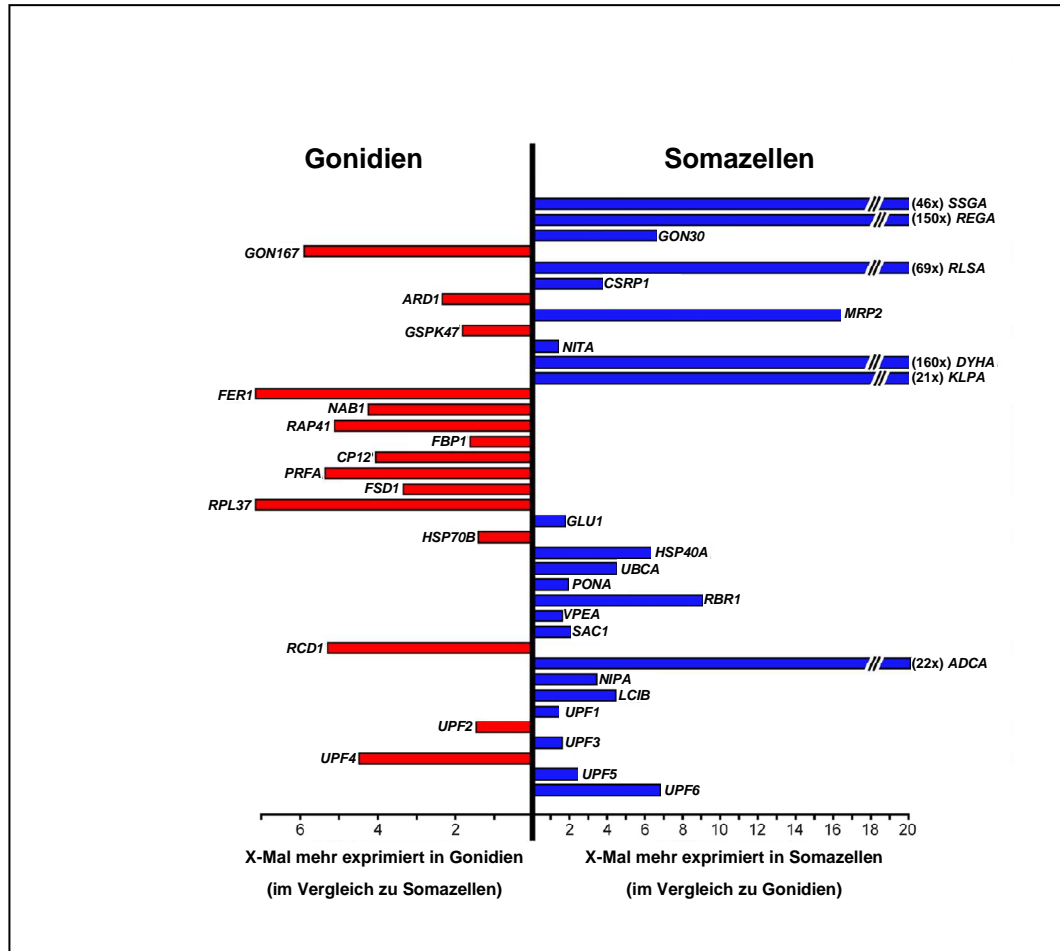


Abbildung 4-1: Zelltyp-spezifische Analyse der Genexpression in *Volvox* mittels *Real Time RT-PCR*.

Die Abbildung zeigt die differenzielle Genexpression von 38 Genen zwischen Somazellen und Gonidien. Rechts sind die Gonidien-spezifischen Gene in rot, links die Soma-spezifischen Gene in blau dargestellt. Die Länge der Balken spiegelt das Expressionslevel des jeweiligen Gens in einem Zelltyp im Vergleich zum anderen Zelltyp. Die Gennamen sind am Ende der Balken zu sehen (verändert nach Nematollahi et al. 2006).

Bezüglich der differenziellen Genexpression und Zelldifferenzierung in *Volvox* war die Untersuchung Soma-spezifischer Gene in dieser Arbeit von großem Interesse, da die Expression dieser Gene (*SSGA*, *REGA*, *RLSA*, *GON30*, *MRP2*, *DYHA*, *KLPA*, *HSP40A*, *UBCA*, *SAC1*, *ADCA*, *NIPA*, *LCIB*, *UPF5*, *UPF6* und *RBR1*) neue Erkenntnisse über die Rolle dieser Gene im Zusammenhang mit der Zelldifferenzierung lieferten.

Ein in den Somazellen ~46 x stärker als in den Gonidien exprimiertes Gen, das sogenannte *SSGA* Gen (pherophorin-like ECM-glycoprotein SSG185), kodiert für ein Pherophorin-ähnliches ECM-Glycoprotein. Dieses Protein ist an der ECM-Synthese in *Volvox* beteiligt (Ertl et al. 1989). Die hohe Expression von *SSGA* in

Somazellen korreliert mit den Ergebnissen aus früheren Studien (Wenzl et al. 1984; Ertl et al. 1989).

Neben *SSGA* zeigte das *REGA*-Gen (somatic regenerator REGA) im Vergleich zu Gonidien eine sehr erhöhte Expression in Somazellen. REGA ist ein im Kern lokalisierter Transkriptionsfaktor, der durch seine Aktivität die Entwicklung der Somazellen zu Gonidien verhindert (Kirk et al. 1999). Mit Hilfe einer DNA-bindenden VARL-Domäne ist REGA in der Lage, an in der Photosynthese beteiligte Gene zu binden und deren Expression in den Somazellen zu blockieren (Meissner et al. 1999; Duncan et al. 2006; Duncan et al. 2007). Die ~150fache Expression des *REGA* Gens stimmt mit dem in früheren Studien festgestellten Status der Zelltyp-spezifischen Genexpression überein (Kirk et al. 1999). Ein *REGA*-homologes Gen, das *RLSA* (regA-like sequence A), zeigt eine ~69fach stärkere Expression in Somazellen im Vergleich zu Gonidien. Die Aminosäuresequenz von RLSA ist sehr ähnlich zu REGA und die VARL-Domäne ist zwischen diesen beiden Proteinen konserviert. Vermutlich handelt es sich auch bei diesem Protein wie beim REGA um einen Transkriptionsrepressor für die Gene, die an der Photosynthese und Entwicklung der Somazellen beteiligt sind (Duncan et al. 2006; Duncan et al. 2007).

Obwohl in einer früheren Studie das *GON30*-Gen (G30 protein) als ein Gonidien-spezifisches Gen ermittelt wurde (Tam und Kirk 1991), zeigte die *Real Time* RT-PCR-Analyse, dass dieses Gen vermehrt in den Somazellen exprimiert wird, was vermutlich darin begründet ist, dass die maximale Expression dieses Gen nach der Zellteilung erreicht wird, während bei dieser Analyse aber die RNA vor der ersten Zellteilung isoliert wurde.

In *Volvox* sind die Somazellen unter anderem für die Phototaxis und Bewegung verantwortlich und besitzen zwei Flagellen. Mittlerweile ist eine ganze Reihe von Genen bekannt, die an der Flagellenbewegung in Grünalgen beteiligt sind. In *Chlamydomonas* wurden mehr als 100 beteiligte Proteinfamilien des Flagellenapparat identifiziert (Merchant et al. 2007). In dieser Studie wurden in *Volvox* zwei solche Gene (*DEYA* und *KLPA*) anhand der Homologie zu *Chlamydomonas*-Genen identifiziert und deren Zelltyp-spezifische Expression gemessen. Die Ergebnisse der *Real Time* RT-PCR zeigten, dass *DEYA* (flagellar α dynein (heavy chain)) um einen Faktor von 160 und *KLPA* (kinesin-like protein) (Mitchell und Brown 1994; Mitchell und Brown 1997; Walther et al. 1994) um

einen Faktor von 21 stärker in Somazellen in Vergleich zu Gonidien exprimiert werden.

Die Lokalisation der Transkripte mancher Gene (Gruppe 4, 6 und 7), bei denen der Status der Zelltyp-spezifischen Expression nicht vorhersehbar war, war eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Studie. Die Ermittlung der Zelltyp-spezifischen Expression dieser Gene zwischen Somazellen und Gonidien könnte neue Hinweise über die Beteiligung dieser Gene an der Zelldifferenzierung in *Volvox* liefern. Zu diesen Genen gehörten sowohl die Gene, deren Funktion anhand von Homologievergleichen vermutet werden konnten, als auch die Gene, über deren Funktion keine Informationen vorlagen. Zu den letzteren zählen sechs Gene, für die in der nah verwandten einzelligen Alge *Chlamydomonas* entweder keine Information bezüglich ihrer Funktion vorlag, oder kein sequenzverwandtes Gen gefunden wurde. Die Anwesenheit mancher dieser Gene im *Volvox*-Genom und deren Abwesenheit im *Chlamydomonas*-Genom könnte vermutlich mit der Entwicklung eines multizellulären Organismus wie *Volvox* aus einem einzelligen Organismus wie *Chlamydomonas* zu tun haben. Diese Gene wurden *UPF1* bis *UPF6* (UPF steht für „protein of unknown function“) genannt. Das Transkript von vier Genen, nämlich *UPF1*, *UPF3*, *UPF5* und *UPF6* wurde stärker in den Somazellen ermittelt. *UPF2* und *UPF4* waren im Vergleich zu Somazellen stärker in den Gonidien exprimiert.

Zu den Funktionen bekannter Genen, deren Zelltyp-spezifische Expression nicht vorhersehbar war, die jedoch nach unseren Ergebnissen deutlich stärker in Somazellen exprimiert werden, gehörten: das *UBCA*-Gen (ubiquitin conjugating enzyme E2), das für den gezielten Proteinabbau verantwortliche Ubiquitin kodiert (van Nocker et al. 1996; Nandi et al. 2006); das *HSP70A*-Gen (HSP40-like heat shock protein), das für ein Hitzeschock-Protein kodiert, welches die Interaktion zwischen HSP70 und Zielproteinen stabilisiert und für die Translation, die Faltung und den Abbau von Proteinen wichtig ist (Cheetham et al. 1992; Qiu et al. 2006; Genevaux et al. 2007); das *SAC1*-Gen (sulfur deprivation response regulator SAC1), das durch die Runterregulation der Photosyntheseaktivität unter Schwefelmangel in *Chlamydomonas* für das Überleben des Organismus verantwortlich ist (Davies et al. 1996; Ravina et al. 2002); das *ADCA*-Gen (adenylate cyclase), dessen Genprodukt die Synthese von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert und

selbst durch G-Proteine reguliert wird (Cooper 2003; Gilman 1990; Huang et al. 1997); das *NIPA*-Gen (NaCl-inducible protein) und das *LCIB*-Gen (low-CO₂ inducible protein LCIB), das vermutlich am Kohlenstoff-Konzentrationsmechanismus in *Chlamydomonas* beteiligt ist (Asamizu et al. 2000; Miura et al. 2004).

Eines der untersuchten Gene, nämlich *RBRI*, zeigt eine Sequenzverwandschaft zu dem Retinoblastoma-Gen von Menschen (Lee et al. 1987; Fung et al. 1987). Da dieses Gen an der Regulation der Zellteilung beteiligt ist (Weinberg 1995), war die höhere Expression dieses Gens in Somazellen, die zum Zeitpunkt der Probennahme keine Zellteilungen mehr durchführten, auf den ersten Blick sehr überraschend. Außer der Beteiligung an dem Zellteilungsprozess sind Retinoblastoma-Proteine aber auch an der Seneszenz beteiligt (Lundberg und Weinberg 1998; Ben-Porath und Weinberg 2004; Ben-Porath und Weinberg 2005). Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass die Somazellen am Ende des Lebenszyklus infolge der Seneszenz sterben (Kochert 1975; Pommerville und Kochert 1982). Basierend auf diesen Informationen könnte die höhere Expression des *RBRI*-Gens in Somazellen auf den Alterungsprozess der somatischen Zellen zurück zu führen sein, was aber experimentell untersucht werden sollte. Zur Untersuchung der *RBRI*-Rolle bezüglich der Zelldifferenzierung bei den Gonidien und Somazellen in *Volvox*, wurde dieses Gens für weitere Analyse ausgewählt und charakterisiert. Die ausführliche Vorgehensweise und die Diskussion der ermittelten Ergebnisse werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

Die Anwendung der *Real Time* RT-PCR in dieser Arbeit zeigt, dass diese Methode zur Analyse der Zelltyp-spezifischen Expression in *Volvox* geeignet ist. Die Auswertung der Expressionsdaten konnte zeigen, dass die vorher ermittelten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen in dieser Arbeit bestätigt werden konnten, was die Anwendung dieser Methode in *Volvox* zur Analyse der Genexpression als positiv darstellt. Diese Methode kommt nicht nur für die Analyse der Zelltyp-spezifischen Genexpression bezüglich der Zelldifferenzierung in Frage, sondern kann auch im Zusammenhang mit asexueller oder sexueller Entwicklung in *Volvox*, dem Wachstum unter Stressbedingungen, wie z.B. Hitze, Kälte und Mangel-Bedingungen und zur Analyse von Mutanten eingesetzt werden.

4.2 Das geschlechtsspezifische Retinoblastoma-Protein1 in *Volvox* deutet auf eine zusätzliche Rolle der RB-Proteine bei der sexuellen Entwicklung hin²

In *Volvox* ist die Zelldifferenzierung zwischen Somazellen und Gonidien durch eine asymmetrische Zellteilung reguliert. Die Größe der Zellen nach dieser asymmetrischen Zellteilung ist für das Schicksal der Zellen sehr bedeutend. Die größeren Zellen entwickeln sich zur Gonidien und die kleineren zur Somazellen (siehe auch 2.1.1). Die Untersuchung bei der nah verwandten Alge *Chlamydomonas* zeigen, dass die Bestimmung der Zellgröße durch ein Retinoblastoma-Gen (*MAT3*) reguliert wird. Im ersten Teil dieser Arbeit (Nematollahi et al. 2006) wurde ein Retinoblastoma ähnliches Gen als Soma-spezifisch ermittelt. In diesem Teil der Arbeit soll die Rolle dieses Gens bezüglich der Zellgröße und asymmetrischer Zellteilung in *Volvox* untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten einerseits die Rolle dieses Gens bei der Zelldifferenzierung und andererseits neue Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen den RB-Proteinen und der Entwicklung der Multizellularität liefern, soweit die Funktion des homologen Gens *MAT3* als Regulator für die Zellgröße im nah verwandten einzelligen *Chlamydomonas* untersucht worden ist (Umen und Goodenough 2001).

Nach der Klonierung des *RBR1*-Gens und der Amplifikation bzw. der Sequenzierung der cDNA konnte die gesamte Sequenz inklusive Intron-Exon-Grenzen ermittelt und analysiert werden. Das 1107 Aminosäuren lange RBR1 ist homolog zu den RB-Proteinen der tierischen und pflanzlichen Organismen (RBs), mit den konservierten A- und B-Domänen. Außerdem gibt es im N-terminalen Bereich drei konservierte Regionen, die wahrscheinlich für die subzelluläre Lokalisation des RBR1 und auch ihre Interaktion mit den RB-Partnern wie z.B. Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) notwendig sind (Sterner et al. 1995; Durfee et

² **Arash Kianianmomeni**, Ghazaleh Nematollahi, Armin Hallmann (2008) A Gender-Specific Retinoblastoma-Related Protein in *Volvox carteri* Implies a Role for the Retinoblastoma Protein Family in Sexual Development (Plant Cell **20**: 2399-2419)

al. 2000). Die A- und B-Domänen sind durch eine Distanzregion (so genannte *spacer region*) voneinander getrennt (Lee et al. 1998; Claudio et al. 2002). Die Aminosäuren in dieser Region interagieren mit Cyclinen, was zur Phosphorylierung und Inaktivierung des RB-Proteins führt (Ewen et al. 1992; Faha et al. 1992; Lacy und Whyte 1997). Diese zwei konservierten Domänen sind zudem für die Bindung des RB-Proteins an deren Interaktionspartnern verantwortlich (Lee et al. 1998; Harbour und Dean 2000; Dick 2007). Die konservierte LxCxE-Bindungsstelle am Ende der B-Domäne ist für die Funktion des RBR1 und dessen Bindung an RB-Interaktionspartner sehr wichtig (Lee et al. 1998). Diese Bindungsstelle interagiert mit zahlreichen Proteinen, die ein LxCxE-Element besitzen (Abbildung 4-2) wie z.B. E2F, DP und Cycline (Durfee et al. 2000; Shen 2002; Dick 2007).

Das RBR1 wird vermutlich auf posttranslationaler Ebene mittels Phosphorylierung reguliert. Ähnlich wie bei anderen RB-Proteinen, besitzt RBR1 15 potentielle CDK-Phosphorylierungsstellen, die eventuell für die Regulation dieses Proteins durch die CDK-Cycline sehr bedeutend sind (Sherr 1996; Lundberg und Weinberg 1998; Harbour und Dean 2000; Shen 2002). Anhand dieser Phosphorylierungsstellen wird wahrscheinlich dieses Protein während der G1 Phase phosphoryliert und demzufolge inaktiviert (Taya 1997; Sefton 2001; Mitnacht 2005). Auf diese Weise wird die Bindung dieses Proteins an E2F und anderer Proteine verhindert (Das et al. 2005; Dick 2007). Neun potentielle Phosphorylierungsstellen sind zwischen MAT3 und RBR1 konserviert. RBR1 besitzt zwölf positivgeladene Aminosäuren innerhalb der LxCxE-Bindungsstelle, darunter drei Lysinreste und sieben Argininreste. Diese Aminosäuren sind wahrscheinlich wie RBs aus Säugetieren und Pflanzen für die Phosphorylierung des RBR1 notwendig. Die Untersuchungen zeigen, dass diese Aminosäuren als Phosphorylierungsstelle des RBs dienen und die Mutationen bei diesen Aminosäuren verändern die Bindungs- und Phosphorylierungseigenschaften des RBs (Lee et al. 1998; Harbour et al. 1999; Brown und Gallie 2002).

Bindungsstelle eliminiert, die für die Interaktion mit CDK-Cyclinen notwendig ist (Knudsen und Wang 1996; Lee et al. 1997; Dahiya et al. 2000). Aus diesem Grund könnte dieses Protein nicht mehr durch den CDK-Cylin Komplex phosphoryliert bzw. inaktiviert werden. Durch die Einführung zweier vorzeitiger Stopcodons bei den Spleißvarianten 3 und 4 werden entweder kleinere Proteine mit eingeschränkter Funktion gebildet oder diese kürzeren mRNAs werden durch NMD eliminiert.

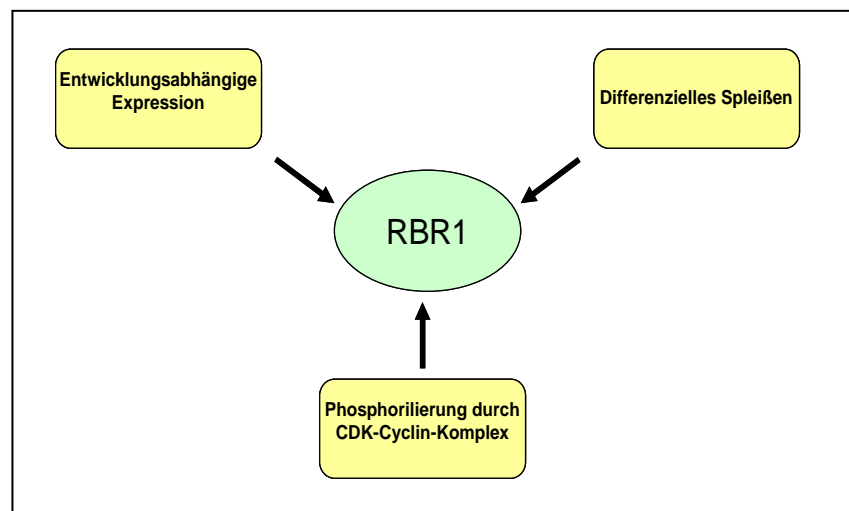


Abbildung 4-3: Darstellung der potentiellen Regulationsmechanismen des RBR1 in *Volvox*.

RBR1 wird in *Volvox* durch verschiedene Mechanismen reguliert. Die Expression dieses Gens ist stark entwicklungsabhängig. Durch das differenzielle Spleißen werden vier verschiedene Spleißvarianten gebildet. Außerdem besitzt dieses Protein 15 Phosphorylierungsstellen. Durch diese Phosphorylierungsstellen wird möglicherweise die Aktivität dieses Protein mittels des CDK-Cyclin-Komplexes reguliert.

Außer der potentiellen posttranskriptionellen und posttranslationalen Regulation des *RBR1* durch das differenzielle Spleißen und die Phosphorylierung ist die Expression dieses Gens in *Volvox* entwicklungsabhängig reguliert (Abbildung 4-3). Dies konnte anhand der Expressionsanalyse des *RBR1*-Gens während des Lebenszyklus von *Volvox* gezeigt werden. Dazu wurden die im 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkel-Rhythmus synchronisierten Kulturen zu 17 verschiedenen Zeitpunkten (vor der ersten Zellteilung bis zur Freisetzung der jungen Tochterkolonien aus der Mutterkolonie) isoliert und deren RNA extrahiert. Die Expression des *RBR1*-Gens wurde mit Hilfe der *Real Time* RT-PCR unter der Verwendung des *Aktin*-Gens als Referenz gemessen und ausgewertet. Die Expressionsdaten zeigten, dass das *RBR1*-Gen vor dem Beginn der Zellteilung

schwach exprimiert wird, wohingegen die Expression mit dem Beginn der Zellteilung rasch zunimmt. Die Expression steigt während der Embryogenese weiter und erreicht ihr Maximum am Ende der Inversion bzw. am Anfang der ECM-Biosynthese. Mit dem Beginn der ECM-Biosynthese und des Wachstums der Tochterkolonien innerhalb der Mutterkolonie sinkt die Expression des *RBR1*-Gens innerhalb kurzer Zeit und verbleibt bis zum Beginn der nächsten Zellteilung auf diesem Niveau.

Im ersten Teil dieser Arbeit (Nematollahi et al. 2006) konnte gezeigt werden, dass *RBR1* zum Zeitpunkt vor Beginn der Zellteilung ~8fach stärker in den Somazellen als in den Gonidien exprimiert wird. Diese zellspezifische Expression und die Hypothese, dass dieses Gen an der Seneszenz von Somazellen beteiligt sein könnte, machte weitere Expressionsmessungen zu drei verschiedenen Zeitpunkten des Lebenszyklus sowohl in den Somazellen der Mutterkolonie als auch in den Embryonen erforderlich, da sich ab diesem Zeitpunkt des Beginns der Zellteilung die Gonidien zu Embryonen entwickeln und die Trennung Soma-Vorläuferzellen und Gonidien-Vorläuferzellen vom Embryo nicht mehr möglich ist. Die Messung der Zelltyp-spezifischen Expression des *RBR1* zeigte, dass die Expression zu allen drei Zeitpunkten (vor der ersten Zellteilung, während der Zellteilungen und am Ende der Inversion) in den Somazellen höher als in den Gonidien bzw. in den Embryonen ist (Abbildung 4-4). Basierend auf der Tatsache, dass die Zellteilung zu diesen Zeitpunkten nur in Gonidien stattfindet und die mütterlichen Somazellen zum gleichen Zeitpunkt einer genetisch bedingten Seneszenz unterliegen (Kochert 1975; Pommerville und Kochert 1982), wird vermutet, dass das *RBR1* zwei unterschiedliche Rollen in den zwei Zelltypen von *Volvox* spielt. In den alten Somazellen wird dieses Gen vermutlich eingeschaltet, um die programmierte Seneszenz im Gang zu bringen. Die Verwicklung der RB-Proteine in die Seneszenz durch Interaktion mit anderen Proteinen wie z.B. p53 und p21 wurde bereits in anderen Organismen nachgewiesen (Dannenberget al. 2000; Sage et al. 2000; Narita et al. 2003; Ben-Porath und Weinberg 2005). Zudem führen größere Mengen an *RBR1* in den Somazellen der Mutterkolonie wahrscheinlich zu einer verstärkten Bindung an E2F-Transkriptionsfaktoren, die für die Aktivierung des Zellteilungsprogramms (Übergang von G1- in die S-Phase) verantwortlich sind (Hiebert et al. 1992; Dyson 1998). Auf diese Weise wird eventuell die Zellteilung in den Somazellen endgültig blockiert.

Die Expression des RBR1 in Gonidien während der Zellteilung ist vermutlich für die Kontrolle der Zellgröße vor und nach der Teilung notwendig. In *Chlamydomonas* ist MAT3 an der Bestimmung der notwendigen Zellgröße für die Zellteilung an zwei Punkten beteiligt: einerseits der Mindestgröße der Mutterzellen zu Beginn der Zellteilung und andererseits der Zellgröße, bei der die Tochterzellen die Teilung einstellen müssen (Umen und Goodenough 2001). In *Volvox* ist die Zelldifferenzierung zwischen Somazellen und Gonidien abhängig von der Zellgröße nach der asymmetrischen Zellteilung. Die Bestimmung der notwendigen Zellgröße für diese asymmetrische Zellteilung wird wahrscheinlich durch RBR1 reguliert. Außerdem könnte die Einstellung der Zellteilung in den Gonidien nach zwei bis drei asymmetrischen Zellteilungen daran liegen, dass danach eine bestimmte Zellgröße erreicht wird, ab der die Gonidien sich nicht mehr teilen können. Die Bestimmung dieser Zellgröße könnte ebenfalls durch RBR1 reguliert werden.

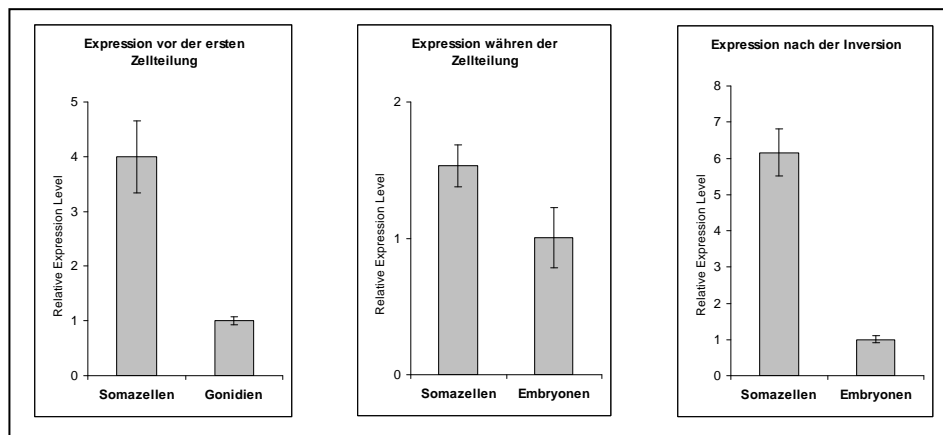


Abbildung 4-4: Zelltyp-spezifische Expression des RBR1.

Die Expression des RBR1-Gens in *Volvox* wird zellspezifisch reguliert. Die Messung dieser Expression in Gonidien und Somazellen zu 3 verschiedenen Zeitpunkten während des asexuellen Lebenszyklus in *Volvox* zeigt, dass dieses Gen stärker in den Somazellen als in Gonidien exprimiert wird. Gezeigt ist die Expression von RBR1 in Somazellen und Gonidien vor der ersten Zellteilung (Abbildung links), Somazellen der Mutterkolonie und den Embryonen während der Zellteilung (Mitte) und nach der Inversion (rechte Abbildung).

Die Rolle der asymmetrischen Zellteilung in *Volvox* ist nicht nur für die Zelldifferenzierung im asexuellen Lebenszyklus entscheidend, sondern auch für den sexuellen Lebenszyklus (siehe auch 2.1.1). Um die Rolle des RBR1 während des sexuellen Lebenszyklus von *Volvox* zu untersuchen, wurde die Expression dieses Gens zu verschiedenen Zeitpunkten während des sexuellen Lebenszyklus

analysiert. Das Expressionsmuster war bei sexuell induzierten Algen ähnlich zu den asexuellen Algen. Die Expression ist niedrig vor dem Beginn der Zellteilung, nimmt während der Embryogenese zu und die höchste Expression wird am Ende der Inversion bzw. am Anfang der ECM-Biosynthese erreicht. Obwohl das Expressionsmuster gleich bleibt, zeigen die sexuell induzierten Algen ein höheres Expressionsniveau im Vergleich zu vegetativen Algen. Dieses war während der Zellteilung um 78% und am Ende der Inversion um 45% bei induzierten Algen höher als bei vegetativen Algen, was auf die Rolle von *RBR1* im sexuellen Lebenszyklus hinweist.

Als nächstes wurde das *RBR1* im Genom von *Volvox* lokalisiert. Da die *Volvox*-Genomdaten nicht vollständig waren und zudem kein molekularer Marker, die mit bestimmten Regionen im Genom gekoppelt sind, existieren, wurde die Analyse mittels des Vergleichs zwischen dem Mating-Type-Locus von *Chlamydomonas* (Merchnat et al. 2007), in dem das *MAT3* Gen lokalisiert ist, und dem Scaffold 43 im *Volvox*-Genom, das das *RBR1*-Gen beinhaltet, durchgeführt. Der Mating-Type-Lokus in *Chlamydomonas* ist 1 MB groß und beinhaltet ~ 50 Gene (Ferris et al. 2002). Die Ergebnisse zeigten, dass das *RBR1*-Gen wie das *MAT3*-Gen von *Chlamydomonas* (Umen und Goodenough 2001; Ferris et al. 2002) im Mating-Type-Locus (MT) lokalisiert ist. Bei *Chlamydomonas* wurde gezeigt, dass manche in der MT lokalisierten Gene wie z.B. *FUS1* und *MID* an der sexuellen Entwicklung in *Chlamydomonas* beteiligt sind. Diese zwei Gene sind nur in einem Mating-Typ-Locus vorhanden (*FUS1* ist im MT-Plus und *MID* ist im MT-Minus lokalisiert) (Ferris und Goodenough 1994; Ferris et al. 1996; Ferris et al. 2002). Aufgrund der möglichen Beteiligung des *RBR1* an der asymmetrischen Zellteilung, was für die Produktion der Eizellen und die Spermien in beiden *Volvox*-Geschlechtern entscheidend ist (siehe auch 2.1.1) einerseits, und in Kombination mit der eventuellen Beziehung zwischen den im Mating-Type-Locus lokalisierten Genen und der sexuellen Differenzierung andererseits, wurde die Lokalisation des *RBR1* in Männchen untersucht. Nach der DNA-Isolierung von vier verschiedenen männlichen Stämmen (*69-1B*, *Adam*, *Poona* und *281-1*) wurde versucht mit verschiedenen *RBR1*-spezifischen Primer-Paaren dieses Genfragment in Männchen zu isolieren. Überraschenderweise konnte dabei keine Bande amplifiziert werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Rekombination innerhalb des MT verdrängt wird, können sich die Gene im Mating-Type-Locus schneller ändern

als andere Gene (Gillham 1969; Ferris et al. 1997). Aus diesem Grund könnte das geschlechtsspezifische RB-Protein in Männchen die gleiche oder eine sehr ähnliche Proteinsequenz haben, obwohl die DNA-Sequenz sich zum Teil unterscheidet. Deswegen wurden weitere PCRs mit degenerierten Oligos unter den spezifischen bis zu den unspezifischen *Annealing*-Temperaturen (55°C bis 42°C) durchgeführt. Bei unspezifischen *Annealing*-Temperaturen ergaben die Reaktionen mehrere Banden, die sich aber nach Sequenzierung als nicht spezifische Banden erwiesen. Zusätzlich zu den PCR-Experimenten wurden Southern-Blots durchgeführt, um das orthologe *RBR1*-Gen in der DNA der Männchen zu detektieren. Die Southern-Blot-Analyse wurde mit zwei unterschiedlichen Sonden unter stringenten (Hybridisierung bei 52°C; eine Stunde waschen in 0,2xSSC, 0,1%SDS) und nicht-stringenten Bedingungen (Hybridisierung bei 42°C; eine Stunde waschen in 2xSSC, 0,1% SDS) durchgeführt. Als Kontrolle wurde die DNA von Weibchen verwendet. Obwohl unter der Verwendung der Weibchen-DNA unter allen Bedingungen das Gen detektiert werden konnte, konnte kein Signal bei der Männchen-DNA detektiert werden. Außerdem wurde bei der Suche in der EST-Datenbank von JGI die *RBR1*-Sequenz nur bei Weibchen-ESTs gefunden. Alle diese Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass in Weibchen nur eine Kopie von *RBR1* vorhanden ist, wohingegen keine ähnliche DNA-Sequenz bei Männchen existiert. Um eine neue Hypothese, nämlich dass das *RBR1* eine Schlüsselrolle im sexuellen Lebenszyklus von *Volvox* spielen könnte, zu überprüfen, wurde der männliche Stamm *281-1* mit *RBR1* von Weibchen transformiert. Als Selektionsmarker wurde das *NITA*-Gen verwendet, welches in Gegenwart von Nitrat das Überleben der Transformanten im ammoniumfreien Medium ermöglicht (Schiedlmeier et al. 1994; Gruber et al. 1996). Nach Selektion der Transformanten auf dem *NITA*-Gen wurden die Transformanten auf das *RBR1*-Gen überprüft. Anschließend wurde durch Southern-Blot überprüft, wie viele Kopien von *RBR1* im Genom integriert wurden. Alle transgenen Männchen, die für die weitere Analyse ausgewählt wurden, besaßen nur eine einzige Kopie vom *RBR1*-Gen. Die mit Weibchen-*RBR1* transformierten Männchen (175-3-2, 175-4-6 und 175-6-1) zeigten nach den ersten Analysen einige phänotypische Unterschiede zu den WT-Männchen (WT = Wildtyp, Männchen, die nur mit dem *NITA*-Gen transformiert worden waren (TRef1)). Obwohl die Gonidienanzahl bei WT-Männchen bei ~10 lag, besaßen die Transformanten ~13 Gonidien, was einem

Anstieg um 40% entspricht. Im Gegensatz dazu konnte keine Veränderung in der Anzahl der Somazellen festgestellt werden.

In weiteren Analysen wurden die Zellvolumen beider Zelltypen von Transformanten im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Gonidien und Somazellen wiesen jeweils einen Zuwachs des Zellvolumens von 68% bei den Gonidien und 15% bei den Somazellen in Anwesenheit des *RBR1*-Gens auf (Abbildung 4-5). Kirk et al. (1993) schrieben, dass die Zellgröße als Schlüssel für die Zelldifferenzierung dient. Infolge der asymmetrischen Zellteilung entwickeln sich die Zellen, die größer als 8 μm im Durchmesser sind, zu Gonidien, während die Zellen mit einem kleineren Durchmesser zu Somazellen werden. Durch die Überexpression der RB-Proteine in den Transformanten (eigenes RB-Protein und heterolog exprimiertes Weibchen-RBR1) überschreiten wahrscheinlich mehr Zellen diese Grenze und werden zu Gonidien.

Da RB-Proteine bei der Regulation der Zellteilung eine zentrale Rolle spielen und auch in *Volvox* während der Embryogenese eine erhöhte Expression von *RBR1* festgestellt wurde, wurde in Transformanten die Wirkung des RBR1 auf die Zellteilungsdauer gemessen. Dazu wurde der zeitliche Abstand zwischen der zweiten Zellteilung (Embryonen im Vierzellstadium) und der Mitte der Inversion gemessen (Siehe auch Abbildung 2-1). Diese Messung zeigte, dass bei der Transformante 175-6-1 der zeitliche Abstand zwischen diesen beiden Punkten größer ist als im Wildtyp (TRef1). Die Länge dieser Periode war in TRef1 6,5 Stunden (STAB = 15 Minuten) und in 175-6-1 9 Stunden (STAB = 15 Minuten). Anhand dieser Daten konnte die Länge der Embryogenese nachgerechnet werden. Diese betrug für TRef1 ~8 Stunden und für 175-6-1 ~11 Stunden, d.h. die Embryogenese bei den Transformanten dauert drei Stunden länger im Vergleich zum Wildtyp. Die Länge der Embryogenese bei der TRef1 entspricht auch früheren Messungen in dem *Volvox* Weibchen-Stamm *Eve10* (Kirk 1998; Hoops et al. 2005; Hallmann 2006a).

Um den Zusammenhang zwischen RBR1 und dem sexuellen Lebenszyklus in *Volvox* rauszufinden, wurden die Transformanten im sexuellen Lebenszyklus untersucht. Die Zellteilungsmuster verändern sich in beiden Geschlechtern im sexuellen Lebenszyklus. Wie schon in der Einleitung erwähnt teilen sich die sexuell induzierten Gonidien bei den Weibchen in siebten Zyklus asymmetrisch statt im sechsten, wie es bei asexuellen Algen der Fall ist. Diese Verschiebung der

asymmetrischen Zellteilung führt zur Produktion von ~32 Eizellen und ~2000-3000 Somazellen. Im sexuell induzierten Männchen dagegen wird die asymmetrische Zellteilung erst im achten Zyklus durchgeführt. Dies führt zur Bildung von 128 Somazellen und 128 Androgonidien. Jedes Androgonidium führt eine oder zwei weitere Zellteilungsrounden durch, was zur Bildung eines Spermienpakets mit 64 oder 128 Spermien führt. Weil die Zahl der Spermien in jedem Spermienpaket nicht bestimmt werden konnte, wurde der Durchmesser jedes Spermienpakets gemessen. Diese Messung zeigte, dass der Durchmesser der Spermienpakete bei den Transformanten 30-40% größer war als beim Wildtyp. Diese Zunahme des Spermienpaket-Volumens schafft genügend Raum für eine weitere Zellteilungsrounde, wodurch die Spermien die normale Größe erreichen. Infolge dieser zusätzlichen Zellteilung in den Spermienpaketen produzieren die transformierten Männchen möglicherweise doppelt so viele Spermien im Vergleich zu dem Wildtyp.

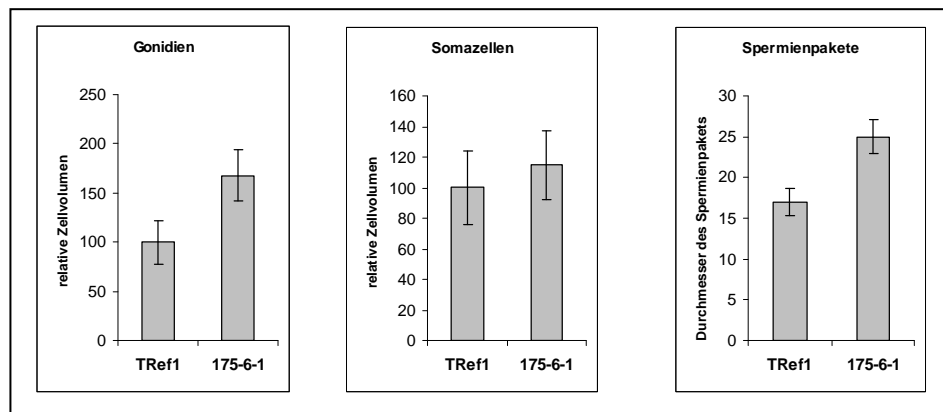


Abbildung 4-5: Die Veränderung der Zellgröße nach der Expression von Weibchen-*RBR1* in Männchen.

In den transgenen Männchen ist eine Zunahme des Zellvolumens zu beobachten. In der Abbildung sind das Zellvolumen der Gonidien, der Somazellen und den Spermienpaketen von 175-6-1 (Männchen, transformiert mit Weibchen-*RBR1*) und TRef1 (Männchen Kontrolle, ohne Weibchen-*RBR1*) dargestellt. Bei Gonidien und Somazellen wurde das Volumen des TRef1 als 100% genommen und die relativen Volumina des 175-6-1 im Verhältnis zu TRef1 gemessen. Bei den Spermienpaketen wurde der Durchmesser in μm gemessen. 100 Zellen wurden bei jeder Messung gezählt.

Aufgrund der zentralen Rolle der RB-Proteine bei der Zellteilung und der Entwicklung ist trotz der Abwesenheit einer ähnlichen Sequenz zu *RBR1* in Männchen (PCR, PCR mit den degenerierten Oligos, Southern-Bot und EST Datenbank) davon auszugehen, dass ein analoges *RBR1*-Gen in Männchen

vorhanden ist. Dieses *RBR1*-Analog könnte wie *RBR1* bei Weibchen im Mating-Type-Locus lokalisiert sein. Die Expression des funktionsfähigen *RBR1*-Gens von Weibchen in den transgenen Männchen bekräftigt diese Annahme. Die Veränderung der Zellgröße in den Transformanten könnte durch eine Überexpression der RB-Proteine zustande gekommen sein, nämlich die Expression des eigenen RB-Proteins und des *RBR1* von Weibchen. Eine solche Überexpression der RB-Proteine führt ebenfalls zur Zunahme des Zellvolumens in *Drosophila melanogaster* (Neufeld et al. 1998).

Der Unterschied zwischen den beiden *RB*-Genen von Weibchen und Männchen geht wahrscheinlich auf die unabhängige Entwicklung beider Gene im Laufe der Evolution zurück. Die Analyse der Mating-Type-Loci in *Chlamydomonas* zeigte, dass die an der sexuellen Entwicklung beteiligten Gene sich viel schneller verändern als andere Gene wie z.B. Beta-Tubulin (Ferris et al. 1997). Andererseits scheint die Rekombination im Mating-Type-Lokus unterdrückt zu sein (Gillham 1969; Ferris 1995). Um diese Aussagen zu überprüfen, wurden verschiedene Gene zwischen *Chlamydomonas* und *Volvox* verglichen. Die Gene wurden in zwei Kategorien, die an der sexuellen Entwicklung beteiligten und unbeteiligten Gene, unterteilt. Obwohl die nicht an der sexuellen Entwicklung beteiligten Gene (z.B. *Aktin*, *Beta-Tubulin* und *Nitratreduktase*) zwischen *Chlamydomonas* und *Volvox* hoch konserviert sind, konnten für die an der sexuellen Entwicklung beteiligten Gene (z.B. *FUS1*, *MID* und *SADI*) nur Treffer mit niedriger Homologie oder gar keine homologe Gene gefunden werden. Dies bekräftigt, dass die Gene, die an der sexuellen Entwicklung beteiligt sind, sich viel schneller verändern als die anderen. Die unterschiedlichen RB-Proteine in Männchen und Weibchen könnten nicht nur an der unterschiedlichen Entwicklung der beiden Geschlechter liegen, sondern selbst ein Grund dafür sein.

Zusammengefasst lässt sich aus der Wirkung des heterolog exprimierten Weibchen-*RBR1* auf die Größe der Gonidien, der Somazellen und den Spermienpakete in den transformierten Männchen schließen, dass ein ähnliches Gen in Männchen vorhanden ist. Der phänotypische Unterschied zwischen Weibchen und Männchen zeigt sich nur im sexuellen Lebenszyklus, wobei das *RBR1*-Gen während dieses Lebenszyklus stärker exprimiert wird (78% mehr in sexuell induzierten Weibchen im Vergleich zu vegetativen Algen). Nach der sexuellen Induktion ist der Zeitpunkt des Beginns der asymmetrischen Zellteilung

für die Bildung zweier unterschiedlicher Geschlechter entscheidend. Aus diesem Grund könnte eine geschlechtsspezifische Entwicklung der RB-Proteine in *Volvox* zur unterschiedlichen Regulation der Zellteilungsprogramme bzw. unterschiedlicher Zelldifferenzierung nach der sexuellen Induktion führen. Außerdem wurde wahrscheinlich im Laufe der Evolution ein geschlechtsspezifisches Zellteilungsprogramm in den sexuell induzierten Algen zusammen mit dem geschlechtsspezifischen RB-Protein entwickelt. Diese Daten wiesen auf eine zusätzliche Rolle der RB-Proteine bei der sexuellen Entwicklung der Organismen hin, was bis jetzt noch nicht entdeckt worden ist. Es sollte aber der Zusammenhang zwischen RB-Proteinen und sexueller Entwicklung weiter erforscht und analysiert werden. Dies könnte in erste Stelle durch die Charakterisierung des geschlechtsspezifischen RB-Proteins in Männchen fortgeführt werden. Die Identifizierung der RB-Partnerproteine und Bestimmung deren zellspezifischer bzw. geschlechtsspezifischer Rolle könnte weiterhin zur Aufklärung der RB-Proteinbasierter sexuellen Entwicklung in *Volvox* beitragen.

4.3 Channelrhodopsine in *Volvox*³

Die Untersuchung der Zelldifferenzierung in *Volvox* fokussiert sich auf die zwei vorhandenen Zelltypen in diesem Organismus, nämlich Gonidien und Somazellen. Die Somazellen und die Gonidien zeigen sowohl unterschiedliche Protein- als auch Genexpressionsmuster (Kirk and Kirk 1985; Nematollahi et al. 2006). Bislang konnten mehrere Gene identifiziert werden, die in einem Zelltyp stärker als im Vergleich zum anderen Zelltypen exprimiert werden (Tam and Kirk 1991; Kirk et al. 1999; Meissner et al. 1999; Nematollahi et al. 2006). Die Untersuchungen zeigen, dass sich das Proteinmuster in den Somazellen und den Gonidien kurz nach dem Eintritt des Lichtes und des Beginns der Zelldifferenzierung dramatisch ändert. Dies weist darauf hin, dass die Zelldifferenzierung zwischen den beiden Zelltypen eventuell durch Licht kontrolliert wird. Bei dieser lichtabhängigen Proteinsynthese sind wahrscheinlich Rhodopsine beteiligt (Kirk und Kirk 1983; Kirk und Kirk 1985; Ebnet et al. 1998). Rhodopsine sind licht-sensitive Membranproteine, die als dominante Proteine in der Augenfleck-Region von Grünalgen vorkommen (Deininger et al. 1995; Schmidt et al. 2006). Um die Frage zu beantworten, welche Rolle die Rhodopsine in *Volvox* spielen, wurden in dieser Arbeit zwei Rhodopsin-Gene von *Volvox* kloniert und charakterisiert: Channelrhodopsin-1 (*CHR1*) und Channelrhodopsin-2 (*CHR2*). Diese beiden Gene wurden anhand der Homologie zu den Channelrhodopsinen von *Chlamydomonas* und den Bakteriorhodopsinen identifiziert (Nagel et al. 2002; Nagel et al. 2003; Spudich et al. 2000). Das *CHR1*-Gen besteht aus 13 Exons und 12 Introns; *CHR2* aus 14 Exons und 13 Introns. Die Untersuchung des *Volvox*-Genoms und Southern-Blot-Analysen konnten zeigen, dass von jedem Gen nur eine Kopie im *Volvox*-Genom vorhanden ist. *CHR1* kodiert für ein Protein mit einer Länge von 837 Aminosäure und einem Molekulargewicht von 86,6 kDa, während das 747 Aminosäuren lange *CHR2* ein Molekulargewicht von etwa 77,8 kDa aufweist. Die

³ **Arash Kianianmomeni**, Katja Stehfest, Ghazaleh Nematollahi, Peter Hegemann, Armin Hallmann (2008) Light-gated ion channels of *Volvox carteri* underlie a light-dependent, cell type-specific, stage-specific, and sex inducer-dependent regulation (submitted)

Identität von CHR1 zum Channelrhodopsin-1 von *Chlamydomonas* beträgt 62.7% über einem Bereich von 252 Aminosäuren. CHR2 zeigt eine 68.5% Identität zum Channelrhodopsin-2 von *Chlamydomonas* in 260 Aminosäuren. Außerdem zeigen beide Proteine 18 bis 25 % Identität zu Bakteriorhodopsinen (Tabelle 4-1).

Bakteriorhodopsine	CHR1	CHR2
Bop (ACCESSION CAP14056) <i>Halobacterium salinarum</i>	23,8% über 151 AS	18,3% in 169 AS
HR (ACCESSION O93741) <i>Haloterrigena sp.</i>	22,3% über 166 AS	24,5% in 143 AS
SR (ACCESSION O93743) <i>Halorubrum sodomense</i>	25,2% über 147 AS	24,5% in 147 AS
NR (ACCESSION Q9UW81) <i>Neurospora crassa</i>	23,1% über 147 AS	24,0% in 154 AS

Tabelle 4-1: Die Identität zwischen den Bakterienrhodopsinen und Channelrhodopsinen von *Volvox*.

Die Sieben-Transmembranen-Helix (7TM)-Domäne von CHR1 und CHR2 zeigen Homologie zu Bakteriorhodopsinen. Die analysierten Bakteriorhodopsine sind: Bacterioopsin (Bop) von *Halobacterium salinarum*, Halorhodopsin (HR) von *Haloterrigena sp.*, Sensory rhodopsin (SR) von *Halorubrum sodomense* und Opsin-1 (NR) von *Neurospora crassa*. Die Identität zwischen den beiden Proteinen wurde in Prozent angegeben. AS steht für Aminosäure.

Die CHR1 und CHR2 enthalten die so genannte 7 TM-Domäne (Aminosäurereste 32 bis 263 bei beiden Proteinen), die für ihre Ionen-Kanal-Aktivität bekannt ist (Abbildung 4-6). Die Aktivität dieses Bereiches als Ionen-Transporter wurde in Bakterien und in *Chlamydomonas* bereits nachgewiesen (Nagel et al. 2002; Nagel et al. 2003; Sineshchekov et al. 2002; Spudich et al. 2000). Die 7 TM-Domänen sind zwischen den Channelrhodopsinen von *Volvox* und *Chlamydomonas* konserviert (Abbildung 4-6). Anhand der Strukturanalysen konnte für Bacterioopsin (Bop) gezeigt werden, dass 22 Aminosäuren, die in den 7 TM-Domänen lokalisiert sind, direkt mit Retinal, dem lichtempfindlichen Bestandteil der Rhodopsine, interagieren (Khorana 1993; Bieszke et al. 1999). Obwohl die Identität zwischen Channelrhodopsinen von *Volvox* und Bakterienrhodopsinen niedrig ist (Tabelle 4-1), sind die an der Retinalbindung beteiligten Aminosäuren

zum Teil konserviert geblieben. Elf von diesen Aminosäuren in CHR1 sind identisch zu Bop (Y80, R115, W119, T122, L126, D151, G158, S176, W218, P222 und K252) und fünf weitere sind konservativ umgetauscht worden (E118, C123, C154, F221 und I246). Bei CHR2 findet man neun identische Aminosäuren (Y80, R115, W119, T122, D151, G158, W218, P222 und K252) und vier weitere, die konserviert umgetauscht wurden (E118, C123, F221 und I246). Die Position dieser Aminosäuren wurde in CHR1 und CHR2 im Vergleich zu den Channelrhodopsinen von *Chlamydomonas* und Bop in Abbildung 4-6 dargestellt.

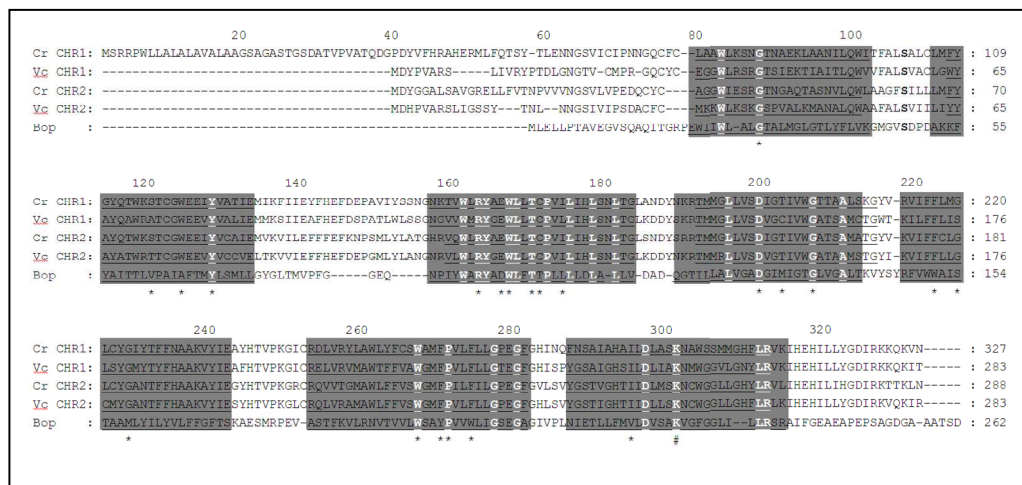


Abbildung 4-6: Sequenzalignment zwischen 7 TM-Domänen von Algen-Channelrhodopsinen und Bop.

Das Alignment stellt die Sequenzverwandtschaft zwischen Channelrhodopsin-1 von *Chlamydomonas* (Cr CHR1), Channelrhodopsin-1 von *Volvox* (Vc CHR1), Channelrhodopsin-2 von *Chlamydomonas* (Cr CHR2), Channelrhodopsin-2 von *Volvox* (Vc CHR2) und Bacterioopsin von *Halobacterium salinarum* (Bop) dar. Die 7 TM-Domänen sind Grau hinterlegt; die konservierten Aminosäuren zwischen Algen-Channelrhodopsine und Bop sind. Weiße Buchstaben auf grauem Hintergrund. Die Aminosäuren, die mit dem Retinal interagieren, sind mit Sternchen gekennzeichnet (Bieszke et al. 1999; Henderson et al. 1990), # zeigt das Retinal-bindende Lysin (Nagel et al. 2002).

Da sich einerseits das Muster der Proteinsynthese in Somazellen und Gonidien während der Zelldifferenzierung in *Volvox* nach dem Eintritt des Lichtes dramatisch verändert (Kirk und Kirk 1985; Kirk 1997) und andererseits Rhodopsine als Lichtrezeptoren bekannt sind, wird vermutet, dass Rhodopsine an dem Zelldifferenzierungsprozess beteiligt sind, weswegen *CHR1* und *CHR2* hinsichtlich ihrer Rolle bei der Zelldifferenzierung genauer charakterisiert wurden. Dazu wurde als erstes die Zelltyp-spezifische Expression der Channelrhodopsine untersucht. Für diesen Zweck wurden Gonidien und Somazellen von der ersten

Zellteilung mechanisch voneinander getrennt und anschließend wurde ihre RNA isoliert. Die Expression des *CHR1* und *CHR2* wurde in beiden Zelltypen mittels *Real Time* RT-PCR unter der Verwendung des *Aktin*-Gens als Referenz gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass die Expressionen beider Gene extrem Zelltyp-spezifisch sind und ihre mRNAs fast nur in den Somazellen detektiert werden konnten. *CHR1* wird 931-fach und *CHR2* 882-fach stärker in den Somazellen exprimiert als in den Gonidien (Abbildung 4-7).

Da sowohl *CHR1* als auch *CHR2* ausschließlich in den Somazellen exprimiert werden, wäre ihre Beteiligung bei der Proteinsynthese in Somazellen möglich. Die Beteiligung der Rhodopsine an der Proteinsynthese in Gonidien wird wahrscheinlich durch andere Rhodopsine reguliert. Die Analyse des Volvoxopsins durch Ebnet et al. (1998) zeigte, dass dessen Transkript nur in Gonidien und Embryonen vorhanden ist.

In *Chlamydomonas* sind Channelrhodopsin-1 und Channelrhodopsin-2 an phototaktischen und photophobischen Reaktionen beteiligt (Sineshchekov et al. 2002; Berthold et al. 2008). Lichtinduzierbare Reaktionen gehören in *Volvox* zu den Aufgaben der somatischen Zellen. Diese Zellen besitzen zwei Flagellen und einen Augenfleck, welcher zwischen den Flagellen und dem Zelläquator positioniert ist (Hoops 1993, 1997). Abhängig von der Intensität und der Richtung des absorbierten Lichtes durch Photorezeptoren wie z.B. Rhodopsine wird die Geschwindigkeit der Flagellenbewegung reguliert und die Schwimmrichtung festgelegt (Rüffer und Nultsch 1990, 1991; Hoops 1993; Hegemann 2008). Die gewaltige Expression der *CHR1* und *CHR2* in Somazellen im Vergleich zu Gonidien von *Volvox* deutet darauf hin, dass diese beiden als Lichtrezeptoren bekannten Proteine an den lichtinduzierten Reaktionen in *Volvox* beteiligt sein könnten. Vermutlich sind beide Proteine wie in *Chlamydomonas* in der Augenfleck-Region der Somazellen lokalisiert (Kateriya et al. 2004).

In *Volvox* sind die Somazellen unterschiedlich groß. Die Größe der Somazellen ist abhängig von ihrer Position an der Oberfläche des Sphäroides. Die größeren Somazellen sind am anterioren Pol, die kleineren am posterioren Pol lokalisiert (Hand und Haupt 1971; Sakaguchi und Iwasa 1979). Als anteriorer Pol wird in *Volvox* die Schwimmrichtung der Alge definiert. Die an diesem Pol lokalisierten Somazellen besitzen größere und sensitivere Augenflecke im Vergleich zu den Somazellen, die sich am posterioren Pol befinden. Diese Eigenschaften lassen

vermuten, dass die am anterioren Pol lokalisierten Somazellen vermutlich wichtig für die phototaktischen und photophobischen Reaktionen sind (Hand und Haupt 1971). Der Größenunterschied zwischen den Augenflecken der Somazellen von *Volvox* wird als ein Sensitivitätsgradient vom anterioren Pol zum posterioren Pol definiert (Sakaguchi und Iwasa 1979; Hoops 1997). Da einerseits beide Channelrhodopsine für die lichtinduzierten Reaktionen verantwortlich sind (Hegemann 2008; Berthold et al. 2008) und andererseits beide Gene fast nur in Somazellen exprimiert werden, könnte ein Gradient in der Expression der Rhodopsine in den Somazellen der Kolonie vorliegen, das heißt, die Expression von *CHR1* und *CHR2* ist in den am anterioren Pol lokalisierten Somazellen sehr hoch und nimmt in Richtung des Posterioren Pols kontinuierlich ab. Dies könnte der Grund dafür sein, wieso am anterioren Pol lokalisierte Somazellen sensitiver auf Licht reagieren als die am posterioren Pol lokalisierten.

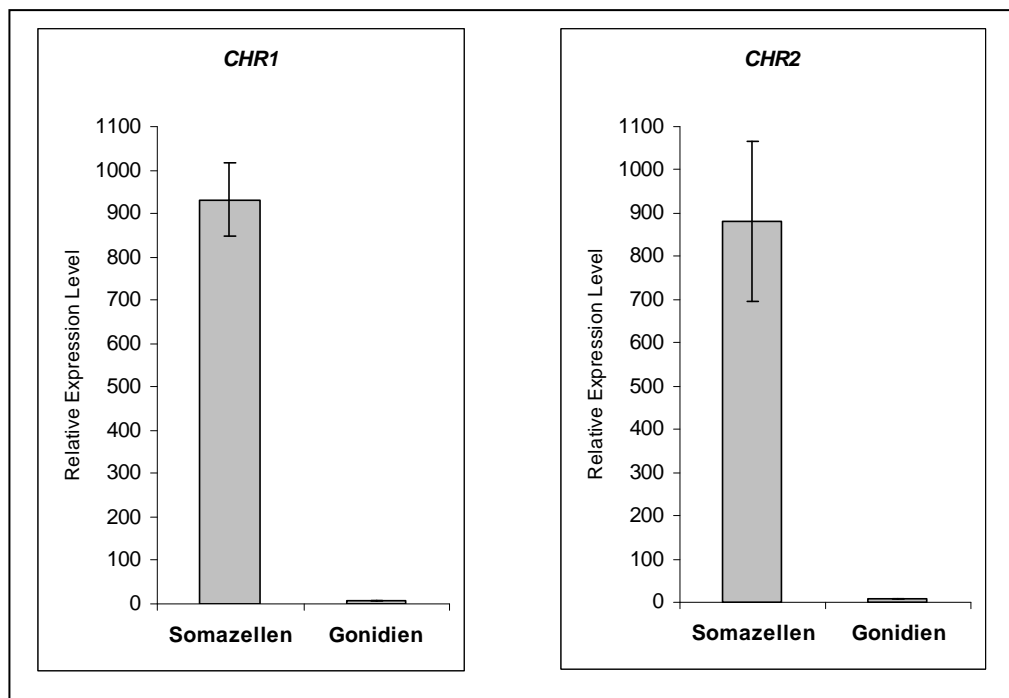


Abbildung 4-7: Zelltyp-spezifische Expression der *CHR1*- und *CHR2*-Gene in *Volvox*.

Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Expression von *CHR1* und *CHR2* in Somazellen im Vergleich zu Gonidien. Die Somazellen und Gonidien wurden vor der ersten Zellteilung voneinander getrennt und ihre RNA isoliert. Die Expression von *CHR1* und *CHR2* wurde mit Hilfe der *Real Time* RT-PCR gemessen und anhand der $\Delta\Delta C_t$ Methode ausgewertet (Bustin 2000; Pfaffl 2001). 300 ng RNA wurde für jeden PCR-Ansatz eingesetzt. Alle Reaktionen wurden dreifach gemessen.

Um mehr über die Funktion der Channelrhodopsine zu erfahren, wurde als nächstes deren Expression während des asexuellen Lebenszyklus von *Volvox* gemessen. Für diese Analyse wurden die *Volvox*-Kulturen (*Eve 10*-Stamm) in 8 Stunden Dunkel / 16 Stunden Licht-Rhythmus bei 28°C synchronisiert. Unter diesen Bedingungen beträgt der Lebenszyklus von *Volvox* 48 Stunden. Die Gesamt-RNA wurde dann zu folgenden Zeitpunkten des Lebenszyklus isoliert: nach der Freisetzung der jungen Tochterkolonien aus der Mutterkolonie (Punkt 1 und Punkt 2); kurz vor der ersten Zellteilung (Punkt 3); während der Zellteilung (Punkt 4); nach der Inversion (Punkt 5); in der Wachstumsphase (Punkt 6 bis Punkt 7) und nach der Freisetzung der jungen Tochterkolonien aus der Mutterkolonie (Punkt 8), was wiederum der Punkt 1 entspricht (Abbildung 4-8).

Nach der Isolierung der RNA wurde die Expression der Channelrhodopsine mittels *Real Time* RT-PCR zu den erwähnten Zeitpunkten gemessen. Alle Reaktionen wurden dreifach gemessen. Als Referenz wurde das *Aktin*-Gen verwendet, welches während des Lebenszyklus von *Volvox* konstant exprimiert wird (Cresnar et al. 1990) und in früheren Experimenten als Referenzgen verwendet wurde (Amon et al. 1998; Hallmann et al. 2001; Hallmann 2006b; Nematollahi et al. 2006). Die berechneten Expressionen für alle Zeitpunkte wurden mit dem Wert vom Punkt 1 normalisiert.

Die Expression des *CHRI* bleibt vor und während der Zellteilung niedrig (Punkt 1 bis 4) und erreicht sein Maximum am Ende der Inversion (Punkt 5). Kurz danach und während der folgenden Wachstumsphase (beim Beginn der Lichtphase) sinkt das Expressionslevel zuerst und nimmt einige Stunden später (mit dem Beginn der nächsten Dunkelphase) wieder zu (Abbildung 4-8). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression dieses Gens während der Dunkelphase (Punkt 5 und 7) zunimmt. Das Expressionslevel stieg bei Punkt 5 um den Faktor ~10 und bei Punkt 7 um den Faktor ~ 5. Das Expressionsniveau des *CHRI*-Gens wurde zudem im sexuellen Lebenszyklus untersucht. Das Expressionsmuster des *CHRI* im sexuellen Lebenszyklus ist identisch mit dessen Muster im vegetativen Lebenszyklus mit dem Unterschied, dass der Expressionslevel am Ende der Inversion 50% höher ist als im Vergleich zum gleichen Punkt im asexuellen Lebenszyklus.

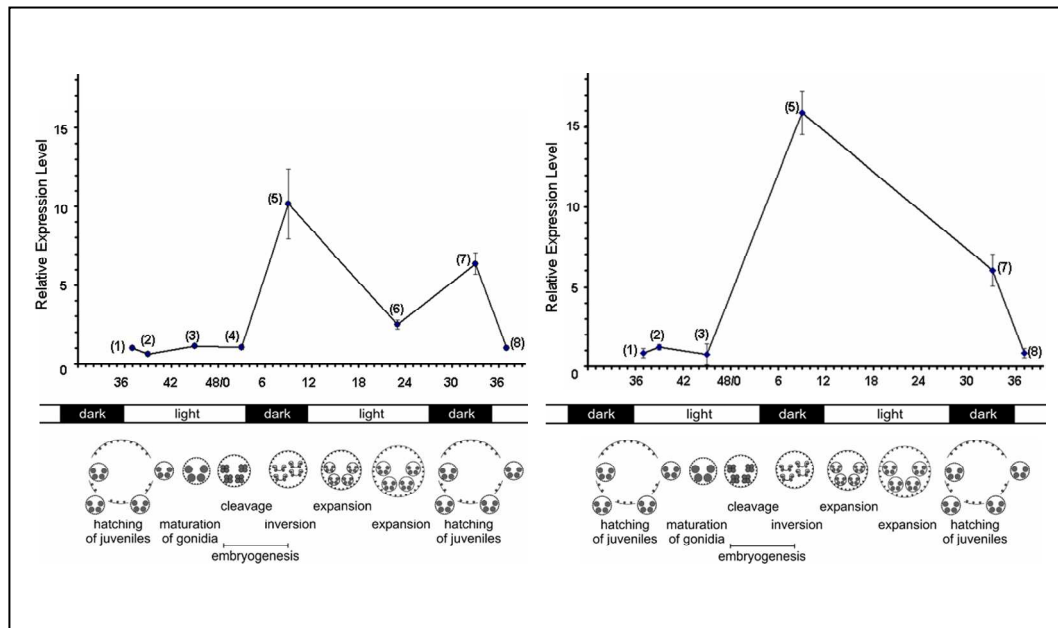


Abbildung 4-8: Das Expressionsmuster von *CHRI* während des asexuellen und sexuellen Lebenszyklus von *Volvox*.

Links. Das Expressionsmuster im asexuellen Lebenszyklus wurde dargestellt. Die X-Achse zeigt den Lebenszyklus von *Volvox* über 48 Stunden. Null Stunden ist als Beginn der Zellteilung definiert und 36 ist der Zeitpunkt der Freisetzung der Tochterkolonien aus der Mutterkolonie (Release). Die berechneten Expressionen für alle Zeitpunkte wurden mit dem Wert vom Punkt 1 normalisiert. Alle Messungen wurden in drei Parallelansätzen durchgeführt. Unten ist die Licht-Dunkel-Phase im Lebenszyklus von *Volvox* schematisch dargestellt. Für weitere Informationen siehe auch Abbildung 2-1. **Rechts.** Die Expression von *CHRI* ist nach der Zugabe des Sex-Induktors zu den vegetativen Algen (Induktion) gemessen und dargestellt. Punkt 1 ist als der Zeitpunkt der Induktion definiert.

Die *Real Time* RT-PCR-Analyse des *CHR2*-Gens während des asexuellen Lebenszyklus zeigte, dass die Expression dieses Gens nach der Freisetzung der Tochterkolonien niedrig bleibt (Punkt 1 und 2). Jedoch nimmt sie vor der ersten Zellteilung leicht zu (Punkt 3; Abbildung 4-9). Während der Zellteilung (Punkt 4) ist die Expression von *CHR2* niedrig. Wie zuvor das *CHRI*-Gen, so wird auch das *CHR2*-Gen am Ende der Inversion (Punkt 5) stark exprimiert (Faktor ~10 im Vergleich zu dem Punkt 1) und erreicht dort sein Maximum. Nach der Inversion nimmt die Expression wieder ab und stagniert bis zur nächsten Zellteilung. Im Gegensatz zu *CHRI*, bei dem die Expression in der zweiten Dunkelphase wieder zunimmt, weist die *CHR2*-Expression keine weitere Steigerung bei Punkt 7 auf. Im sexuellen Lebenszyklus ähnelte das Expressionsmuster von *CHR2* dem des asexuellen Lebenszyklus, allerdings mit einem starken Anstieg um 400% am Ende

der Inversion (Punkt 5), was als Hinweis auf die Rolle von *CHR2* im sexuellen Lebenszyklus in *Volvox* gewertet werden kann.

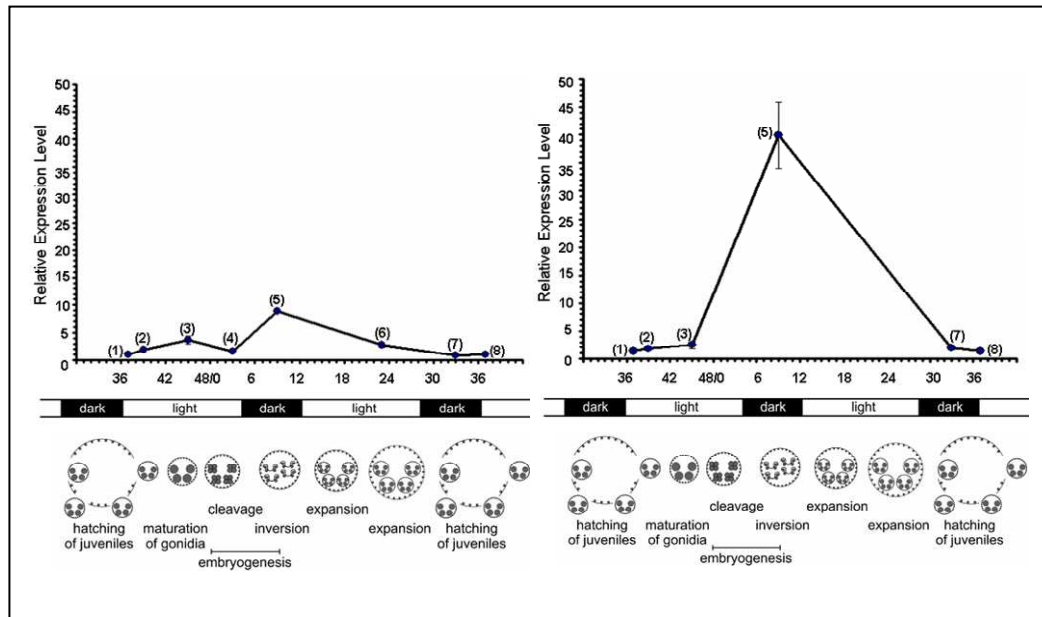


Abbildung 4-9: Das Expressionsmuster des *CHR2* im asexuellen und sexuellen Lebenszyklus von *Volvox*.

Die X-Achse zeigt den Lebenszyklus von *Volvox* über 48 Stunden hinweg. Null Stunden ist als Beginn der Zellteilung definiert und 36 ist der Zeitpunkt der Freisetzung der Tochterkolonien aus der Mutterkolonie. Die berechneten Expressionen für alle Zeitpunkte wurden mit dem Wert von Punkt 1 normalisiert. Alle Messungen wurden in drei Parallelansätzen durchgeführt. Unten ist die Licht-Dunkel-Phase im Lebenszyklus von *Volvox* schematisch dargestellt. **Links.** Das Expressionslevel von *CHR2* im asexuellen Lebenszyklus über den ersten Zellteilung (Punkt 3) und am Ende der Inversion (Punkt 5) **Rechts.** Nach der Zugabe des Sex-Induktors nimmt die *CHR2*-Expression stark zu und erreicht ihre höchste Expression am Ende der Inversion.

Die Expressionsdaten zeigen, dass *CHR1* und *CHR2* im Laufe des asexuellen und sexuellen Lebenszyklus von *Volvox* unterschiedlich exprimiert werden. Die höchste Expression für beide Gene liegt am Ende der Inversion in der Dunkelphase. Dieses Expressionsmuster ähnelt Expressionsdaten von *Volvoxopsin*, das am Ende der Inversion stark exprimiert wird (Ebnet et al. 1998). Diese Tatsache ist besonders interessant, weil Rhodopsine eigentlich als Photorezeptor in der Augenfleck-Region der Somazellen für Phototaxis nötig sind (Foster et al. 1984; Kateriya et al. 2004). In *Volvox* würde dann eine höhere Expression der Rhodopsine am Ende der Wachstumsphase bei der Freilassung der Tochterkolonien erwartet, weil in dieser Phase die Rhodopsine für die Orientierung und Lichtdetektion in Tochterkolonien benötigt werden.

Die Zunahme der Expression von *CHR1* und *CHR2* in *Volvox* während der Embryogenese, wenn die Zelldifferenzierung stattfindet, ist ein Hinweis darauf, dass diese Proteine möglicherweise an anderen Prozessen wie z.B. der Zelldifferenzierung direkt oder indirekt beteiligt sind. Es wurde spekuliert, dass ein Zusammenhang zwischen den Rhodopsinen und der differenziellen Proteinsynthese in Somazellen und Gonidien besteht (Kirk und Kirk 1985). Dies betrifft nicht nur den asexuellen Lebenszyklus von *Volvox*, sondern auch den sexuellen Lebenszyklus, da die Expression der *CHR1*- und *CHR2*-Gene im sexuellen Lebenszyklus im Vergleich zum asexuellen Lebenszyklus zunimmt.

Die *Real Time* RT-PCR-Analysen zeigen, dass die Expression von *CHR1* und *CHR2* in der Dunkelphase am höchsten ist und mit dem Beginn der Lichtphase abnimmt. Der Zusammenhang zwischen der Expression der Channelrhodopsine und der Licht-Dunkel-Phase ist bei *CHR1* deutlicher zu sehen als bei *CHR2*. Während die Expression des *CHR1* mit dem Beginn beider Dunkelphasen (Punkt 5 und 7) im asexuellen Lebenszyklus steigt, nimmt die Expression des *CHR2* nur bei der ersten Dunkelphase (Punkt 5) zu (Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9). Die weiteren Untersuchungen zeigten, dass die Expression der *CHR1* und *CHR2* negativ durch Licht reguliert wird. Allerdings ist die Wirkung des Lichtes auf die Expression des *CHR1* stärker als auf *CHR2*. Vergleicht man die Expression der beiden Channelrhodopsine in Abhängigkeit von Licht, so kann man feststellen, dass die Expression von *CHR1* viel lichtsensitiver ist als von *CHR2*. Da *CHR1* als dominantes Gen bei der lichtinduzierten Reaktionen vermutet wird (Berthold et al. 2008), kann die direkte Regulation dieses Gens durch das Licht als Vorteil für die Regulation der lichtinduzierten Reaktionen in *Volvox* gelten.

Neben der Lichtintensität spielt die Umgebungstemperatur für die lichtinduzierten Reaktionen eine wichtige Rolle. Die Phototaxis wird in *Volvox* durch die Temperatur beeinflusst. Beispielsweise kann eine positive Phototaxis bei Temperaturen zwischen 20-30°C durch Senkung der Temperatur auf 14°C in eine negative Phototaxis umgewandelt werden (Sakaguchi and Tawada 1977; Sakaguchi and Iwasa 1979). Um den Einfluss der Temperatur auf die Expression von *CHR1* und *CHR2* zu untersuchen, wurden die Algen einmal bei einer höheren (100 min bei 42°C und anschließend 20 min bei 45°C; Kirk and Kirk 1986) und einmal bei einer niedrigeren Temperatur (120 min bei 14°C im Vergleich zur normalen Züchtungstemperatur 28°C) inkubiert. Anschließend wurde RNA isoliert

und die relative Expression im Vergleich zu den bei 28°C kultivierten Algen gemessen.

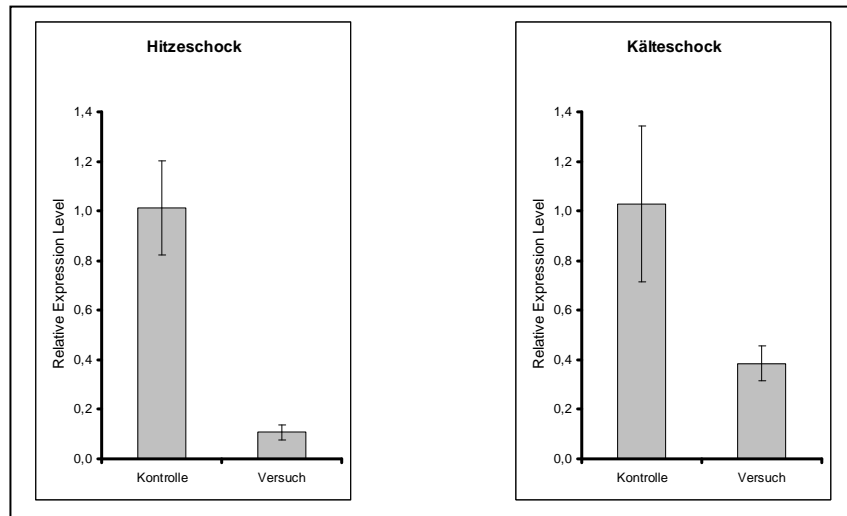


Abbildung 4-10: Expression von *CHRI1* nach Hitze- und Kältebehandlung.

Für Hitzeschock-Bedingungen wurden die Algen zuerst 100 min bei 42.5°C und dann 20 min bei 45°C inkubiert. Die Kältebehandlung erfolgte durch eine 120-minütige Inkubation der Algen bei 14°C. Die Kontrollalgen wurden bei 28°C kultiviert. Die Messung der Expression erfolgte mit Hilfe der *Real Time* RT-PCR-Analyse. Alle Messungen wurden in drei Parallelansätzen durchgeführt.

Durch die Inkubation der Algen bei höheren Temperaturen wurde die Expression beider Gene stark vermindert. Im Vergleich zur Kontrolle exprimierten behandelte Algen ~90% weniger *CHRI1* und ~25% weniger *CHR2*. Die Inkubation der Algen bei niedrigeren Temperaturen führte ebenso zur Abnahme der Expression beider Gene. Im Vergleich zur Kontrolle wurde *CHRI1* ~63% und *CHR2* ~62% weniger exprimiert (Abbildung 4-10, Abbildung 4-11). Die temperaturabhängige Expression dieser Gene, besonders bei niedrigeren Temperaturen, korreliert mit der Umschaltung von positiven zu negativer Phototaxis unter niedrigeren Temperaturen.

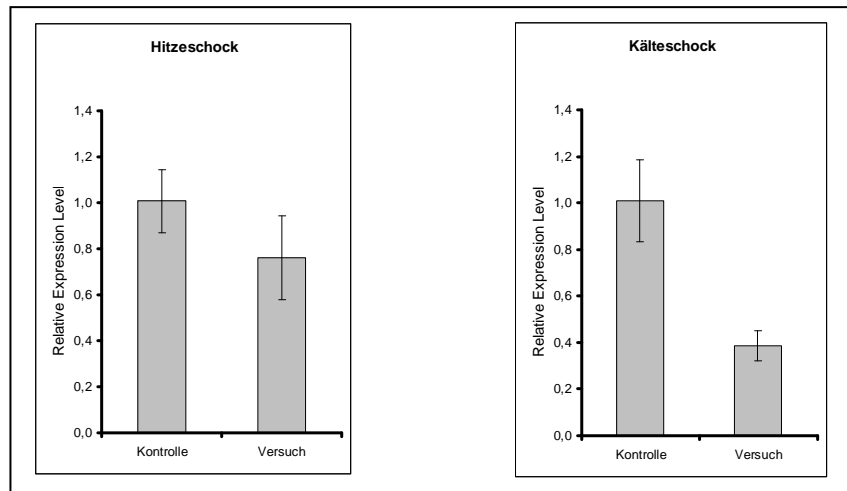


Abbildung 4-11: Expression des *CHR2* nach Hitze- und Kältebehandlung.

Die Hitzebehandlung erfolgte durch 100-minütige Inkubation der Algen bei 42.5°C und eine 20-minütige Inkubation bei 45°C (Kirk und Kirk 1985). Für die Kältebehandlung wurden die Algen bei 14°C für 120 min inkubiert. Nach der Messung der Expression mittels *Real Time* RT-PCR wurden die Daten mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ Methode ausgewertet (Bustin 2000).

Diese Daten zeigen, dass die Expression beider Channelrhodopsine in *Volvox* durch Licht und Temperatur reguliert wird. Da beide Gene an phototaktischen und photophobischen Reaktionen beteiligt sind, wird die Wirkung der Umgebungsfaktoren wie Licht und Temperatur auf die Expressionen dieser Gene dem Organismus helfen, auf die Veränderung im Licht und Temperatur effektiver zu reagieren. Die Umschaltung von positiver Phototaxis bei Temperaturen zwischen 20-30°C zu einer negativen Phototaxis bei 14°C (Sakaguchi and Iwasa 1979) könnte auf eine veränderte Expression von *CHR1* und *CHR2* zurückzuführen sein. Von diesen beiden Genen schien *CHR1* sensitiver und schneller auf Licht und Temperatur zu reagieren. Da photoinduzierte Reaktionen bei Algen sehr schnell angeschaltet werden (Kateriya et al. 2004), ist eine schnelle Expression beteiligter Gene in diesem Prozess von enormer Bedeutung. *CHR1* könnte deshalb eher als ein beteiligtes Gen für die lichtinduzierten Reaktionen in Betracht kommen. Dieses Gen wird durch Licht negativ reguliert und seine Expression ist sehr sensitiv gegenüber Veränderungen der Umgebungsfaktoren wie z.B. Licht und Temperatur. In *Chlamydomonas* wird das Channelrhodopsin-1 als das dominante Gen für die photophobischen Reaktionen vermutet (Berthold et al. 2008). Die hier vorliegenden Daten deuten auf eine Beteiligung des *CHR1*-Gens an den lichtinduzierten Reaktionen hin. Inwieweit dieses Gen an phototaktischen

und photophobischen Reaktionen bei *Volvox* beteiligt ist und welche Rolle dabei andere Gene wie z.B. *CHR2* spielen, blieb aber unklar.

Zusammenfassend zeigt sich, dass *CHR1* und *CHR2* zwei Zelltyp-spezifische Gene sind, die ausschließlich in den Somazellen exprimiert werden. Diese Zelltyp-spezifische Expression ist durch die Beteiligung der Somazellen an lichtinduzierten Bewegungen in *Volvox* zu erklären. Die lichtinduzierten Reaktionen wie z.B. Phototaxis ändern sich in *Volvox* in Abhängigkeit von Licht und Temperatur (Sakaguchi and Tawada 1977; Sakaguchi and Iwasa 1979). Die Expressionsanalyse der Channelrhodopsine unter unterschiedlichen Licht- und Temperaturbedingungen zeigte, dass die Expression beider Gene durch Licht und Temperatur beeinflusst wird. Diese Korrelation zwischen den Veränderungen in Phototaxis und der Expression der Channelrhodopsine könnte bedeuten, dass diese beiden Gene an diesem Prozess beteiligt sind.

Außer der Zelltyp-spezifischen Expression beider Channelrhodopsine in den somatischen Zellen als Hinweis für ihre Beteiligung in der Phototaxis, deutet deren entwicklungsabhängige Expression während des Lebenszyklus in *Volvox* auf die Rolle dieser Gene bei der Zelldifferenzierung hin. Obwohl die Zellteilung in *Volvox* in der Dunkelphase beendet wird, bleiben die Zellen bis zum Beginn der Lichtphase undifferenziert. Die Wirkung des Lichts auf translationeller Ebene führt zur differenziellen Proteinsynthese in Somazellen bzw. Gonidien und anschließender Zelldifferenzierung (Kirk und Kirk 1985). Die Untersuchung dieser Proteinsynthese unter der Belichtung mit unterschiedlichen Wellenlängen konnte zeigen, dass das Absorptionsmaximum für die Proteinsynthese bei 500 nm liegt, was dem Aktionsspektrum von Channelrhodopsine ähnelt (Kirk und Kirk 1985; Hegemann und Tsunoda 2007). Dies zusammen mit dem Expressionsmuster der Channelrhodopsine in *Volvox*, die am Ende der Embryogenese stark exprimiert werden (unter der Voraussetzung, dass das Protein auch in diesem Zeitraum synthetisiert wird), deutet darauf hin, dass *CHR1* und *CHR2* eine Rolle bei der Zelldifferenzierung spielen. Diese beiden Channelrhodopsine könnten als Zelltyp-spezifische Photorezeptoren die Proteinsynthese in Somazellen kontrollieren bzw. regulieren. Die Identifizierung weiterer Rhodopsine zusammen mit der Bestimmung ihrer Zelltyp-spezifischen Expressionsmuster könnte diesen Zusammenhang zwischen der differenziellen Proteinsynthese in Somazellen, Gonidien und Rhodopsinen mehr erläutern.

Da die Channelrhodopsine seit ihrer Entdeckung in *Chlamydomonas* (Nagel et al. 2002; Nagel et al. 2003; Sineshchekov et al. 2002) zur Kontrolle der Neuronenaktivität in der Neurobiologie eingesetzt werden, ist die Suche nach neuen Channelrhodopsinen aus Algen mit erweiterten Eigenschaften wie z.B. anderen Aktionsspektren oder größerer Durchlässigkeit für bestimmte Ionen von großer Bedeutung, was jedoch erst vor kurzem begonnen wurde (Nagel et al. 2005; Zhang et al. 2007; Hegemann 2008). Die in dieser Arbeit neu identifizierten Channelrhodopsine aus *Volvox* (CHR1 und CHR2) sind daher als geeignete Kandidaten für die weitere Analyse bezüglich ihrer Anwendung in der Neurobiologie zu werten. Die Bestimmung der Aktionsspektren für CHR1 und CHR2 bzw. die Messung ihrer Ionen-Transport-Aktivität wäre der nächste Schritt zur Charakterisierung dieser beiden Proteine.

5 Charakterisierung eines RNA-bindenden Proteins, NAB1, in *Volvox*

5.1 Einleitung

Die Grünalge *Volvox carteri* dient als Modellorganismus zur Untersuchung von Zelldifferenzierung, Seneszenz und Phototaxis (Kirk und Harper 1986; Kirk 1997; Pommerwille und Kochert 1982; Sakaguchi und Iwasa 1979). Diese Alge besitzt nur zwei Zelltypen, nämlich Gonidien (reproduktive Zellen) und Somazellen. Diese beiden Zelltypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morphologie, Physiologie, Zellgröße, Protein- und Genexpressionsmuster (Starr 1969, 1970; Kirk und Kirk 1983, 1985; Kirk et al. 1993; Tam und Kirk 1991; Nematollahi et al. 2006). Die 2000-3000 kleinen Somazellen, die an der Oberfläche der *Volvox*-Sphäroid lokalisiert sind, besitzen zwei Flagellen, einen Augenfleck und im Vergleich zu Gonidien einen kleinen Chloroplasten. Die Somazellen sind auf die Bewegung und Phototaxis spezialisiert (Hoops 1993, 1997) und sind nicht in der Lage sich weiter zu teilen und sterben nach einer Generation durch einen programmierten Alterungsprozess (Pommerwille und Kochert 1981, 1982). Im Gegensatz zu den Somazellen teilen sich die Gonidien und bilden neue Generationen. Die Gonidien besitzen einen großen Chloroplasten, der die nötige Energie für Wachstum und Teilung bereitstellt.

Neben einer Reihe von Genen, die differenziell in beiden Zelltypen exprimiert werden (Tam und Kirk 1991; Nematollahi et al. 2006), unterscheiden sich ihre Proteinmuster stark (Kirk und Kirk 1985;). Es sind bereits einige Gene bekannt, die entweder stärker in Somazellen oder in Gonidien exprimiert werden. Tam und Kirk zeigten 1991, dass 19 Gene stärker in den Gonidien exprimiert werden, während zwölf weitere Gene vermehrt in den Somazellen exprimiert werden. Die Expressionsanalyse der 19 Gonidien-spezifischen Gene während des asexuellen Lebenszyklus von *Volvox* konnte zeigen, dass nur eines dieser Gene (*GI67*) während der Embryogenese, die weiteren 18 dagegen vermehrt nach der Embryogenese bzw. während der Freisetzung und Reifung der jungen Kolonien exprimiert werden (Tam und Kirk 1991). Die weitere Charakterisierung dieser 18 Gene zeigte, dass 16 dieser Gonidien-spezifischen Gene an der Photosynthese

beteiligt sind. Die Aminosäuresequenzen von drei dieser Gene zeigten Homologien zu den Proteinen des Lichtsammelkomplexes. *OEE3* (oxygen-evolving enhancing protein 3), *LHCA* (light-harvesting complex protein A) und *FNR* (ferredoxin-NADP⁺ reductase) kodieren Chloroplastproteine, die an der Photosynthese beteiligt sind (Choi et al. 1996; Meissner et al. 1999). Diese in der Thylakoidmembran lokalisierten Proteine sind verantwortlich für die Absorption der Lichtenergie und deren Weiterleitung zum Lichtreaktionszentrum der Photosynthese (Jansson 1994; Kargul und Barber 2008).

Auf der Suche nach weiteren zellspezifisch exprimierten Genen in *Volvox* untersuchten Nematollahi et al. (2006) einen Pool von 40 Genen auf ihre zellspezifische Expression. Die Analyse zeigte, dass 26 Gene eine signifikante Expressionsdifferenz (höher als Faktor zwei) zwischen den Somazellen und den Gonidien aufweisen. 16 dieser Gene werden überwiegend in den Somazellen exprimiert, während zehn weitere Gene ein höheres Expressionsniveau in den Gonidien aufweisen. Unter den letzteren befindet sich das *NABI*-Gen, dessen Expression in den Gonidien um mehr als den Faktor vier gegenüber den Somazellen erhöht ist.

Das zum ersten Mal in *Chlamydomonas* charakterisierte RNA-bindende Protein NAB1 (putative nucleic acid binding protein) ist an der posttranskriptionellen Regulation der Lichtsammelkomplex-Proteine des Photosystems II (LHCII-Komplex) beteiligt (Mussgnug et al. 2005). Durch die Analyse der EST-Sequenzen von *Chlamydomonas* konnten bereits neun LHCII-Isoformen (*LHCBM1*, *LHCBM2*, *LHCBM3*, *LHCBM4*, *LHCBM5*, *LHCBM6*, *LHCBM8*, *LHCBM9* und *LHCBM11*) identifiziert werden (Elrad et al. 2002; Elrad und Grossman 2004). Die Expression dieser Gene auf Proteinebene konnte für alle, außer *LHCBM11*, nachgewiesen werden (Stauber et al. 2003). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der LHCBM-Proteine erbrachte einen starken Konservierungsgrad dieser Proteine, kleinere Sequenzunterschiede sind überwiegend im N-terminalen Bereich zu finden. Trotz ihrer sehr ähnlichen Sequenzen wird vermutet, dass jedes dieser Proteine eine spezifische Funktion im LHCII-Komplex besitzt (Elrad et al. 2002). Die posttranskriptionelle Regulation der *LHCBM*-Gene geschieht durch die Bindung des NAB1 an das Transkript der *LHCBM*-Gene. Der cytosolische Translationsrepressor NAB1 sequestriert die *LHCBM*-mRNAs in sub-polysomalen mRNP-Komplexen (messenger

ribonucleoprotein complex) und verhindert dadurch ihre Translation (Mussgnug et al. 2005; Wobbe et al. 2008). NAB1 besitzt zwei RNA-bindende Domänen, nämlich CSD (cold shock domain) am N-Terminus und RRM (RNA recognition motif) am C-Terminus. Die Kombination dieser Domänen ist wahrscheinlich für die spezifische Erkennung der *LHCBM*-mRNAs und darauf folgende Translationsblockierung entscheidend (Mussgnug et al. 2005).

Im Gegensatz zu *Chlamydomonas* besitzt *Volvox* zwei Zelltypen mit unterschiedlichen Photosyntheseaktivitäten. In *Volvox* sind die photosynthetischen Aktivitäten in Somazellen deutlich geringer als in Gonidien, was durch die verminderte Expression der an der Photosynthese beteiligten Gene und der daraus folgenden Blockierung der Photosynthese in diesem Zelltyp erklärt werden kann. Der Schlüsselregulator dieses Prozesses ist das REGA (somatic regenerator) Protein, welches mit Hilfe einer DNA-bindenden VARL-Domäne in der Lage ist, an Gene zu binden, die an der Photosynthese beteiligten sind und deren Expression in den Somazellen zu blockieren (Kirk et al. 1999; Meissner et al. 1999; Duncan et al. 2006; Duncan et al. 2007). Durch die Aktivität von REGA in den Somazellen wird die Biogenese der Chloroplasten blockiert, was wahrscheinlich auch mit dem Beginn der programmierten Alterungsprozesse zusammenhängt (Kirk et al. 1999; Meissner et al. 1999; Pommerwille und Kochert 1982). Basierend auf diesen Daten könnte ein Teil der Zelldifferenzierung in *Volvox* auf eine unterschiedliche Regulation der Photosynthese in beiden Zelltypen zurückzuführen sein. Bei der Zelltyp-spezifischen Regulation der Photosynthese in *Volvox* könnte eventuell der cytosolische Translationsrepressor NAB1 beteiligt sein. Um mehr über die Rolle des NAB1 bei der Regulation der Photosynthese in Somazellen und Gonidien zu erfahren, wurde im Rahmen dieser Arbeit das *NAB1*-Gen kloniert und näher charakterisiert.

5.2 Material und Methoden

Volvox-Stamm und Kulturbedingungen

Der verwendete *Eve10* Stamm (Wildtyp) von *V. carteri* f. *nagariensis* wurde freundlicherweise von Herrn David Kirk (Washington University, St. Louis, MO) zur Verfügung gestellt. Der Stamm wurde in *Volvox*-Standardmedium (SVM) (Provasoli und Pintner 1959) kultiviert. Ein synchrones Wachstum konnte durch konstante Belüftung bei 28°C im 8 Stunden Dunkel- / 16 Stunden Licht- (10,000 Lux)-Rhythmus erzielt werden (Starr und Jaenicke 1974). Stammkulturen wurden in Reagenzgläsern mit 10 ml SVM gehalten und nach einer Generation in frisches Medium überimpft. Für die DNA- und RNA-Isolierung wurden die Algen in 10 l Kolben steril überimpft und bis zu einer Dichte von 6-8 Algen pro ml synchron kultiviert.

DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurde das DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dafür wurden die Algen zuerst auf einem 100 µm Sieb aufkonzentriert und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die gefrorenen Algen mit einem Minipistill zerkleinert und die DNA wurde nach Angaben des Herstellers isoliert.

Für die Isolierung größerer Mengen an DNA wurde die CTAB-Methode verwendet (Murray und Thompson 1980; Saghai-Marooof et al. 1984). Nach Zugabe von 10 ml CTAB-Lösung [150 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1,05 M NaCl; 15 mM EDTA (pH 8,0); 1,5% (w/v) CTAB und Zugabe von 1,5% (v/v) β -Mercaptoethanol unmittelbar vor dem Gebrauch] auf 10 ml in Stickstoff gemörserte Algen wurde die Mischung 1-2 Stunden unter ständigem Schütteln bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 min auf Eis abgekühlt und nach der Zugabe von 15 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) 20 min lang wiederholt invertiert. Nach Zentrifugation bei 2100 g für 30 min wurde die wässrige Phase abgenommen, mit 20 µl RNase (10 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol (-20°C) und einer anschließenden 10-minütigen

Zentrifugation bei 12.000 g. Das Pellet wurde dann zweimal mit 70% EtOH (-20°C) gewaschen und in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) aufgenommen. Die Konzentration und die Qualität der DNA wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese und photometrischer Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) bestimmt.

RNA Isolierung

Die eingefrorenen Algen wurden im Mörser fein zerkleinert und die RNA wurde unter Verwendung von Tri-Reagent isoliert (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO). 1 ml fein gemörserte Algen wurden zuerst in 10 ml Tri-Reagent und 3 ml Chloroform aufgenommen und gemischt. Nach Zentrifugation bei 12.000 g für 15 min bei 4°C wurde die RNA durch Zugabe von Isopropanol zu der wässrigen Phase gefällt, zweimal mit 70% EtOH gewaschen und anschließend in RNase-freiem Wasser (behandelt mit 0,1% Diethylpyrocarbonat) aufgenommen. Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit Hilfe eines RNA-Formaldehyd-Agarosegels und photometrischer Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm (GE Healthcare, Uppsala, Schweden).

Standard PCR

Die Standard PCR-Reaktionen (1x PCR Puffer, 2 *Units* Taq-DNA-Polymerase, 100 µM je dNTP, 1 µM je Primer und ~ 100 ng DNA) wurden in 25 µl-Maßstab im sterilen 0,2 ml-PCR-Gefäßen angesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm: 3 min bei 94 °C, 40 Reaktionszyklen (30 s bei 95°C, 3 min bei 55°C und 2 min bei 72°C) und anschließend 7 min bei 72°C.

Standard RT-PCR

Für die reverse Transkription (RT) wurde 1 µg Gesamt-RNA von *Volvox* eingesetzt. Das Umschreiben der *NABI*-mRNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des Primers ON15048 (5'-CAACTGTCCCTCAACATCCG; Siehe 8.2) und der Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) Reversen Transcriptase (Promega). Die Reaktionszeit betrug eine Stunde bei 50°C und wurde anschließend durch eine 15-minütige Inkubation bei 65°C gestoppt. 10 µl dieses

Ansatzes wurde dann als Template für die Amplifikation der cDNA in einer Standard-PCR eingesetzt.

Real Time RT-PCR

Nach der Isolation von Gesamt-RNA von *Volvox* wurde die RNA mit DNase I (Promega) behandelt, um die Amplifikation genomischer DNA während der *Real Time* RT-PCR auszuschließen. Zu diesem Zweck wurde 1 µg RNA mit 5 Units DNase I unter Verwendung von DNase-Puffer (20 mM Tris, pH 8.4, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl) versetzt. Die *Real Time* RT-PCR wurde mit Hilfe des QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kits von Qiagen durchgeführt. Als Template wurde 300 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Zusätzlich zu dem Template beinhaltete jeder Reaktionsansatz je 0,8 µM der Primer, 12,5 µl 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix und 0,25 µl QuantiTect RT Mix in einem Gesamtvolumen von 25 µl.

Alle Messungen wurden in drei Parallelansätzen durchgeführt. Zwei zusätzliche Ansätze (einmal ohne Zugabe von RNA und einmal ohne Zugabe von Reverser Transkriptase) dienten als Negativ-Kontrollen. Die Amplifikation der Spleißvariante 1 des *NABI*-Gens wurde durch den Einsatz des Primerpaars ON14887 (5'-GGAACCGTGAAGTGGTTCAAC) und ON14888 (5'-CCTCAACCTCAAACCTCGACG) durchgeführt (Siehe 8.2). Die Spleißvariante 2 wurde mit dem Primerpaar ON14887 (5'-GGAACCGTGAAGTGGTTCAAC) und ON15233 (5'-CAATAACGACGTGTTGTGCAAAGC) amplifiziert (Siehe 8.2). Das Primerpaar ON15010 (5'-TGAGAAGACGTACGAGCTGC) und ON15011 (5'-CCTCCATGCCGATTAGGCTA) diente zur Amplifikation des 101-bp langen *Aktin*-Fragments, welches als Referenz in diesem Experiment verwendet wurde. Die *One Step Real Time* RT-PCR wurde anhand des folgenden PCR-Programms in einem *Real Time Cycler* (DNA Engine Opticon Continuous Fluorescence Detection, MJ Research, Waltham, MA) durchgeführt: 30 min bei 50°C (für die cDNA-Synthese), 15 min 95°C Vorlauf und 40 Amplifikationszyklen (95°C für 20 s, 55°C für 30 s und 72°C für 40 s). Das relative Expressionsniveau wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode unter der Verwendung des *Aktin*-Gens als Referenz bestimmt (Bustin 2000; Pfaffl 2001; Nematollahi et al. 2006).

Nothern Blot

8 µg Gesamt-RNA wurde auf einem 1,5%igem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Membran (Roche, Germany) geblotet. Anschließend wurde durch eine 3-minütige Inkubation im UV-Crosslinker die RNA auf der Membran fixiert. Die Prähybridisierung wurde für 2 Stunden bei 42°C in „DIG Easy Hyb“-Lösung (Roche, Germany) durchgeführt. Unter Verwendung des „PCR DIG Labeling Mix“-Kits (Roche, Germany) und des Primerpaars ON15047 (5'-CTGTAAGCTGCCGAAAGCTG) und ON15048 (5'-CAACTGTCCCTCAACATCCG) wurde eine 817-bp-lange DIG-markierte *NABI*-Sonde hergestellt (Siehe 8.2). Die Membran wurde dann mit der denaturierten Sonde (20 ng Sonde pro Hybridisierungslösung) über Nacht hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran einmal mit 2x SSC/0,1% SDS bei RT für je 5 min und zweimal mit 0,1x SSC/0,1% SDS bei 52°C für jeweils 20 min gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers gegen DIG, an dem zugleich eine alkalische Phosphatase gebunden ist, unter Verwendung von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) nach Herstellerangaben (Roche, Germany).

Southern Blot

Nach dem Verdau von 12 µg DNA mit *HincII* wurden die DNA Fragmente in einem 1%igem Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran (Hybond-N; Amersham Biosciences) übertragen und durch eine Hitzebehandlung (30 min bei 120°C) auf der Membran fixiert (Sambrook et al. 1989). Die 578-bp-lange DIG-markierte *NABI*-Sonde wurde unter Verwendung des PCR DIG Labeling Mix-Kits (Roche, Germany) und des Primerpaars ON15047 (5'-CTGTAAGCTGCCGAAAGCTG) und ON14888 (5'-CCTCAACCTCAAACCTCGACG) amplifiziert (Siehe 8.2). Die Prähybridisierung, die Hybridisierung und alle Waschschrte erfolgten nach einem Standard-Protokoll (Sambrook et al. 1989). Die Detektion erfolgte mit Hilfe der Anti-DIG-Antikörper konjugiert mit alkalischer Phosphatase unter Verwendung des Chemolumineszenz-Substrats CDP Star (Roche Applied Science).

Klonierung des *NABI*-Gens und von *NABI*-cDNA

Die Klonierung des *NABI*-Gens erfolgte durch die Verwendung des Primerpaars ON15043 (5'-CCGTGGATATGGAAGGTATTG) und ON15046 (5'-TAGTCGACGGAGTAAGCGAG) in einer Standard PCR-Reaktion (Siehe 8.2). Als Template wurde genomische DNA der *Volvox*-Linie *Eve10* verwendet. Das 4882 bp lange Fragment wurde dann in den mit *EcoRV* geschnittenen pKS(+) Bluescript II Vektor kloniert und von beiden Seiten sequenziert.

Das Primerpaar ON15047 (5'-CTGTAAGCTGCCGAAAGCTG) und ON15048 (5'-CAACTGTCCCTCAACATCCG) wurde zur Amplifikation der *NABI*-cDNA verwendet (Siehe 8.2). Durch eine Standard RT-PCR und die Verwendung von 1 µg RNA konnte die 817-bp-lange cDNA von *NABI* amplifiziert werden. Die cDNA wurde nach der Klonierung in den mit *EcoRV* geschnittenen pKS(+) Bluescript II Vektor von beiden Seiten sequenziert.

Separation von Gonidien und Somazellen

Zur Analyse der Zelltyp-spezifischen Genexpression wurden Gonidien und Somazellen voneinander getrennt. Die in 10 Liter Kolben synchron gewachsenen Algen wurden vor der ersten Zellteilung durch ein 100 µm Sieb aufkonzentriert. Nach der Aufschließung der *Volvox*-Sphäroide mit Hilfe eines Dounce-Homogenizator wurden die zwei Zelltypen unter Zugabe von 7% Percoll voneinander getrennt (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO) (Nematollahi et al. 2006).

Induktion der sexuellen Entwicklung

Zur Erzeugung des Sex-Induktors wurde der männliche Stamm *69-1B* zuerst 100 min bei 42°C und anschließend 20 min bei 45°C inkubiert (Kirk und Kirk 1986). Durch diesen Hitzeschock schalten die Algen vom asexuellen in den sexuellen Lebenszyklus um und produzieren den Sex-Induktor. Nach der Freisetzung des Sex-Induktors ins Medium wurde dieses Medium steril filtriert. 70 ml von diesem Medium wurde dann zur Induktion der in den 10 Liter Kolben synchron gewachsenen Weibchen-Linie *Eve10* beim Release eingesetzt.

Datenbank-Analysen

Die Identifizierung der *LHCBM*-Gene in *Volvox*-EST-Datenbank (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=Volca1&advanced=1>) erfolgte anhand der Aminosäuresequenz von *LHCBM*-Genen von *Chlamydomonas* (Elrad et al. 2002; Elrad und Grossman 2004) unter der Verwendung von tBLASn (Altschul et al. 1990).

5.3 Ergebnisse

5.3.1 NABI-Gen aus *Volvox*

Unter den im ersten Teil dieser Arbeit untersuchten Genen befand sich ein 122 bp langes Fragment, das Gonidien-spezifisch exprimiert wurde (Nematollahi et al. 2006). Dieses Fragment gehörte zu dem NABI-Gen von *Volvox*, welches anhand der Homologie zu dem NABI von *Chlamydomonas* (Mussnug et al. 2005) in Kombination mit der frei zugänglichen *Volvox*-Genomsequenzen vom JGI (<http://genome.jgi-psf.org/Volca1/Volca1.home.html>) identifiziert und amplifiziert wurde (Abbildung 5-1). Nach der Klonierung in den mit *EcoRV* geschnittenen pKS(+) Bluescript II Vektor wurde dieses Fragment von beiden Seiten sequenziert. Darüber hinaus wurde unter der Verwendung der Gesamt-RNA von *Volvox* die cDNA von NABI-Gen amplifiziert, welche 56 bp vor dem Startcodon begann und 32 bp nach dem Stopcodon endete. Durch den Vergleich der Sequenz des 4882 bp langen genomischen NABI-Fragments und der Sequenz der 817 bp amplifizierten cDNA konnte dann die genaue Exon-Intron-Struktur des NABI-Gens ermittelt werden.

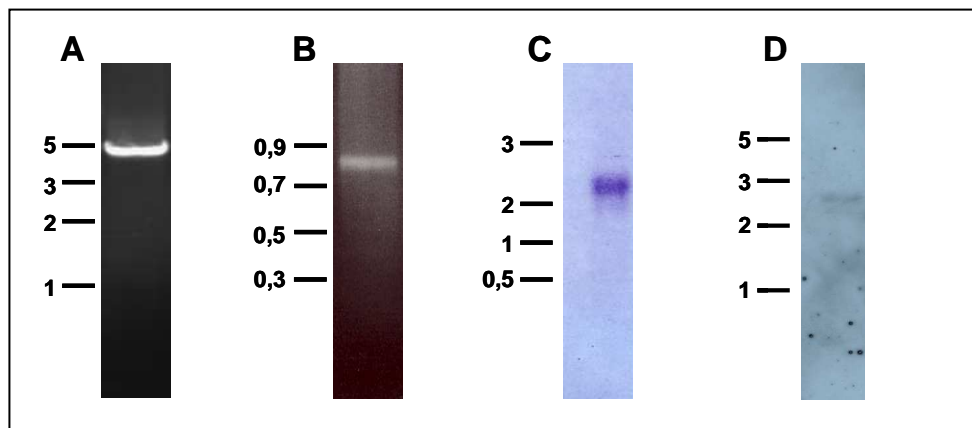


Abbildung 5-1: Identifikation des NABI-Gens in *Volvox*.

A. Durch genomische PCR konnte ein 4882 bp großes Fragment amplifiziert werden, welches das vollständige NABI-Gen beinhaltet. Zusätzlich zum kodierenden Bereich des NABI-Gens beinhaltet dieses Fragment 1177 bp, die sich vor dem Startcodon, und 1018 bp, die sich nach dem Stopcodon (3'UTR) befinden. **B.** Das 817 bp große cDNA-Stück vom NABI-Gen konnte anhand einer RT-PCR amplifiziert werden. **C.** Die Northern-Blot-Analyse ergibt für die NABI-mRNA eine Länge von 2,3 kb. Die Detektion der mRNA erfolgte durch den Einsatz des mit DIG markierten 817 bp großen cDNA-Fragmentes. **D.** Die Kopienzahl des NABI-Gens konnte anhand der Southern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Als Sonde wurde ein 578 bp langes Fragment des NABI-Gens mit DIG markiert und mit 12 µg mit *HincII* verdauter *Volvox*-DNA hybridisiert. Die Zahlen zeigen die Größe in Kilobasen (kb).

Das *NABI*-Gen (vom Start- bis zum Stopcodon) ist 2687 bp lang und besteht aus sechs Exons und fünf Introns. Der codierende Bereich des *NABI*-Gens ist 729 bp lang. Trotz dieses kurzen Kodierungsbereichs ist die Länge der mRNA ungefähr 2,3 kb groß, was auf den langen 3'UTR-Bereich (1583 bp) zurückzuführen ist, der durch EST-Datenbankanalyse und Northern-Blot bestätigt werden konnte (Abbildung 5-1). Die BLASTn Analyse des *Volvox*-Genoms und die Southern-Blot-Analyse zeigten, dass nur eine Kopie des *NABI*-Gens im *Volvox*-Genom (lokalisiert in Scaffold 1 der Genomsequenzierung des *Volvox*-Genoms von JGI mit dem Protein ID 78979) vorhanden ist (Abbildung 5-1).

Das offene Leseraster von *NABI* kodiert für ein 242 Aminosäure-langes Protein mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. Dieses Protein besitzt zwei Nukleinsäure-Bindedomänen: eine Kälteschock-Domäne (CSD) am N-Terminus (Aminosäurereste 7 bis 73) und ein „RNA Recognition Motif“ (RRM) am C-Terminus (Aminosäurereste 167 bis 236). Die Sequenz-Identität zwischen *Volvox*-NAB1 und *Chlamydomonas*-NAB1 beträgt 87,8% über 247 Aminosäuren und ihre Ähnlichkeit liegt bei 97,1% über 247 Aminosäuren (Abbildung 5-2).

FRGY2	MSEAEAEQEPPEVPQPESEFEIQKPGIAAARNQANKKVLATQVQ	GTVKWFNVRNCGYGFINR	60
NAB1-CR	MGEOLRQQ-----	GTVKWFNATKGFGITP	25
NAB1-VC	MGEOLRQR	GTVKWFNATKGFGITP	25
FRGY2	NDTKEDVFVHQTATKKNRPRKFLRSVGDGETVEFDVVEGEKGAEAANVTGPGGVPVKGS		119
NAB1-CR	GGGGEDLFFVHQTNNINSEG----FRSLREGEVVEFEVEACPDGRSKAVNVTGPGGAAPEG-		80
NAB1-VC	EGGGEDLFFVHQTNNINSDG----FRSLREGEAVEFEVEACPDGRSKAVSVSGPGGSAPEG-		80
FRGY2	-RFAPNRFRFRFRFRPRADTAGESGGEGVSPEQMSEGERGEETSPOQRFPQRRRPPFFFY		178
NAB1-CR	---AP--RNFR-----GGGRGRGR---ARGARGGYAAAYGYPQMAPVYPGY		119
NAB1-VC	---AP--RNFR-----GGGRGRGR---ARGARGAYAA-YGYPQMPMPYGY		118
FRGY2	RRRFRRGERPRNNQNOGAEVTEQSENKDPVAPTSEALASGDDPQRPPRRFRQRFRFR		238
NAB1-CR	--FFPADPTGRGRGRGG-----RGGAMPAMQGVMPG-----VAYPGM		154
NAB1-VC	--FFPADPTGRGRGRGR-----GG-MP-IQGMIOG-----MPYPGI		150
FRGY2	PRPAPQQTPECGDGEAKAESGDEPRPEPQRQRNRPYVQRFRRQGATQVAATAQEGKAEP		298
NAB1-CR	PMGGVGMPEPTCEPSGLQVVHNLPSWCQWQQLKDHFKEWVRVER--ADVVDAWGRSRGFG		212
NAB1-VC	PIPG-GLPEPTCEPSGLQVVHNLPSWCQWQQLKDHFKEWVRVER--ADVVDAWGRSRGFG		207
FRGY2	TQHPASEEGTPSDSPTDDGAPVQSSAPDPGIADTPAPE		336
NAB1-CR	TVRFITKEDAAATACDKLNSQIDGRTISVRLDRFA---		247
NAB1-VC	TVRFATKEDAAQACEKMNSQIDGRTISVRLDRFE---		242

Abbildung 5-2: Alignment zwischen *Volvox*-NAB1, *Chlamydomonas*-NAB1 und FRGY2.

Das Alignment stellt die Sequenzverwandtschaft zwischen NAB1 von *Volvox* (NAB1-VC), NAB1 von *Chlamydomonas* (NAB1-CR) und FRGY2 von *Xenopus leavis*. Die zwischen allen drei Proteinen konservierten Aminosäuren sind mit weißen Buchstaben auf schwarzem Hintergrund markiert. Die zwischen den NAB1-Sequenzen von *Volvox* und von *Chlamydomonas* identischen Aminosäuren sind mit schwarzen Buchstaben auf grauem Hintergrund dargestellt.

NAB1 ist außerdem auch homolog zu FRGY2 von *Xenopus leavis*. FRGY2 ist ein mRNA-bindendes Protein, das ebenfalls eine Kälte-Schock-Domäne (CSD) besitzt. Dieses Protein kontrolliert die mRNA-Expression in *Xenopus leavis* mittels Translationsrepression (Matsumoto et al. 1996). Die Homologie zwischen NAB1 und FRYG2 ist besonders am N-Terminus hoch, wo die CSD-Domäne liegt. Die Analyse des *Volvox*-Genoms durch eine tblastn-Suche (Proteinsequenz verglichen mit der Übersetzung aller sechs Leserahmen einer DNA-Sequenz) konnte zeigen, dass im gesamten *Volvox*-Genom NAB1 das einzige Protein mit einer CSD-Domäne ist. Es konnte nur ein homologes Protein zu NAB1 in *Volvox* identifiziert werden, das allerdings zwei RRM-Domänen aufweist. Dieses Protein (JGI Protein ID:109965) ist homolog zu GBP1 (G strand binding-protein 1), ein „Telomere DNA-binding Protein“ aus *Chlamydomonas* (Abbildung 5-3; Petracek et al. 1994).

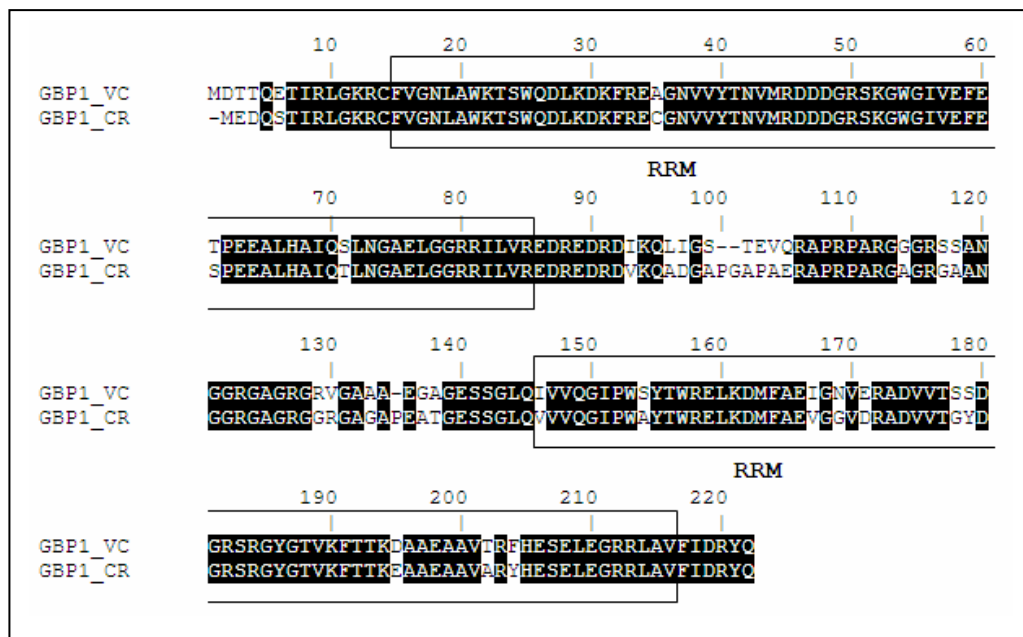


Abbildung 5-3: Alignment zwischen *Volvox*-GBP1, *Chlamydomonas*-GBP1.

Die Sequenzverwandtschaft zwischen GBP1 von *Volvox* (GBP1-VC) und GBP1 von *Chlamydomonas* (GBP1-CR) ist dargestellt. Die konservierten Aminosäuren zwischen GBP1-VC und GBP1-CR sind mit weißen Buchstaben auf schwarzem Hintergrund markiert. Die zwei RRM-Domänen sind gekennzeichnet.

Die starke Homologie zwischen NAB1 von *Volvox* und *Chlamydomonas* lässt vermuten, dass NAB1 in *Volvox* auch als RNA-bindendes Protein eine Rolle spielt. In *Chlamydomonas* wurde in *nab1*-Mutanten, in denen das *NAB1*-Gen mittels Plasmid-Mutagenese ausgeschaltet war, eine höhere Chlorophyllmenge nachgewiesen, was durch die Bindung von NAB1 an die mRNA der *LHCBM*-Gene und die dadurch verminderte Expression der *LHCBM*-Gene in *Chlamydomonas* begründet liegen könnte (Mussnug et al. 2005; Wobbe et al. 2008). Zur Analyse der Regulation der *LHCBM*-Gene durch NAB1 in *Volvox* wurden zunächst diese Gene in *Volvox* identifiziert.

5.3.2 *LHCBM*-Gene in *Volvox*

Zur Identifizierung der *LHCBM*-Gene in *Volvox* wurde eine tBlastn-Suche mit den Aminosäuresequenzen der *LHCBM*-Proteine aus *Chlamydomonas* in der *Volvox*-EST-Datenbank von JGI (<http://genome.jgi-psf.org/Volca1/Volca1.home.html>) durchgeführt. Durch diese Suche konnten 14 *LHCBM*-Gene identifiziert werden. Neun dieser Gene wurden nach den *Chlamydomonas* *LHCBM*-Genen, *LHCBM1* bis *LHCBM6*, *LHCBM8*, *LHCBM9* und *LHCBM11*, benannt (Elrad et al. 2002; Elrad und Grossman 2004). Diese Namensgebung erfolgte anhand der Homologie zwischen *LHCBM*-Gene von *Volvox* und *Chlamydomonas*. Weitere *LHCBM*-Gene wurden dann *LHCBM7*, *LHCBM10*, *LHCBM12*, *LHCBM13* und *LHCBM14* benannt (Abbildung 5-4). Die *LHCBM*-Gene von *Volvox* kodieren für kleine Proteine, welche zueinander sehr ähnlich sind. Der Unterschied zwischen diesen Proteinen liegt überwiegend im N-terminalen Bereich (Abbildung 5-4). *LHCBM5* ist mit 270 Aminosäuren das längste Protein, *LHCBM14* mit 223 Aminosäuren das kürzeste.

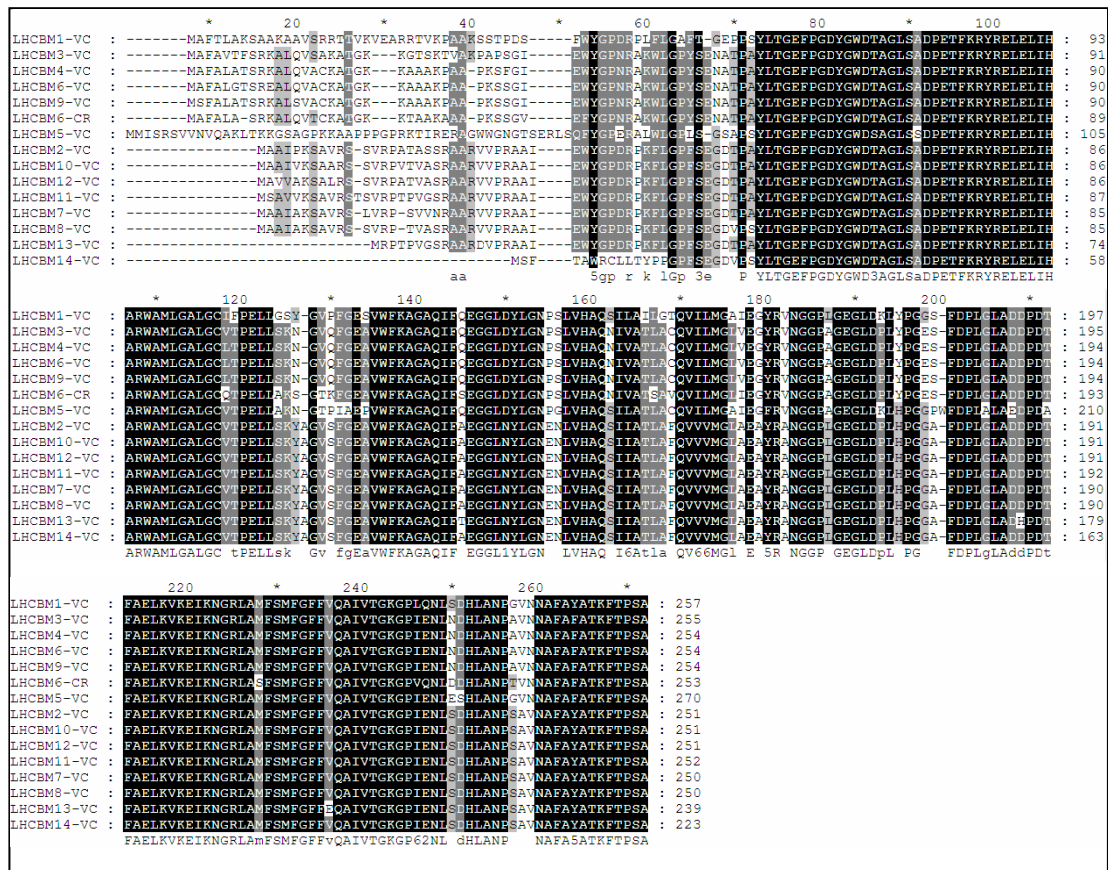


Abbildung 5-4: Sequenzvergleich der identifizierten LHCBM-Proteine aus *Volvox*.
 Die 14 LHCBM-Proteine wurden anhand eines Vergleichs der *Volvox*-EST-Datenbank von JGI mit den Sequenzen von LHCBM-Proteinen aus *Chlamydomonas* identifiziert. Der C-Terminus ist bei allen LHCBM-Proteinen konserviert und sie unterscheiden sich überwiegend im N-Terminus voneinander. Das *Alignment* dieser 14 Proteine aus *Volvox* (VC steht für *Volvox carteri*) und LHCBM6 von *Chlamydomonas* (CR steht für *Chlamydomonas reinhardtii*) wurde dargestellt. Die Informationen über Protein-ID, Lokalisation in *Volvox*-Genom und die EST-Unterstützung sind wie folgt: **LHCBM1** (Protein-ID: 73821, Lokalisation: Volca1/scaffold_10:1319806-1321354, EST: JGI_CBGW447); **LHCBM2** (Protein-ID: 109135, Lokalisation: Volca1/scaffold_24:1392184-1394017, EST: JGI_CBHO21422); **LHCBM3** (Protein-ID: 81675, Lokalisation: Volca1/scaffold_26:1196340-1198502, EST: JGI_CBGW389); **LHCBM4** (Protein-ID: 84135, Lokalisation: Volca1/scaffold_74:203610-205774, EST: JGI_CBHO29302); **LHCBM5** (Protein-ID: 110088, Lokalisation: Volca1/scaffold_95:179508-182328, EST: JGI_CBGW548); **LHCBM6** (Protein-ID: 84533, Lokalisation: Volca1/scaffold_98:298005-298647, EST: JGI_CBGZ17059); **LHCBM7** (Protein-ID: 77072, Lokalisation: Volca1/scaffold_60:204798-210095, EST: JGI_CBHA13191); **LHCBM8** (EST: JGI_CBGW445); **LHCBM9** (EST: JGI_CBHO29302); **LHCBM10** (Protein-ID: 81918, Lokalisation: Volca1/scaffold_31:196174-198031, EST: JGI_CBHO27231); **LHCBM11** (Protein-ID: 80470, Lokalisation: Volca1/scaffold_12:1325540-1327199, EST: JGI_CBGZ12971); **LHCBM12** (Protein-ID: 109843, Lokalisation: Volca1/scaffold_31:414915-416662, EST: JGI_CBGY548); **LHCBM13** (EST: JGI_CBGZ14110); **LHCBM14** (EST: JGI_CBGY542).

Im Gegensatz zu dem LHCBM5, das den längsten N-Terminus besitzt, sind die N-Termini von LHCBM13 und LHCBM14 die kürzesten. Die fünf LHCBM-Proteine, LHCBM1, LHCBM3, LHCBM4, LHCBM6 und LHCBM9 sind einander ähnlicher im Vergleich zur nächsten Gruppe bestehend aus LHCBM2, LHCBM7, LHCBM8, LHCBM10, LHCBM11, LHCBM12 (Abbildung 5-4).

GCTCTGGGCTGCATCTTCCCTGAGCTCCTGGGCTCTTA	LHCBM1-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGTA	LHCBM2-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGAA	LHCBM3-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGAA	LHCBM4-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTCGCCAAGAA	LHCBM5-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGAA	LHCBM6-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGTA	LHCBM7-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGTA	LHCBM8-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGAA	LHCBM9-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGTA	LHCBM10-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGTA	LHCBM11-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGTA	LHCBM12-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGTA	LHCBM13-Vc
GCTCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGTCCAAGTA	LHCBM14-Vc
GCCCTGGGCTGCCAGACCCCGAGCTGCTGGCCAAGAG	LHCBM6-Cr
GCCANACCAACCGC	CSDCS

Abbildung 5-5: Das CSDCS-Motiv in LHCBM-Genen von *Volvox*.

Die Aktivität der *LHCBM*-Gene wird durch NAB1 reguliert. Das NAB1 bindet an die mRNA von *LHCBM*-Genen innerhalb einer Konsensussequenz (CSDCS). Das *Alignment* dieser Konsensussequenzen von *LHCBM6* von *Chlamydomonas* und der *LHCBM*-Gene von *Volvox* zeigt eine hohe Übereinstimmung. Die markierten Bereiche zeigen die CSD-Konsensussequenz.

In vitro-Analysen konnten bereits zeigen, dass NAB1 von *Chlamydomonas* an *LHCBM6*-mRNA bindet und die Expression dieses Gens vermindert. Anhand einer mRNA-Konsensussequenz (CSDCS), die in den *LCHBM* Genen konserviert geblieben ist, bindet NAB1 an die mRNA der *LHCBM*-Gene, wodurch die Expression der *LHCBM*-Gene in *Chlamydomonas* vermindert wird. Dies geschieht durch Sequestrierung der mRNA in einen sub-polysomalen mRNP-Komplex (messenger ribonucleoprotein complex) und der Blockierung der Translation der *LHCBM*-Gene (Mussnug et al. 2005; Wobbe et al. 2008). Die Suche nach der Konsensussequenz in den *LHCBM*-Genen von *Volvox* anhand der Konsensussequenz von *Chlamydomonas* zeigte, dass diese in *LHCBM*-Gene von *Volvox* ebenfalls vorhanden ist. Diese Konsensussequenz liegt innerhalb des codierenden Bereiches und dessen Distanz zu Startcodon beträgt zwischen 187 bp beim *LHCBM1*-Gen bis zu 346 bp beim *LHCBM5*-Gen. Abbildung 5-5 zeigt das

Alignment zwischen dem *LHCBM6*-Gen von *Chlamydomonas* und den *LHCBM*-Genen von *Volvox* mit markierter Konsensussequenz.

5.3.3 Differenzielles Spleißen des *NABI*-Gens

In der *Volvox*-EST-Datenbank des JGI (<http://genome.jgi-psf.org/Volca1/Volca1.home.html>) wurden zwei cDNA-Sequenzen von *NABI*-Gen identifiziert (JGI_CBGZ22225.fwd und JGI_CBGZ19561.fwd), die auf differenzielles Spleißen dieses Genes hindeuteten. Das differenzielle Spleißen ist eine der wichtigsten regulatorischen Mechanismen der Zelle, bei dem durch unterschiedliche Spleißvarianten die Expression und die Aktivität von Genen reguliert werden kann (Sharp 2005; Xing und Lee 2006). Insgesamt konnten zwei Spleißvarianten für *NABI* gefunden werden. Während die erste Spleißvariante (NAB1V1) für NAB1 mit zwei RNA-Bindenden-Domänen (CSD und RRM) kodiert, führt die Retention des ersten Introns (das Intron wird als Exon gelesen) bei der Spleißvariante 2 (NAB1V2) zu einer kürzeren Variante ohne RRM-Domäne, da infolgedessen das offene Leseraster mit einem frühzeitigen Stopcodon beendet wird (Abbildung 5-6; Anhang 8.2).

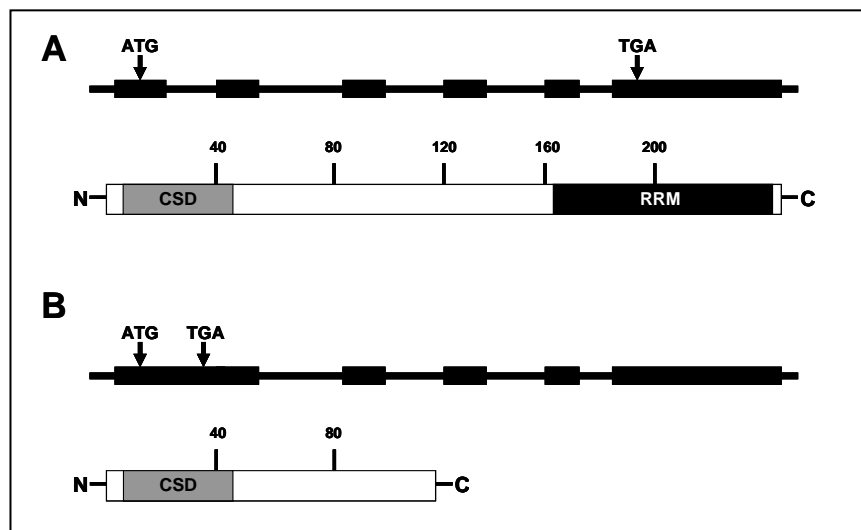


Abbildung 5-6: Der Struktur von *NABI*-Gen und *NABI*-Protein.

A. Dargestellt ist die Exon-Intron Struktur der ersten Spleißvariante von *NABI*-Gen. Das Gen besteht aus 6 Exons und 5 Introns. Die Struktur des Proteins mit zwei CSD- und RRM-Domänen ist ebenfalls gezeigt. **B.** Bei der zweiten Spleißvariante wird das erste Intron als Exon gelesen und das offene Leseraster endet mit einem frühzeitigen Stopcodon. Diese Variante kodiert für ein kleineres Protein, das nur die CSD-Domäne enthält. ATG, Startcodon; TGA, Stopcodon; N, N-Terminus; C, C-Terminus; Zahlen stehen für die Nummerierung der Aminosäurereste.

Die Länge des NAB1V2 beträgt 114 Aminosäuren, im Vergleich zu den 242 Aminosäuren langen NAB1V1. Außerdem ist die CSD-Domäne bei dem NAB1V2 in einigen Aminosäuren (Aminosäurereste 37 bis 45) verändert (Abbildung 5-7).

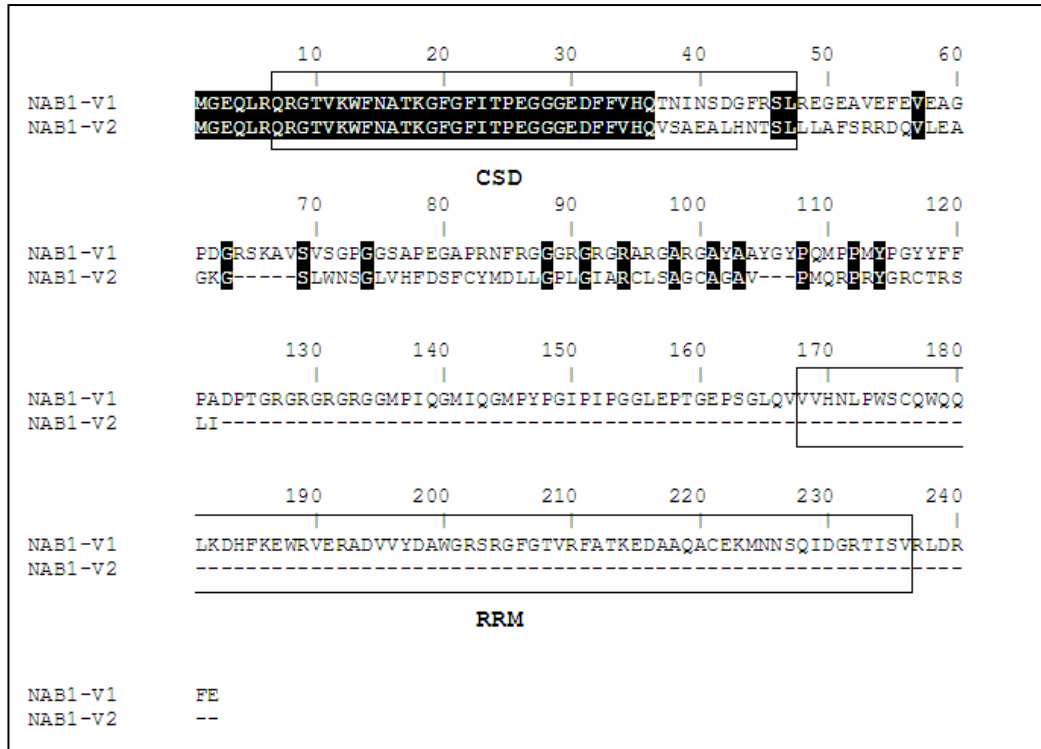


Abbildung 5-7: Alignment der NAB1-Spleißvarianten

Gezeigt sind in dieser Abbildung die Aminosäuresequenzen der beiden Spleißvarianten mit markierten CSD- und RRM- Domänen. Das NAB1V2 kodiert für ein kleineres Protein im Vergleich zum NAB1V1. Dieses Protein beinhaltet nur die CSD-Domäne mit einigen Veränderungen in der Aminosäuresequenz. Die Aminosäurereste 37 bis 45 sind bei dieser Variante umgetauscht worden.

5.3.4 Zelltypspezifische Expression des NABI-Gens

Im Rahmen der *Real Time* RT-PCR-Analysen im ersten Teil dieser Dissertation wurde das *NABI*-Gen als Gonidien-spezifisch kategorisiert (Nematollahi et al. 2006). Nach der Entdeckung der zweiten Spleißvariante, die für ein Protein mit nur einer CSD-Domäne kodierte, war die Untersuchung der Zelltyp-spezifischen Expression dieser Spleißvariante von großem Interesse. In *Volvox* hängt die Regulation der Photosynthese mit der Zelldifferenzierung zusammen (Kirk et al. 1999; Meissner et al. 1999). In diesem Zusammenhang könnte die Untersuchung der unterschiedlichen Expression der zwei Spleißvarianten eines RNA-bindenden Proteins wie NAB1 in beiden Zelltypen neue Hinweise diesbezüglich liefern.

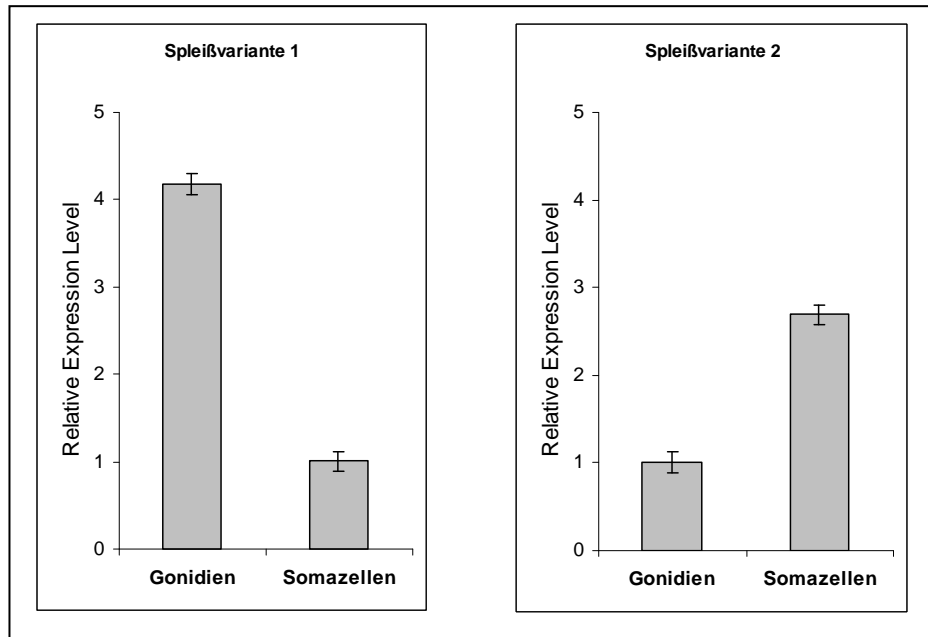


Abbildung 5-8: Die Expression der NABI-Spleißvarianten (NABIV1 und NABIV2) in Somazellen und Gonidien.

Die relative Expression der beiden Spleißvarianten wurde durch *Real Time* RT-PCR gemessen. Dafür wurden 300 ng mRNA eines jeden Zelltyps eingesetzt. Das *Aktin*-Gen wurde als Kontrolle verwendet. Rechts ist die Expression der Spleißvariante 1 in Gonidien im Vergleich zu Somazellen gezeigt, links ist die höhere Expression der zweiten Spleißvariante in Somazellen im Vergleich zu Gonidien dargestellt. Die Standardabweichung für drei Messungen ist gezeigt.

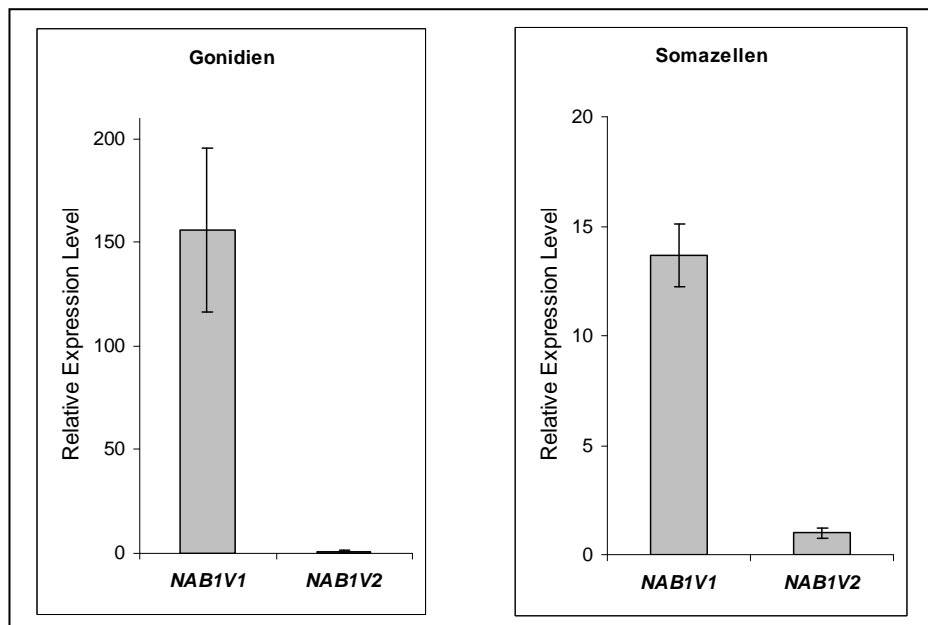


Abbildung 5-9: Die Expression des NABIV1 und NABIV2 im Vergleich zueinander in Gonidien und Somazellen.

Die Expression von NABIV1 im Vergleich zu NABIV2 ist in beiden Zelltypen, insbesondere in Gonidien stärker. Die Messung der Expression erfolgte mit Hilfe der *Real Time* RT-PCR-Analyse. Alle Messungen wurden in drei Parallelansätzen durchgeführt.

Für die Untersuchung der Zelltyp-spezifischen Expression des *NABI*-Gens wurden Gonidien und Somazellen (Weibchen-Stamm *Eve10*) vor der ersten Zellteilung voneinander getrennt und die Expression von beiden Spleißvarianten durch *Real Time* RT-PCR unter Verwendung des *Aktin*-Gens als Kontrolle gemessen. Die Messungen zeigten, dass die erste Spleißvariante wie bei der ersten Studie um den Faktor vier stärker in Gonidien im Vergleich zu Somazellen exprimiert wird. Interessanterweise wird die zweite Spleißvariante stärker in Somazellen (~Faktor 2,7) als in Gonidien exprimiert (Abbildung 5-8). Die relativen Expressionslevel beider Spleißvarianten zueinander zeigten, dass *NABIVI* in beiden Zelltypen stärker exprimiert wird (Abbildung 5-9), wobei dieser Expressionsunterschied in Gonidien viel stärker als in Somazellen ist.

5.3.5 *NABI*-Expression während des Lebenszyklus von *Volvox*

Zur Analyse der *NABI*-Funktion wurde die Expression der Spleißvariante 1 als auch der Spleißvariante 2 während des asexuellen Lebenszyklus von *Volvox* gemessen. Für diese Analyse wurden die *Volvox*-Kulturen (*Eve 10*-Stamm) in einem 8 Stunden Dunkel / 16 Stunden Licht-Rhythmus bei 28°C synchronisiert. Unter diesen Bedingungen beträgt der Lebenszyklus von *Volvox* 48 Stunden. Die Gesamt-RNA wurde zu folgenden Zeitpunkten isoliert: Nach der Freisetzung der jungen Tochterkolonien aus der Mutterkolonie (Punkt 1 und Punkt 2); kurz vor der ersten Zellteilung (Punkt 3); während der Zellteilung (Punkt 4); nach der Inversion (Punkt 5); in der Wachstumsphase (Punkt 6 bis Punkt 7) und nach der Freisetzung der jungen Tochterkolonien aus der Mutterkolonie (Punkt 8), was wiederum Punkt 1 entspricht (Abbildung 5-10).

Die Expression des *NABI*-Gens wurde mittels *Real Time* RT-PCR zu den erwähnten Zeitpunkten bestimmt. Alle Messungen wurden in drei Parallelansätzen durchgeführt. Als Referenz wurde das *Aktin*-Gen verwendet, welches während des Lebenszyklus von *Volvox* konstitutiv exprimiert wird (Cresnar et al. 1990) und in früheren Experimenten als Referenzgen verwendet wurde (Amon et al. 1998; Hallmann et al. 2001; Hallmann 2006b; Nematollahi et al. 2006). Die berechneten Expressionen für alle Zeitpunkte wurden in Relation zur Expression am Punkt 1 normalisiert. Die Expression des *NABIVI* nimmt nach der Freisetzung der Tochterkolonien ab (Punkt 2 und 3) und erreicht seinen

niedrigsten Wert während der Zellteilung (Punkt 4). In diesem Punkt ist die Expression des *NABIV1* im Vergleich zu Punkt 1 um den Faktor 100 reduziert. Die Expression nimmt am Ende der Inversion (Punkt 5) und während der folgenden Wachstumsphase (Punkt 6 und 7) zu, bis sie ihren höchsten Stand kurz vor der Freilassung der Tochterkolonien aus der Mutterkolonie erreicht. Das Expressionsniveau des *NABIV1* wurde zudem im sexuellen Lebenszyklus untersucht. Der sexuelle Lebenszyklus von *Volvox* wird durch ein 32 kDa großes Protein (Sex-Induktor) eingeschaltet und dient im Gegensatz zum asexuellen Lebenszyklus nicht nur als Fortpflanzungs- sondern auch als Überlebensstrategie in Stresssituationen (Kirk and Kirk 1986; Hallmann 2003). Die Algen wurden für diese Messung zum Zeitpunkt 1 mit Sex-Induktor induziert. Das Expressionsmuster des *NABIV1* im sexuellen Lebenszyklus ist bei den ersten drei gemessenen Punkten (Punkt 1, 2 und 3) identisch mit dessen Muster im vegetativen Lebenszyklus. In dieser Phase nimmt die Expression des *NABIV1* im sexuellen Lebenszyklus ab. Obwohl die höchste Expression des *NABIV1* im asexuellen Lebenszyklus zum Punkt 7 (kurz vor der Freisetzung der Tochterkolonien) lag, wird das *NABIV1* im sexuellen Lebenszyklus sehr stark am Ende der Inversion exprimiert (Punkt 5). Dieses Expressionslevel ist ~500% höher im Vergleich zum gleichen Punkt im asexuellen Lebenszyklus.

Die *Real Time* RT-PCR-Analyse des *NABIV2* während des asexuellen Lebenszyklus zeigte, dass die Expression dieser Variante nach der Freisetzung der Tochterkolonien trotz einer Senkung bei dem Punkt 2 relativ konstant bleibt. Jedoch nimmt sie während der Zellteilung (Punkt 4) um Faktor 10 ab und steigt wieder, wie bei der Spleißvariante 1, am Ende der Inversion (Punkt 5) und während des Wachstumsphase (Punkt 6) an. Bei der Freisetzung der Tochterkolonien (Punkt 7) erreicht die Expression fast das gleiche Niveau wie zu Punkt 1. Im sexuellen Lebenszyklus ähnelte das Expressionsmuster von *NABIV2* dem des asexuellen Lebenszyklus, allerdings mit einem starken Anstieg um 340 % am Ende der Inversion (Punkt 5; 20 Stunden nach der Induktion), was als Hinweis für die Beteiligung des *NABIV2* am sexuellen Lebenszyklus von *Volvox* gewertet werden kann (Abbildung 5-11). Die Expressionsmuster beider Spleißvarianten im asexuellen Lebenszyklus von *Volvox* sind zum Teil ähnlich. Beide Gene werden während der Zellteilung sehr schwach exprimiert und ihre Expression nimmt am Ende der Inversion zu. Im sexuellen Lebenszyklus in *Volvox* werden beide

Spießvarianten am Ende der Inversion (Punkt 5) viel stärker als im Vergleich zum asexuellen Lebenszyklus exprimiert.

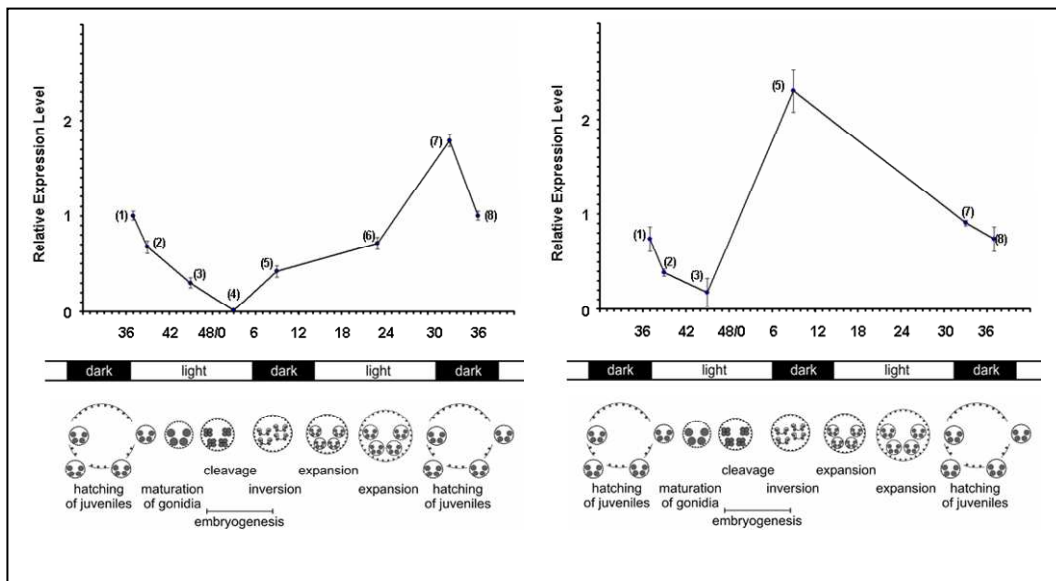


Abbildung 5-10: Das Expressionsmuster des NABI (Spießvariante 1) während des asexuellen und sexuellen Lebenszyklus von *Volvox*.

Die X-Achse zeigt den Lebenszyklus von *Volvox* über 48 Stunden. Die Stunde Null ist als Beginn der Zellteilung definiert und Stunde 36 ist der Zeitpunkt der Freisetzung der Tochterkolonien aus der Mutterkolonie. Unten ist die Licht-Dunkel-Phase im Lebenszyklus von *Volvox* schematisch dargestellt. **Links.** Die Expression des NABI während des asexuellen Lebenszyklus. **Rechts.** Nach der Zugabe von Sex-Induktor an Punkt 1 wurde die Expression des NABI im sexuellen Lebenszyklus von *Volvox* gemessen.

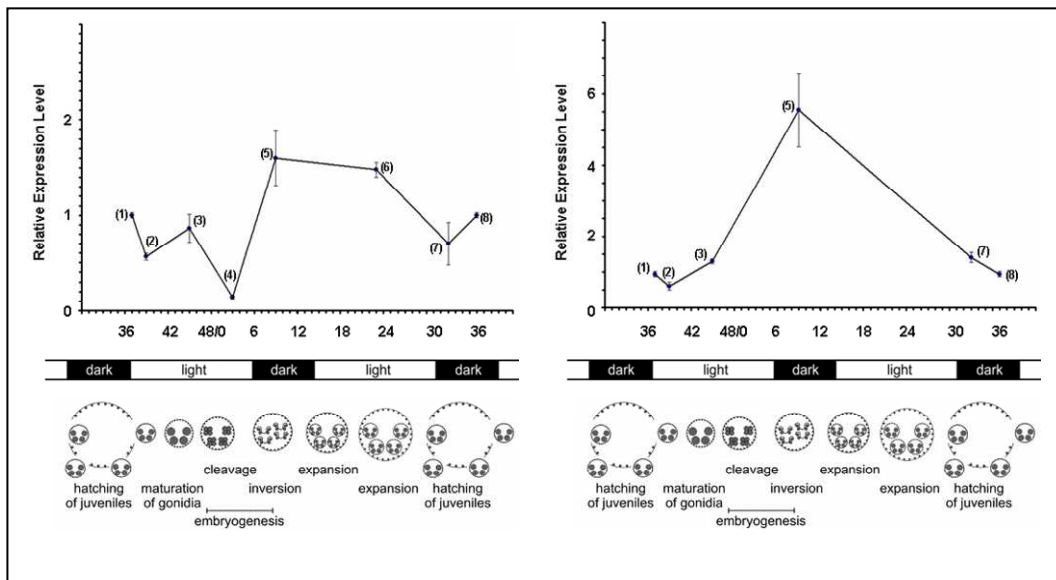


Abbildung 5-11: Das Expressionsmuster von NABI (Spießvariante 2) während des asexuellen und sexuellen Lebenszyklus von *Volvox*.

Links. Das Expressionsmuster von NABI (Spießvariante 2) im asexuellen Lebenszyklus wurde dargestellt. **Rechts.** Die Expression von NABI (Spießvariante 2) wird nach der Zugabe des Sex-Induktors zu den vegetativen Algen (Induktion) gemessen. Siehe auch Abbildung 5-10 für Details.

5.4 Diskussion

In den zwei unterschiedlichen Zelltypen von *Volvox* wird die Photosynthese wahrscheinlich auf verschiedene Art und Weise reguliert. Die große Gonidien besitzen große Chloroplasten, welche den höheren Energiebedarf dieser Zellen decken. Dagegen weisen die Somazellen im Vergleich zu Gonidien kleinere Chloroplasten auf. Die Untersuchung der Zelltyp-spezifischen Genexpression konnte bereit zeigen, dass die an der Photosynthese beteiligten Gene stärker in Gonidien als in Somazellen exprimiert werden, was auf eine unterschiedliche Regulation der Photosynthese in beiden Zelltypen hindeutet (Tam und Kirk 1991; Choi et al. 1996; Meissner et al. 1999; Nematollahi et al. 2006). Das RNA-bindende Protein NAB1 ist einer der Regulatoren der Photosynthese. Dieses Protein ist homolog zu zwei bekannten RNA-bindenden Proteinen, nämlich NAB1 aus *Chlamydomonas* und FRGY2 aus *Xenopus leavis*. Diese beiden Proteine führen zur Blockierung der Translation durch die Bindung an bestimmte mRNAs (Matsumoto et al. 1996; Matsumoto et al. 2003; Mussnug et al. 2005). Die Untersuchungen des FRGY2 konnten bereits zeigen, dass für die Bindung dieses Proteins eine CSD-Konsensussequenz in der mRNA des Zielgens notwendig ist (Manival et al. 2001). In *Chlamydomonas* bindet NAB1 an mRNA von *LHCBM*-Genen und führt durch die Blockierung der Translation zur verminderten Expression dieser Gene. Das Vorhandensein der CSD-Konsensussequenz in *LHCBM*-Genen von *Chlamydomonas* und *in vitro*-Untersuchungen weisen darauf hin, dass diese Konsensussequenz für die Bindung der Proteine mit einer CSD-Domäne wie NAB1 notwendig ist (Mussnug et al. 2005).

Das NAB1 Protein von *Volvox* beinhaltet neben einer CSD-Domäne eine RRM-Domäne. Neben der für die Bindung an *LHCBM*-mRNAs notwendigen CSD-Domäne ist die zweite RNA-Bindungsdomäne (RRM) wahrscheinlich wie bei FRGY2 für die Erhöhung der Bindungsspezifität und der Bindungsstabilität verantwortlich (Matsumoto et al. 1996; Manival et al. 2001). Die konservierte CSD-Domäne bei NAB1 von *Volvox* einerseits und die Tatsache, dass die *LHCBM*-Gene in *Volvox* eine CSD-Bindestelle beinhalten, andererseits, lässt vermuten, dass dieses Protein an der Expressionsregulation der *LHCBM*-Gene und dadurch an der Regulation der Photosynthese beteiligt ist. Durch die Suche im

Volvox-Genom konnte kein weiteres Protein mit einer CSD-Domäne gefunden werden und eine Southern-Blot-Analyse zeigte, dass nur eine Kopie von *NAB1* in *Volvox* vorhanden ist. Dies deutet darauf hin, dass NAB1 als einziges Protein mit einer CSD-Domäne nicht nur an *LHCBM*-Gene bindet, sondern möglicherweise an weitere Gene bzw. Genfamilien, die eine CSD-Konsensussequenz beinhalten.

In *Volvox* wird das *NAB1*-Gen differenziell gespleißt, was zur Kodierung zweier unterschiedlicher Proteine führt. Die erste Spleißvariante (NAB1V1) beinhaltet die beiden CSD- und RRM-Domänen, wohingegen die zweite Spleißvariante (NAB1V2) nur die CSD-Domäne besitzt. Da das Vorhandensein der CSD-Domäne für die spezifische Bindung an *LHCBM*-mRNA ausreichend ist (Mussgnug et al. 2005), sind beide NAB1-Varianten in der Lage, an *LHCBM*-mRNAs zu binden und deren Expression zu kontrollieren. Die CSD-Domäne von NAB1V2 unterscheidet sich in einigen Aminosäuren von NAB1V1. Dadurch ist möglicherweise die Bindungsspezifität bzw. Bindungsstärke der CSD-Domäne von NAB1V2 modifiziert, was die Regulation der *LHCBM*-Gene positiv oder negativ beeinflussen könnte.

Die Expressionsanalyse beider Spleißvarianten durch *Real Time* RT-PCR zeigt, dass die erste Variante stärker in Gonidien und die zweite Variante vermehrt in Somazellen exprimiert wird. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese beiden Spleißvarianten zellspezifische Funktionen besitzen. Da die photosynthetischen Aktivitäten in Somazellen im Vergleich zu Gonidien stark reduziert sind, könnte NAB1V2 an diesem Prozess beteiligt sein. Durch die Veränderung in der CSD-Domäne könnte die Bindungsspezifität dieser RNA-bindenden Domäne abgenommen haben. Dadurch kann dieses Protein in Somazellen an ein größeres Spektrum von mRNAs binden, die an der Photosynthese beteiligt sind, und deren Expression vermindern. Im Gegensatz dazu ist wahrscheinlich die Bindungsspezifität des NAB1V1 höher als die von NAB1V2 und deswegen bindet dieses Protein in erster Linie nur an bestimmte mRNAs der an der Photosynthese beteiligten Gene wie z.B. der *LHCBM*-Gene.

Die Funktion dieser beiden NAB1-Varianten ist übrigens in gewisser Hinsicht ähnlich zu REGA (somatic regenerator), einem Transkriptionsfaktor, der sehr stark in Somazellen exprimiert wird (Kirk et al. 1999; Nematollahi et al. 2006) und an Gene bindet, die an der Photosynthese beteiligt sind (Meissner et al. 1999; Duncan et al. 2006; Duncan et al. 2007). Interessanterweise befinden sich unter

den Zielgenen von REGA drei Gene, deren Aminosäuresequenz zu den Proteinen des Lichtsammelkomplexes (Photosystem I) ähnlich ist (Choi et al. 1996; Meissner et al. 1999). Im Gegensatz zu REGA, bindet NAB1 an mRNAs der beteiligten Gene des Photosystems II, nämlich *LHCBM*-Gene. Allerdings werden wahrscheinlich weitere Gene durch diese Proteine (NAB1 und REGA) reguliert, die noch nicht in diesem Zusammenhang untersucht worden sind. Es ist durchaus auch möglich, dass manche Gene durch beide Proteine (NAB1 und REGA) reguliert werden, besonders in Somazellen, wo die photosynthetische Aktivität im Vergleich zu Gonidien ganz niedrig ist.

Die Expressionsanalyse des *NAB1V1* im asexuellen Lebenszyklus von *Volvox* zeigt, dass die Expression dieses Gens während der Zellteilung stark abnimmt. Vergleicht man dieses Expressionslevel mit dem Expressionslevel von *NAB1V1* in Algen nach der Freisetzung der Tochterkolonien, beträgt der Expressionslevel nur 1%. Bei dem *NAB1V2* ist diese Abnahme ungefähr 90 % im Vergleich zu dem Expressionslevel der Algen nach dem Release. Die Expression beider Spleißvarianten steigt nach der Inversion bis zur Freisetzung der Tochterkolonien aus der Mutterkolonie. In dieser Zeit sind die Algen mit dem Wachstum beschäftigt, was mit der Erhöhung der Photosyntheseaktivität in der Zelle zusammenhängt, da mehr Energie benötigt wird. Dies ist wiederum ein Hinweis dafür, dass *NAB1* bei der Regulation der an der Photosynthese beteiligten Gene eine Rolle spielt. Die Expressionsmuster beider Spleißvarianten korreliert mit Untersuchungen von Tam und Kirk (1991), in der die Expression der an der Photosynthese beteiligten Gene nach der Embryogenese bzw. während der Wachstumsphase und Freisetzung der Tochterkolonien zunimmt (Tam und Kirk 1991). Im Vergleich zum asexuellen Lebenszyklus werden die beiden Spleißvarianten während des sexuellen Lebenszyklus vermehrt exprimiert, was auf deren potentielle Rolle im sexuellen Lebenszyklus hindeutet. Da das NAB1 das einzige Protein mit einer CSD-Domäne ist, könnte es nicht nur an die an der Photosynthese beteiligten Gene binden, sondern auch an andere Gene, die eine CSD-Konsensussequenz besitzen. Diese Gene können jedoch an anderen Prozessen wie z.B. der sexuellen Entwicklung und Zelldifferenzierung beteiligt sein.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass NAB1 durch zwei Spleißvarianten an der Zelltyp-spezifischen Regulation der Photosynthese beteiligt sein könnte.

Diese Regulation könnte durch unterschiedliche Bindungsspezifitäten beider Spleißvarianten und dadurch die Zelltyp-spezifische Regulation der *LHCBM*-Gene stattfinden. Die Untersuchung Zelltyp-spezifischer Expression der *LHCBM*-Gene könnte neue Erkenntnisse über diesen Zusammenhang liefern. Darüber hinaus könnte die Identifizierung weitere Ziel-mRNAs des NAB1 zur Aufklärung der Rolle dieses Proteins bezüglich des sexuellen Lebenszyklus oder der Zelldifferenzierung in *Volvox* beitragen.

6 Ausblick

Einerseits konnte die Anwendung der *Real Time* RT-PCR-Methode in dieser Arbeit zur Untersuchung der Zelltyp-spezifischen Genexpression und andererseits die Übereinstimmung der erzielten Ergebnisse mit früheren Studien zeigen, dass diese Methode für die Analyse der Zelltyp-spezifische Genexpression in *Volvox* geeignet ist. Weiterhin kann diese Methode zur Messung der Genexpression während des asexuellen und sexuellen Lebenszyklus von *Volvox* eingesetzt werden. Die Anwendung dieser Methode kann außerdem durch Analyse der Genexpression unter bestimmter Wachstumsbedingungen wie z.B. Stress, Mangel an bestimmten Nährelementen wie Stickstoff und Schwefel, sowie der Expressionsmessung bei der Mutanten bzw. Transformanten erweitert werden. Die Verwendung und Etablierung weiterer Referenzgene außer *Aktin*-Gen, was als Referenzgen in dieser Arbeit angewendet wurde, kann die Aussagekräftigkeit dieser Methode erhöhen. Zur Analyse der verminderten Genexpression bei RNAi-Transformanten wäre die Etablierung einer *Real Time* RT-PCR für die absolute Quantifizierung hilfreich.

Basierend auf den Ergebnissen der *Real Time* RT-PCR wurden drei Soma-spezifische Gene (*RBR1*, *CHR1* und *CHR2*) und ein Gonidien-spezifisches Gen (*NAB1*) zur weiteren Untersuchungen ausgewählt. Die Untersuchung des *RBR1*-Gens zeigt, dass dieses Gen möglicherweise an der Regulation der asymmetrischen Zellteilung beteiligt ist. Da dieses Gen nur in Weibchen gefunden wurde, soll im nächsten Schritt dessen Ortholog im Männchen identifiziert und charakterisiert werden. Nicht nur die *RB*-Gene sondern auch ihre Interaktionspartner könnten sich geschlechtsspezifisch entwickelt haben. Die Identifizierung dieser Gene zusammen mit dem Vergleich zwischen dem *RBR1* von Weibchen und dem eventuellen *RB*-Gen von Männchen könnten einen Beitrag zur Aufklärung der sexuellen Entwicklung in *Volvox* leisten.

Neben *RBR1* werden zwei weitere Gene (*CHR1* und *CHR2*) in Somazellen mehr als in Gonidien exprimiert. Außer der Beteiligung dieser beiden Gene an den lichtinduzierten Reaktionen in *Volvox*, wäre ihre Beteiligung an der Zelldifferenzierung durch zellspezifische Regulation der Proteinsynthese möglich.

Dies sollte durch weitere Untersuchungen wie z.B. Verminderung der Genaktivität anhand von RNAi-Knockdowns erforscht werden.

Ein weiterer Aspekt bezüglich der Zelldifferenzierung in *Volvox* ist die zellspezifische Regulation der Photosynthese. Die Untersuchung des Gonidien-spezifischen *NABI*-Gens deutet darauf hin, dass dieses Gen durch zwei Spleißvarianten mit unterschiedlicher zellspezifischen Lokalisation an der Regulation der Photosynthese beteiligt ist, was durch deren Bindung an *LHCBM*-Gene erfolgt. Darüber hinaus könnte die Zelltyp-spezifische Regulation der Photosynthese unter anderem durch die Zelltyp-spezifische Expression der *LHCBM*-Gene oder die Regulation weiterer an der Photosynthese beteiligter Gene durch *NABI* reguliert sein, was jedoch untersucht werden sollte.

7 Literatur

- Ach RA, Durfee T, Miller AB, Taranto P, Hanley-Bowdoin L, Zambryski PC, Gruissem W** (1997) RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol Cell Biol* **17**: 5077-5086
- Amann K** (2002) Identifizierung neuer regA-kontrollierter Gene bei der grünen Kugelalge *Volvox carteri*. Diplomarbeit. Universität Regensburg
- Amon P, Haas E, Sumper M** (1998) The sex-inducing pheromone and wounding trigger the same set of genes in the multicellular green alga *Volvox*. *Plant Cell* **10**: 781-789
- Armbrust EV, Ibrahim A, Goodenough UW** (1995) A mating type-linked mutation that disrupts the uniparental inheritance of chloroplast DNA also disrupts cell-size control in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell* **6**: 1807-1818
- Asamizu E, Miura K, Kucho K, Inoue Y, Fukuzawa H, Ohyama K, Nakamura Y, Tabata S** (2000) Generation of expressed sequence tags from low-CO₂ and high-CO₂ adapted cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *DNA Res* **7**: 305-307
- Ben-Porath I, Weinberg RA** (2004) When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* **113**: 8-13
- Ben-Porath I, Weinberg RA** (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 961-976
- Berthold P, Tsunoda SP, Ernst OP, Mages W, Gradmann D, Hegemann P** (2008) Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization. *Plant Cell* **20**: 1665-1677
- Bi A, Cui J, Ma YP, Olshevskaya E, Pu M, Dizhoor AM, Pan ZH** (2006) Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* **50**: 23-33
- Bieszke JA, Braun EL, Bean LE, Kang S, Natvig DO, Borkovich KA** (1999) The nop-1 gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8034-8039
- Binder BJ, Anderson DM** (1986) Green light-mediated photomorphogenesis in a dinoflagellate resting cyst. *Nature* **322**: 659-661

- Bisova K, Krylov DM, Umen JG** (2005) Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **137**: 475-491
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K** (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* **8**: 1263–1268
- Braun FJ, Hegemann P** (1999) Direct measurement of cytosolic calcium and pH in living *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Eur J Cell Biol* **78**: 199-208
- Brown VD, Gallie BL** (2002) The B-domain lysine patch of pRB is required for binding to large T antigen and release of E2F by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **22**: 1390-1401
- Bustin SA** (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**: 169-193
- Cheetham ME, Brion JP, Anderton BH** (1992) Human homologues of the bacterial heat-shock protein DnaJ are preferentially expressed in neurons. *Biochem J* **284**: 469-476
- Choi G, Przybylska M, Straus D** (1996) Three abundant germ line-specific transcripts in *Volvox carteri* encode photosynthetic proteins. *Curr Genet* **30**: 347-355
- Claudio PP, Tonini T, Giordano A** (2002) The retinoblastoma family: twins or distant cousins? *Genome Biol* **3**: 3012.1-3012.9
- Cooper DM** (2003) Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J* **375**: 517-529
- Cresnar B, Mages W, Müller K, Salbaum JM, Schmitt R** (1990) Structure and expression of a single actin gene in *Volvox carteri*. *Curr Genet* **18**: 337-346
- Dahiya A, Gavin MR, Luo RX, Dean DC** (2000) Role of the LXCXE binding site in Rb function. *Mol Cell Biol* **20**: 6799-6805
- Dannenbergh JH, van Rossum A, Schuijff L, te Riele H** (2000) Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev* **14**: 3051-3064
- Das SK, Hashimoto T, Shimizu K, Yoshida T, Sakai T, Sowa Y, Komoto A, Kanazawa K** (2005) Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Biochim Biophys Acta* **1726**: 328-335

- Davies JP, Yildiz FH, Grossman A** (1996) Sac1, a putative regulator that is critical for survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur deprivation. *EMBO J* **15**: 2150-2159
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, de Almeida Engler J, Ormenese S, Maes S, Naudts M, Van Der Schueren E, Jacqmard A, Engler G, Inzé D** (2002) Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J* **21**: 1360-1368
- Deininger W, Kröger P, Hegemann U, Lottspeich F, Hegemann P** (1995) Chlamyrodopsin represents a new type of sensory photoreceptor. *EMBO J* **14**: 5849-5858
- den Boer BG, Murray JAH** (2000) Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol* **10**: 245-250
- Dick FA** (2007) Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein - is the whole a sum of its parts? *Cell Div* **2**: 26
- Dick FA, Dyson N** (2003) pRB contains an E2F1 specific binding domain that allows E2F1 induced apoptosis to be regulated separately from other E2F activities. *Mol Cell* **12**: 639-649
- Diehn B, Feinleib M, Haupt W, Hildebrand E, Lenci F, Nultsch W** (1977) Terminology of behavioral responses of motile microorganisms. *Photochem Photobiol* **26**: 559-560
- Dinneny JR, Benfey PN** (2005) Stem cell research goes underground: the RETINOBLASTOMA-RELATED gene in root development. *Cell* **123**: 1180-1182
- Dunaief JL, Strober BE, Guha S, Khavari PA, Alin K, Luban J, Begemann M, Crabtree GR, Goff SP** (1994) The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* **79**: 119-130
- Duncan L, Nishii I, Harryman A, Buckley S, Howard A, Friedman NR, Miller SM** (2007) The VARL gene family and the evolutionary origins of the master cell-type regulatory gene, *regA*, in *Volvox carteri*. *J Mol Evol* **65**: 1-11
- Duncan L, Nishii I, Howard A, Kirk D, Miller SM** (2006) Orthologs and paralogs of *regA*, a master cell-type regulatory gene in *Volvox carteri*. *Curr Genet* **50**: 61-72
- Durfee T, Feiler HS, Gruissem W** (2000) Retinoblastoma-related proteins in plants: homologues or orthologues of their metazoan counterparts? *Plant Mol Biol* **43**: 635-642
- Durfee T, Mancini MA, Jones D, Elledge SJ, Lee WH** (1994) The amino-terminal region of the retinoblastoma gene product binds a novel nuclear

- matrix protein that co-localizes to centers for RNA processing. *J Cell Biol* **127**: 609-622
- Durinck S** (2008) Pre-processing of microarray data and analysis of differential expression. *Methods Mol Biol* **452**: 89-110
- Dyson N** (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**: 2245-2262
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E** (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**: 934-937
- Ebel C, Mariconti L, Gruissem W** (2004) Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature* **429**: 776-780
- Ebnet E, Fischer M, Deininger W, Hegemann P** (1999) Volvoxrhodopsin, a light-regulated sensory photoreceptor of the spheroidal green alga *Volvox carteri*. *Plant Cell* **11**: 1473-1484
- Elrad D, Grossman AR** (2004) A genome's-eye view of the light-harvesting polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* **45**: 61-75
- Elrad D, Niyogi KK, Grossman AR** (2002) A major light-harvesting polypeptide of photosystem II functions in thermal dissipation. *Plant Cell* **14**: 1801-1816
- Ernst OP, Sánchez Murcia PA, Daldrop P, Tsunoda SP, Kateriya S, Hegemann P** (2008) Photoactivation of channelrhodopsin. *J Biol Chem* **283**: 1637-1643
- Ertl H, Mengele R, Wenzl S, Engel J, Sumper M** (1989) The extracellular matrix of *Volvox carteri*: molecular structure of the cellular compartment. *J Cell Biol* **109**: 3493-3501
- Ewen ME, Faha B, Harlow E, Livingston DM** (1992) Interaction of p107 with cyclin A independent of complex formation with viral oncoproteins. *Science* **255**: 85-87
- Faha B, Ewen ME, Tsai LH, Livingston DM, Harlow E** (1992) Interaction between human cyclin A and adenovirus E1A-associated p107 protein. *Science* **255**: 87-90
- Fang SC, de los Reyes C, Umen JG** (2006) Cell size checkpoint control by the retinoblastoma tumor suppressor pathway. *PLoS Genet* **2**: e167
- Fang SC, Umen JG** (2008) A suppressor screen in *chlamydomonas* identifies novel components of the retinoblastoma tumor suppressor pathway. *Genetics* **178**: 1295-1310

- Ferreira R, Naguibneva I, Mathieu M, Ait-Si-Ali S, Robin P, Pritchard LL, Harel-Bellan A** (2001) Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb–E2F target promoter. *EMBO Rep* **2**: 794-799
- Ferris PJ** (1995) Localization of the *nic-7*, *ac-29* and *thi-10* genes within the mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **141**: 543-549
- Ferris PJ, Armbrust EV, Goodenough UW** (2002) Genetic structure of the mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **160**: 181-200
- Ferris PJ, Goodenough UW** (1994) The mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii* contains highly rearranged DNA sequences. *Cell* **76**: 1135-1145
- Ferris PJ, Pavlovic C, Fabry S, Goodenough UW** (1997) Rapid evolution of sex-related genes in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8634-8639
- Ferris PJ, Woessner JP, Goodenough UW** (1996) A sex recognition glycoprotein is encoded by the plus mating-type gene *fus1* of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Biol Cell* **7**: 1235-1248
- Flemington EK, Speck SH, Kaelin J WG** (1993) E2F-1 mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6914-6918
- Foster KW, Saranak J, Patel N, Zarilli G, Okabe M, Kline T, Nakanishi K** (1984) A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eucaryote *Chlamydomonas*. *Nature* **311**: 756-759
- Foster KW, Smyth RD** (1980) Light antennas in phototactic algae. *Microbiol Rev* **44**: 572-630
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP** (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**: 643-646
- Fung YK, Murphree AL, T'Ang A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF** (1987) Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* **236**: 1657-1661
- Genevaux P, Georgopoulos C, Kelley WL** (2007) The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol Microbiol* **66**: 840-857
- Gillham, NW** (1969) Uniparental inheritance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Am Nat* **103**: 355-388

- Gilman AG** (1990) Regulation of adenylyl cyclase by G proteins. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **24**: 51-57
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C** (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**: 386-401
- Gloeckner G, Beck CF** (1995) Genes involved in light control of sexual differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **141**: 937-943
- Govorunova EG, Jung KH, Sineshchekov OA, Spudich JL** (2004) *Chlamydomonas* sensory rhodopsins A and B: cellular content and role in photophobic responses. *Biophys J* **86**: 2342-2349
- Grafi G, Burnett RJ, Helentjaris T, Larkins BA, DeCaprio JA, Sellers WR, Kaelin WG** (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8962-8967
- Grossman AR, Lohr M, Im CS** (2004) *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annu Rev Genet* **38**: 119-173
- Gruber H, Kirzinger SH, Schmitt R** (1996) Expression of the *Volvox* gene encoding nitrate reductase: mutation-dependent activation of cryptic splice sites and intron-enhanced gene expression from a cDNA. *Plant Mol Biol* **31**: 1-12
- Guschina IA, Harwood JL** (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* **45**: 160-186
- Hallmann A** (2003) Extracellular matrix and sex-inducing pheromone in *Volvox*. *Int Rev Cytol* **227**: 131-182
- Hallmann A** (2006a) Morphogenesis in the family Volvocaceae: different tactics for turning an embryo right-side out. *Protist* **157**: 445-461
- Hallmann A** (2006b) The pherophorins: common, versatile building blocks in the evolution of extracellular matrix architecture in Volvocales. *Plant J* **45**: 292-307
- Hallmann A, Amon P, Godl K, Heitzer M, Sumper M** (2001) Transcriptional activation by the sexual pheromone and wounding: a new gene family from *Volvox* encoding modular proteins with (hydroxy)proline-rich and metalloproteinase homology domains. *Plant J* **26**: 583-593
- Hallmann A, Godl K, Wenzl S, Sumper M** (1998) The highly efficient sex-inducing pheromone system of *Volvox*. *Trends Microbiol* **6**: 185-189

- Han X, Boyden ES** (2007) Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PLoS ONE* **2**: e299
- Hand WG, Haupt W** (1971) Flagellar activity of the colony members of *Volvox aureus* Ehrbg. during light stimulation. *J Protozool* **18**: 361-364
- Harbour JW, Dean DC** (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**: 2393-2409
- Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC** (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**: 859-69
- Hegemann P** (1997) Vision in microalgae. *Planta* **203**: 265-274
- Hegemann P** (2008) Algal sensory photoreceptors. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 167-189
- Hegemann P, Tsunoda SP** (2007) Light Tools for neuroscience: Channelrhodopsin and light-activated enzymes. *Cellscience Reviews* **3**: 108-123
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM** (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 986-994
- Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA, Zemlin F, Beckmann E, Downing KH** (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* **213**: 899-929
- Hiebert SW, Chellappan SP, Horowitz JM, Nevins JR** (1992) The interaction of pRb with E2F inhibits the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev* **6**: 177-185
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R** (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* **11**: 1026-1030
- Holmes SJ** (1903) Phototaxis in *Volvox*. *Biol Bull* **4**: 319-326
- Hoops HJ** (1993) Flagellar, cellular and organismal polarity in *Volvox carteri*. *J Cell Sci* **104**: 105-117
- Hoops HJ** (1997) Motility in the colonial and multicellular Volvocales: structure, function, and evolution. *Protoplasma* **199**: 99-112
- Hoops HJ, Nishii I, Kirk DL** (2005) Cytoplasmic bridges in *Volvox* and its relatives. *Cell-cell channels*, Springer New York, 65-84

- Huang C, Hepler JR, Chen LT, Gilman AG, Anderson RGW, Mumby SM** (1997) Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Mol Biol Cell* **8**: 2365-2378
- Huntley R, Healy S, Freeman D, Lavender P, de Jager S, Greenwood J, Makker J, Walker E, Jackman M, Xie Q, Bannister AJ, Kouzarides T, Gutiérrez C, Doonan JH, Murray JA** (1998) The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during maize leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Molecular Biology* **37**: 155-169
- Ishizuka T, Kakuda M, Araki R, Yawo H** (2006) Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neurosci Res* **54**: 85-94
- Jansson S** (1994) The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1184**: 1-19
- Jurica MS, Moore MJ** (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell* **12**: 5-14
- Kargul J, Barber J** (2008) Photosynthetic acclimation: structural reorganisation of light harvesting antenna-role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll a/b binding proteins. *FEBS J* **275**: 1056-1068
- Kateriya S, Nagel G, Bamberg E, Hegemann P** (2004) Vision in single-celled algae. *News Physiol Sci* **19**: 133-137
- Khorana HG** (1993) Two light-transducing membrane proteins: bacteriorhodopsin and the mammalian rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1166-1171
- Kianianmomeni A, Nematollahi G, Hallmann A** (2008) A gender-specific retinoblastoma-related protein in *Volvox carteri* implies a role for the retinoblastoma protein family in sexual development. *Plant Cell* **20**: 2399-2419
- Kim E, Goren A, Ast G** (2008) Alternative splicing: current perspectives. *Bioessays* **30**: 38-47
- Kirk DL** (1988) The ontogeny and phylogeny of cellular differentiation in *Volvox*. *Trends Genet.* **4**: 32-36
- Kirk DL** (1997) The genetic program for germ-soma differentiation in *Volvox*. *Annu Rev Genet* **31**: 359-380
- Kirk DL** (1998) *Volvox*: Molecular-genetic origins of multicellularity and cellular differentiation. (Cambridge, UK: Cambridge University Press)
- Kirk DL** (2001) Germ-soma differentiation in *Volvox*. *Dev Biol* **238**: 213-223

- Kirk DL, Harper JF** (1986) Genetic, biochemical and molecular approaches to *Volvox* development and evolution. *Int Rev Cytol* **99**: 217-293
- Kirk DL, Kirk MM** (1983) Protein synthetic patterns during the asexual life cycle of *Volvox carteri*. *Dev Biol* **96**: 493-506
- Kirk MM, Kirk DL** (1985) Translational regulation of protein synthesis, in response to light, at a critical stage of *Volvox* development. *Cell* **41**: 419-428
- Kirk DL, Kirk MM** (1986) Heat shock elicits production of sexual inducer in *Volvox*. *Science* **231**: 51-54
- Kirk DL, Kirk MM** (2004) Exploring germ-soma differentiation in *Volvox*. *J Biosci* **29**: 143-152
- Kirk MM, Ransick A, McRae SE, Kirk DL** (1993) The relationship between cell size and cell fate in *Volvox carteri*. *J Cell Biol* **123**: 191-208
- Kirk MM, Stark K, Miller SM, Müller W, Taillon BE, Gruber H, Schmitt R, Kirk DL** (1999) *regA*, a *Volvox* gene that plays a central role in germ-soma differentiation, encodes a novel regulatory protein. *Development* **126**: 639-647
- Knudsen ES, Wang JY** (1996) Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J Biol Chem* **271**: 8313-8320
- Kochert G** (1975) Developmental mechanisms in *Volvox* reproduction. *Symp Soc Dev Biol* **33**: 55-90
- Korenjak M, and Brehm A** (2005) E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**: 520-527
- Kreimer G** (1994) Cell biology of phototaxis in agellated algae. *Int Rev Cytol* **148**: 229-310
- Lacy S, Whyte P** (1997) Identification of a p130 domain mediating interactions with cyclin A/cdk 2 and cyclin E/cdk 2 complexes. *Oncogene* **14**: 2395-2406
- Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY** (1987) Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* **235**: 1394-1399
- Lee JO, Russo AA, Pavletich NP** (1998) Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* **391**: 859-865

- Lee KY, Helbing CC, Choi KS, Johnston RN, Wang JH** (1997) Neuronal Cdc2-like kinase (Nclk) binds and phosphorylates the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* **272**: 5622-5626
- Lee MH, Kim B, Song SK, Heo JO, Yu NI, Lee SA, Kim M, Kim DG, Sohn SO, Lim CE, Chang KS, Lee MM, Lim J** (2008) Large-scale analysis of the GRAS gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **67**: 659-670
- Lendvai A, Pettkó-Szandtner A, Csordás-Tóth E, Miskolczi P, Horváth GV, Györgyey J, Dudits D** (2007) Dicot and monocot plants differ in retinoblastoma-related protein subfamilies. *J Exp Bot* **58**: 1663-1675
- Li X, Gutierrez DV, Hanson MG, Han J, Mark MD, Chiel H, Hegemann P, Landmesser LT, Herlitze S** (2005) Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 17816-17821
- Lundberg AS, Weinberg RA** (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18**: 753-761
- Mages HW, Tschochner H, Sumper M** (1988) The sexual inducer of *Volvox carteri*. Primary structure deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett* **234**: 407-410
- Manival X, Ghisolfi-Nieto L, Joseph G, Bouvet P, Erard M** (2001) RNA-binding strategies common to cold-shock domain- and RNA recognition motif-containing proteins. *Nucleic Acids Res* **29**: 2223-2233
- Matsumoto K, Meric F, Wolffe AP** (1996) Translational repression dependent on the interaction of the *Xenopus* Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition. *J Biol Chem* **271**: 22706-22712
- Matsumoto K, Tanaka KJ, Aoki K, Sameshima M, Tsujimoto M** (2003) Visualization of the reconstituted FRGY2-mRNA complexes by electron microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **306**: 53-58
- Meissner M, Stark K, Cresnar B, Kirk DL, Schmitt R** (1999) *Volvox* germline-specific genes that are putative targets of RegA repression encode chloroplast proteins. *Curr Genet* **36**: 363-370
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JA** (2002) Cell cycle regulated gene expression in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **44**: 41987-42002
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Maréchal-Drouard L, Marshall WF, Qu LH, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV,**

- Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen CL, Cognat V, Croft MT, Dent R, Dutcher S, Fernández E, Fukuzawa H, González-Ballester D, González-Halphen D, Hallmann A, Hanikenne M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral JP, Riaño-Pachón DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen CJ, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo Y, Martínez D, Ngau WC, Otilar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Grossman AR (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**: 245-250**
- Mitchell DR, Brown KS (1994)** Sequence analysis of the *Chlamydomonas* alpha and beta dynein heavy chain genes. *J Cell Sci* **107**: 635-644
- Mitchell DR, Brown KS (1997)** Sequence analysis of the *Chlamydomonas reinhardtii* flagellar alpha dynein gene. *Cell Motil Cytoskeleton* **37**: 120-126
- Mittnacht S (1998)** Control of pRB phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 21-27
- Mittnacht S (2005)** The retinoblastoma protein--from bench to bedside. *Eur J Cell Biol* **84**: 97-107
- Miura K, Yamano T, Yoshioka S, Kohinata T, Inoue Y, Taniguchi F, Asamizu E, Nakamura Y, Tabata S, Yamato KT (2004)** Expression profiling-based identification of CO₂-responsive genes regulated by CCM1 controlling a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **135**: 1595-1607
- Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM (2003)** Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med* **9**: 189-195
- Morris EJ, Dyson NJ (2001)** Retinoblastoma protein partners. *Advances in Cancer Research* **82**: 1-54
- Moulager M, Monnier A, Jesson B, Bouvet R, Mosser J, Schwartz C, Garnier L, Corellou F, Bouget FY (2007)** Light-dependent regulation of cell division in *Ostreococcus*: evidence for a major transcriptional input. *Plant Physiol* **144**: 1360-1369

- Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM** (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* **8**: 4099-4105
- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325
- Mussnug JH, Wobbe L, Elles I, Claus C, Hamilton M, Fink A, Kahmann U, Kapazoglou A, Mullineaux CW, Hippler M, Nickelsen J, Nixon PJ, Kruse O** (2005) NAB1 is an RNA binding protein involved in the light-regulated differential expression of the light-harvesting antenna of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **17**: 3409-3421
- Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A** (2005) Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* **15**: 2279-2284
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P** (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* **296**: 2395-2398
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E** (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 13940-13945
- Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A** (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J* **18**: 243-252
- Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D** (2006) The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* **31**: 137-155
- Narita M, Núñez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW** (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**: 703-716
- Nematollahi G, Kianianmomeni A, Hallmann A** (2006) Quantitative analysis of cell-type specific gene expression in the green alga *Volvox carteri*. *BMC Genomics* **7**: 321
- Neufeld TP, de la Cruz AF, Johnston LA, Edgar BA** (1998) Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* **93**: 1183-1193
- Nevins JR** (1998) Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ* **9**: 585-593

- Nicolas E, Ait-Si-Ali S, Trouche D** (2001) The histone deacetylase HDAC3 targets RbAp48 to the retinoblastoma protein. *Nucleic Acids Res* **29**: 3131-3136
- Oltmanns F** (1892) Über Phototaxis. *Z Botan* **9**: 257-338
- Park JW, Graveley BR** (2007) Complex alternative splicing. *Adv Exp Med Biol* **623**: 50-63
- Petracek ME, Konkel LM, Kable ML, Berman J** (1994) A *Chlamydomonas* protein that binds single-stranded G-strand telomere DNA. *EMBO J* **13**: 3648-3658
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Pommerville J, Kochert G** (1981) Changes in somatic cell structure during senescence of *Volvox carteri*. *Eur J Cell Biol* **24**: 236-243
- Pommerville J, Kochert G** (1982) Effects of senescence on somatic cell physiology in the green alga *Volvox carteri*. *Exp Cell Res* **140**: 39-45
- Provasoli L, Pintner IJ** (1959) Artificial media for freshwater algae: Problems and suggestions. In *The Ecology of Alga*, C.A. Tyron and R.T. Hartman, eds (Pittsburgh, PA: Pymatuning Laboratory of Field Biology, University of Pittsburgh), pp. 84-96
- Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L** (2006) The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2560-2570
- Ravina CG, Chang CI, Tsakraklides GP, McDermott JP, Vega JM, Leustek T, Gotor C, Davies JP** (2002) The sac mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* reveal transcriptional and posttranscriptional control of cysteine biosynthesis. *Plant Physiol* **130**: 2076-2084
- Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA, Dynlacht BD** (2002) E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints. *Genes Dev* **16**: 245-256
- Riley DJ, Liu CY, Lee WH** (1997) Mutations of N-terminal regions render the retinoblastoma protein insufficient for functions in development and tumor suppression. *Mol Cell Biol* **17**: 7342-7352
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP** (2000) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **25**: 338-342
- Rossi V, Varotto S** (2002) Insights into the G1/S transition in plants. *Planta* **215**: 345-356

- Rüffer U, Nultsch W** (1990) Flagellar photoresponses of *Chlamydomonas* cells held on micropipettes: I. Change in flagellar beat frequency. *Cell Motil Cytoskelet* **15**: 162-167
- Rüffer U, Nultsch W** (1991) Flagellar photoresponses of *Chlamydomonas* cells held on micropipettes: II. Change in flagellar beat pattern. *Cell Motil Cytoskelet* **18**: 269-278
- Sage J, Mulligan GJ, Attardi LD, Miller A, Chen S, Williams B, Theodorou E, Jacks T** (2000) Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev* **14**: 3037-3050
- Saghai-Marroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW** (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 8014-8018
- Sakaguchi H** (1979) Effect of external ionic environment on phototaxis of *Volvox carteri*. *Plant & Cell Physiol* **20**: 1643-1651
- Sakaguchi H, Iwasa K** (1979) Two photophobic responses in *Volvox carteri*. *Plant Cell Physiol* **20**: 909-916
- Sakaguchi H, Tawada K** (1977) Temperature effect on the photo-accumulation and phobic response of *Volvox aureus*. *J Protozool* **24**: 284-288
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO** (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470
- Schenk PM, Kazan K, Manners JM, Anderson JP, Simpson RS, Wilson IW, Somerville SC, Maclean DJ** (2003) Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol* **132**: 999-1010
- Schiedlmeier B, Schmitt R, Müller W, Kirk MM, Gruber H, Mages W, Kirk DL** (1994) Nuclear transformation of *Volvox carteri*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5080-5084
- Schmidt K** (2004) Gonidien- und somazell-spezifisch exprimierte Gene bei *Volvox carteri*. Diplomarbeit. Universität Regensburg
- Schmidt M, Gessner G, Luff M, Heiland I, Wagner V, Kaminski M, Geimer S, Eitzinger N, Reissenweber T, Voytsekh O, Fiedler M, Mittag M, Kreimer G** (2006) Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas*

- reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements. *Plant Cell* **18**: 1908-1930
- Schmitt R** (2003) Differentiation of germinal and somatic cells in *Volvox carteri*. *Curr Opin Microbiol* **6**: 608-613
- Sefton BM** (2001) Overview of protein phosphorylation. *Curr Protoc Cell Biol*. Chapter **14**: Unit 14.1
- Sessoms AH, Huskey RJ** (1973) Genetic control of development in *Volvox*: isolation and characterization of morphogenetic mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 1335-1338
- Sharp PA** (2005) The discovery of split genes and RNA splicing. *Trends Biochem Sci* **30**: 279-281
- Shen WH** (2002) The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci* **7**: 505-511
- Sherr CJ** (1996) Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672-1677
- Shi L, Jung YJ, Tyagi S, Gennaro ML, North RJ** (2003) Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 241-246
- Sineshchekov OA, Jung KH, Spudich JL** (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8689-8694
- Spudich JL, Yang CS, Jung KH, Spudich EN** (2000) Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 365-392
- Stals H, Inzé D** (2001) When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci* **6**: 359-364
- Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H** (2005) Function of alternative splicing. *Gene* **344**: 1-20
- Starr RC** (1969) Structure, reproduction, and differentiation in *Volvox carteri* f. *nagariensis* Iyengar, strains HK9 and 10. *Arch Protistenk* **111**: 204-222
- Starr RC** (1970) Control of differentiation in *Volvox*. *Symp Soc Dev Biol* **29**: 59-100
- Starr RC, Jaenicke L** (1974) Purification and characterization of the hormone initiating sexual morphogenesis in *Volvox carteri* f. *nagariensis* Iyengar. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 1050-1054

- Stauber EJ, Fink A, Markert C, Kruse O, Johanningmeier U, Hippler M** (2003) Proteomics of *Chlamydomonas reinhardtii* light-harvesting proteins. *Eukaryot Cell* **2**: 978-994
- Steele-Perkins G, Fang W, Yang XH, Van Gele M, Carling T, Gu J, Buyse IM, Fletcher JA, Liu J, Bronson R, Chadwick RB, de la Chapelle A, Zhang X, Speleman F, Huang S** (2001) Tumor formation and inactivation of RIZ1, an Rb-binding member of a nuclear proteinmethyltransferase superfamily. *Genes Dev* **15**: 2250-2262
- Sterner JM, Murata Y, Kim HG, Kennett SB, Templeton DJ, Horowitz JM** (1995) Detection of a novel cell cycleregulated kinase activity that associates with the amino terminus of the retinoblastoma protein in G2/M phases. *J Biol Chem* **270**: 9281-9288
- Sumper M, Hallmann A** (1998) Biochemistry of the extracellular matrix of *Volvox*. *Int Rev Cytol* **180**: 51-85
- Suzuki T, Yamasaki K, Fujita S, Oda K, Iseki M, Yoshida K, Watanabe M, Daiyasu H, Toh H, Asamizu E, Tabata S, Miura K, Fukuzawa H, Nakamura S, and Takahashi T** (2003) Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization. *Biochem Biophys Res Commun* **301**: 711-717
- Tam LW, Kirk DL** (1991) Identification of cell-type-specific genes of *Volvox carteri* and characterization of their expression during the asexual life cycle. *Dev Biol* **145**: 51-66
- Tam LW, Stamer KA, Kirk DL** (1991) Early and late gene expression programs in developing somatic cells of *Volvox carteri*. *Dev Biol* **145**: 67-76
- Taya Y** (1997) RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem Sci* **22**: 14-17
- Trimarchi JM, Lees JA** (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 11-20
- Tschochner H, Lottspeich F, Sumper M** (1987) The sexual inducer of *Volvox carteri*: Purification, chemical characterization and identification of its gene. *EMBO J* **6**: 2203-2207
- Umen JG, Goodenough UW** (2001) Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in *Chlamydomonas*. *Genes Dev* **15**: 1652-1661
- van Nocker S, Walker JM, Vierstra RD** (1996) The *Arabidopsis thaliana* UBC7/13/14 genes encode a family of multiubiquitin chainforming E2 enzymes. *J Biol Chem* **271**: 12150-12158

- Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouzé P, Rombauts S, Inzé D** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 903-916
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM** (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* **44**: 619-626
- Viamontes GI, Fochtmann LJ, Kirk DL** (1979) Morphogenesis in *Volvox*: analysis of critical variables. *Cell* **17**: 537-550
- Viamontes GI, Kirk DL** (1977) Cell shape changes and the mechanism of inversion in *Volvox*. *J Cell Biol* **75**: 719-730
- Walther Z, Vashishtha M, Hall JL** (1994) The *Chlamydomonas* FLA10 gene encodes a novel kinesin-homologous protein. *J Cell Biol* **126**: 175-188
- Weinberg RA** (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**: 323-330
- Weissig H, Beck CF** (1991) Action Spectrum for the Light-Dependent Step in Gametic Differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **97**: 118-121
- Wenzl S, Thym D, Sumper M** (1984) Development-dependent modification of the extracellular matrix by a sulphated glycoprotein in *Volvox carteri*. *EMBO J* **3**: 739-744
- Wilkinson MF** (2005) A new function for nonsense-mediated mRNA-decay factors. *Trends Genet* **21**: 143-148
- Wobbe L, Schwarz C, Nickelsen J, Kruse O** (2008) Translational control of photosynthetic gene expression in phototrophic eukaryotes. *Physiol Plant* **133**: 507-515
- Xie Q, Sanz-Burgos AP, Hannon GJ, Gutiérrez C** (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J* **15**: 4900-4908
- Xing Y, Lee C** (2006) Alternative splicing and RNA selection pressure--evolutionary consequences for eukaryotic genomes. *Nat Rev Genet* **7**: 499-509
- Zacks DN, Spudich JL** (1994) Gain setting in *Chlamydomonas reinhardtii*: mechanism of phototaxis and the role of the photophobic response. *Cell Motil Cytoskeleton* **29**: 225-230
- Zhang F, Wang LP, Boyden ES, Deisseroth K** (2006) Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods* **3**: 785-792

Zhang F, Wang LP, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, Wood PG, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A, Deisseroth K (2007) Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* **446**: 633-639

Zhou Q, Zhang T, Xu W, Yu L, Yi Y, Zhang Z (2008) Analysis of four achaete-scute homologs in *Bombyx mori* reveals new viewpoints of the evolution and functions of this gene family. *BMC Genet* **9**: 24

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
cDNA	Complementary DNA
CSD	Cold Shock Domain
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed sequence tag
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
Kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mM	Millimol
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RRM	RNA Recognition Motif
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleotid-Protein
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde(n)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8.2 *NABI*-Sequenz

Die Sequenz von *NABI*-Gen von *Volvox* mit markierter Intron-Exon-Struktur und Aminosäuresequenz beider Spleißvarianten

```

      10      20      30      40      50      60
5' AGGCGCTTGAGAAGAAGGCATTACTGGAGCGCGCAGCCCTCGAGAATGCCGTCAACACTG
  R R L R R R H Y W S A Q P S R M P S T L
  G A * E E G I T G A R S P R E C R Q H *
  A L E K K A L L E R A A L E N A V N T E

      70      80      90      100     110     120
AGCGCCAGGCGCTCGAAAGCACTGCGGCGGCTGAACGGGCGGCCCTTGGAGCGCAGCACGA
  S A R R S K A L R R L N G R P W S A A R
  A P G A R K H C G G * T G G L G A Q H D
  R Q A L E S T A A A E R A A L E R S T T

      130     140     150     160     170     180
CCAAGCGGCTCAAGGAGATGGAGGCGGCAGCGACACGGCTTGCGGATGAAGCTCGTATAAA
  P S G S R R W R R Q R H G L R M K L V *
  Q A A Q G D G G G S D T A C G * S S Y K
  K R L K E M E A A A T R L A D E A R I K

      190     200     210     220     230     240
AGTGGGCTGAGGAGCGGGCGGGCGGAGGGCGTGTGGGCTGACCGGATGGCGGAGCTGG
  S G L R S G R R R R A C G L T G W R S W
  V G * G A G G G G G R V G * P D G G A G
  W A E E R A A A E G V W A D R M A E L E

      250     260     270     280     290     300
AGGCTAAGTATCGCAAGAAGCTGGGTGCGTGGTCTTGGAGCGTAATCCAGGATGGGAGAG
  R L S I A R S W V R G L G A * S R M G E
  G * V S Q E A G C V V L E R N P G W E S
  A K Y R K K L G A W S W S V I Q D G R V

      310     320     330     340     350     360
TTTCGGTAGGGATGGATTTTAAATTTTCAGCGTGCAGCGTGCTTGAGATCCTTTCGACTT
  F R * G W I L N F Q R A A C L R S F R L
  F G R D G F * I F S V Q R A * D P F D F
  S V G M D F K F S A C S V L E I L S T S

      370     380     390     400     410     420
CAGGACGTTTTGCATGATCGTGGGAAGGGGAAGGGCAACCACGGAGAACGATGCGTCCCGC
  Q D V C M I V G R G R A T T E N D A S R
  R T F A * S W E G E G Q P R R T M R P A
  G R L H D R G K G K G N H G E R C V P Q

      430     440     450     460     470     480
AAGGGCTTGTTTTAATTAACATCATGCCGGTCCCTTCGCCCTCCATTGCGCCTCTGTC
  K G L F N * L P S C R S F A L H C A S V
  R A C L I N Y H H A G P S P S I A P L S
  G L V * L T T I M P V L R P P L R L C P

```

490 500 510 520 530 540
CGTGGGCGCTTCATCGATGTCAGTCTTGCTACTGACTGACCCCTGTGTTCCCCCTTGCC
R G R F I D V S L A T D * P P V F P L A
V G A S S M S V L L L T D P L C S P L P
W A L H R C Q S C Y * L T P C V P P C P

550 560 570 580 590 600
CCCTCCGCGCTTCCTTAATCCCCCACTTGCTGCAGAGGACCTCAAGCGCAAGGCCGCTT
P S A A S L I P H L L Q R T S S A R P L
P P P L P * S P T C C R G P Q A Q G R F
L R R F L N P P L A A E D L K R K A A S

610 620 630 640 650 660
CTCGGGAGCTGGAAATTGACAACCACTGGAAGGAACGTCTGGACGAGCTGACCAACAAGT
L G S W K L T T S G R N V W T S * P T S
S G A G N * Q P V E G T S G R A D Q Q V
R E L E I D N Q W K E R L D E L T N K S

670 680 690 700 710 720
CCCTCGCGGAGCGAGAGCTCATCGCCGCTCGTGGAAACAGCAGGCTAGCGGCAGCCCAGG
P S R S E S S S P P R G T A G * R Q P R
P R G A R A H R R L V E Q Q A S G S P G
L A E R E L I A A S W N S R L A A A Q E

730 740 750 760 770 780
AGGAGGCCGCTGCACGCTACCGGGCCCTGCAGGTGCGATGGCGGGCAGTAGTCCCCTAGC
R R P L H A T G P C R C D G G Q * S R T
G G R C T L P G P A G A M A G S S P V R
E A A A R Y R A L Q V R W R A V V P Y G

790 800 810 820 830 840
GGGTTACACTGTGCTAGCTGCGGGAAGGCGCAATTGGCCCATAGCTGAGCGAGCGTGTGCT
G L H C Q L R E G A I G P * L S E R V A
G Y T V S C G K A Q L A H S * A S V L L
V T L S A A G R R N W P I A E R A C C S

850 860 870 880 890 900
CCGGCAGTAAGGGAGTTGCTAGCTCCCCGTTGCCGTGGGCTACCTGATAGGCCCTTGCCAGGC
P A V R E L Q L P L P W A T * * A L P G
R Q * G S C S S R C R G L P D R P C Q A
G S K G V A A P V A V G Y L I G L A R R

910 920 930 940 950 960
GGCCTTGCACTGCACGGTGTAGCCCCACCGGCGCGCTTTTGGGGCTACCATGGCCGCCGG
G L A L H G V A P P A R F W G Y H G R R
A L H C T V * P H R R A F G A T M A A G
P C T A R C S P T G A L L G L P W P P V

970 980 990 1000 1010 1020
TTGCACGTGGCTGGTACGAGTGTGTGGACGGTGGCGGCAGTGTCTGAGTTCTTGTGG
L H V A G T S V W T V R R Q C P E F L W
C T W L V R V C G R C G G S V L S S C G
A R G W Y E C V D G A A A V S * V L V A

1030 1040 1050 1060 1070 1080
CTTGTGGCGCTGGGTGCATGCAGGAGGAGCTGGATGCCAAGGTGGCCGCCATCAGTAGCC
L V A L G A C R R S W M P R W P P S V A
L W R W V H A G G A G C Q G G R H Q * P
C G A G C M Q E E L D A K V A A I S S R

1090 1100 1110 1120 1130 1140
GGCTGGCGGACATGGCAGGGAAAGAGGGCCGGCGGGAGGTGCAGCGAGGCCAACTAACGC
G W R T W Q G K R A G G R C S E A N * R
A G G H G R E R G P A G G A A R R T N A
L A D M A G K E G R R E V Q R G E L T R

1150 1160 1170 1180 1190 1200
GCCAGGTGAGCTGGGGGAAGCAAAGAGCGAGGAAAGGGCGGTGGATTGTCTTTGCAAAGC
A R * A G G S K E R G K G G G L S L Q S
P G E L G E A K S E E R A V D C L C K A
Q V S W G K Q R A R K G R W I V F A K P

1210 1220 1230 1240 1250 1260
CATCGCCAGTGACGGAATCATGGAACGGGGTAGGGACGGGGGTTTCATCATGCAAAGTGGA
H R Q * R N H G T G * G R G F I M Q S G
I A S D G I M E R G R D G G S S C K V E
S P V T E S W N G V G T G V H H A K W K

1270 1280 1290 1300 1310 1320
AGTTATGGCAGTTTTGCCTTTGTTTCACATGACAGCACACATGACAGCAATGGCCAGATGG
S Y G S F A F V H M T A H M T A M A R W
V M A V L P L F T * Q H T * Q Q W P D G
L W Q F C L C S H D S T H D S N G Q M G

1330 1340 1350 1360 1370 1380
GTAAGTCAACTGGTCCATATCGGTGTTACAATGGCCTCTTTGCGTGTAAAGTTTGAGTTG
V S Q L V H I G V T M A S L R V K F E L
* V N W S I S V L Q W P L C V L S L S C
K S T G P Y R C Y N G L F A C * V * V A

1390 1400 1410 1420 1430 1440
CAGTACAGTGTATGCGTACAGTGAACCTGTCAAAGCCCTGAATGCAAGCGGGTGATGCA
Q Y S V M R T V N L S K P * M Q A G D A
S T V L C V Q * T C Q S P E C K R V M H
V Q C Y A Y S E P V K A L N A S G * C T

1450 1460 1470 1480 1490 1500
CCCACTCATCTTGCTAGCCCCGAATCGGCGGGGTTACCATTACTGATAGATCTATCCATC
P T H L A S P N R R R L P L L I D L S I
P L I L L A R I G G G Y H Y * * I Y P S
H S S C * P E S A A V T I T D R S I H P

1510 1520 1530 1540 1550 1560
CGTGGATTGCGCGGTATACTGTGTTTCGCAGCTGGAGGAGCTTCAGGCCCTACACGAAGCG
R G L R G I L C S Q L E E L Q A L H E A
V D C A V Y C V R S W R S F R P Y T K R
W I A R Y T V F A A G G A S G P T R S G

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GAGACCCGGCGGCGTGCAGAGCTGGAGCGGGCACTGCGTGACGCGGCGGCCATGTTCAAG
E T R R R A E L E R A L R D A A A M F K
R P G G V Q S W S G H C V T R R P C S R
D P A A C R A G A G T A * R G G H V Q G

1630 1640 1650 1660 1670 1680
GCCGAGCTGTACGAGAAACAGGTATGATGGCCACCCTACCGGGATTGCACTTTGCGGGTT
A E L Y E K Q V * W P P Y R D C T L R V
P S C T R N R Y D G H P T G I A L C G F
R A V R E T G M M A T L P G L H F A G L

1690 1700 1710 1720 1730 1740
TGCCTACCCGCTTGCATGCCACATGTGCGGTGTTCTGTGCTTGACAGCCGCCCTCATT
C L P A L H A T C A V F C A C S R R L I
A Y P P C M P H V R C S V L A A A A S F
P T R L A C H M C G V L C L Q P P P H S

1750 1760 1770 1780 1790 1800
CATGCTGAAGGGGGCCTCGCCAATCCATGCTATCACGGGCGCCCTCCGTCCCCTGCATCA
H A E G G L A N P C Y H G R P P S P A S
M L K G A S P I H A I T G A L R P L H H
C * R G P R Q S M L S R A P S V P C I I

1810 1820 1830 1840 1850 1860
TTTCCCCTCGCACCCTAACTTTCCAACACGGTACACGCACCCGGACTACTTGTGTTTGC
F P T R T V T F Q H G T R T R T T C V C
F P L A P * L S N T V H A P G L L V F A
S H S H R N F P T R Y T H P D Y L C L R

1870 1880 1890 1900 1910 1920
GCAGGCGCAGCTAGACGCGGCTACCGGGACGCTCGCATCCTGCGGCAGCATCTCGCAGC
A G A A R R G L P G R S H P A A A S R S
Q A Q L D A A Y R D A R I L R Q H L A A
R R S * T R P T G T L A S C G S I S Q R

1930 1940 1950 1960 1970 1980
GCATAACGTTAACTTGCCCTCCCCACGACCCGGACGCTCCAAAGGGACTGCGACCCGGCGA
A * R * L A L P T T R T L Q R D C D R R
H N V N L P S P R P G R S K G T A T G E
I T L T C P P H D P D A P K G L R P A S

1990 2000 2010 2020 2030 2040
GTCTTCCCCCAAGGTAAGGATAGTGCTCTAGAGGATAGTCTGAAGAAGCTGTGGGCTTCA
V F P Q G K D S A L E D S L K K L W A S
S S P K V R I V L * R I V * R S C G L Q
L P P R * G * C S R G * S E E A V G F R

2050 2060 2070 2080 2090 2100
GGATAAGGCATATGGTCTACCTGGCGGGCTCAATCCTGCTCAACGTTGTGGTAAATTTG
G * G I W S T W R G S I L L N V V V N L
D K A Y G L P G G A Q S C S T L W * I C
I R H M V Y L A G L N P A Q R C G K F A

2110 2120 2130 2140 2150 2160
CACCCACACTAGGCGCATTCTGTCTAGCGCCTTGCGTGCTAAAACTACAGTTCGGTGAC
H P H * A H S C L A P C V L K L Q F G D
T H T R R I P V * R L A C * N Y S S V T
P T L G A F L S S A L R A K T T V R * R

2170 2180 2190 2200 2210 2220
GTCCATTGCTGTACTTGACGCTGGGCGCTTTATCATTGGATTTTTTGCCTCCCAGGTGCC
V H C C T * R W A L Y H W I F C L P G A
S I A V L D A G R F I I G F F A S Q V P
P L L Y L T L G A L S L D F L P P R C H

-----ON15043-----> 2250 2260 2270 2280
ATCCGTGGATATGGAAGGTATTGCCTTATCACCGCCTCCGGCGGCTGGTTACTACTTTC
I R G Y G R Y C L I T A S G G W L L H F
S V D M E G I A L S P P P A A G Y Y T S
P W I W K V L P Y H R L R R L V T T L R

2290 2300 2310 2320 2330 2340
GGGATCTGGGGCTAGCCCCGCGGACGGCCAGCGTGGCTACCCCCCTCGGAACTGGACGCCGA
G I W G * P A D G Q R G Y P L G T G R R
G S G A S P R T A S V A T P S E L D A E
D L G L A R G R P A W L P P R N W T P K

2350 2360 2370 2380 2390 2400
AGTCACTGCGCTACGGGCAGCCAGGGCGGAGTATCAACGGTCAATTACCGCCGCCAAGA
S H C A T G S Q G G V S T V N Y R R P R
V T A L R A A R A E Y Q R S I T A A Q D
S L R Y G Q P G R S I N G Q L P P P K M

2410 2420 2430 2440 2450 2460
TGCGCGCAACGCTCTACTTGACCGATCAGAGGTGGGCTCTACGTGAGGCCACGTGCAGTT
C A Q R S T * P I R G G L Y V R P R A V
A R N A L L D R S E V G S T * G H V Q F
R A T L Y L T D Q R W A L R E A T C S L

2470 2480 2490 2500 2510 2520
TGCCAGCTATGGAATTGCGTGCGCGGGTTGCCAGGAGGAAATGCCATGACCTTCATTCTC
C Q L W N C V R G L P G G N A M T F I L
A S Y G I A C A G C Q E E M P * P S F S
P A M E L R A R V A R R K C H D L H S L

2530 2540 2550 2560 2570 2580
TGCTATCTTGTCTTACTCCCACAATTGAGAATACTCCCGCATGTACTTGTGTAACGGGCA
C Y L V L L P Q L R I L P H V L V * R A
A I L S Y S H N * E Y S R M Y L C N G Q
L S C L T P T I E N T P A C T C V T G R

2590 2600 2610 2620 2630 2640
GGTAAACCCTTTACGCTGACAGGTTGCGGAGCAGCGGAGCTACAGCGCTTGTGCAAGCC
G K P F H A D R F A S S G A T A L V Q A
V N P F T L T G S R A A E L Q R L C K P
* T L S R * Q V R E Q R S Y S A C A S P

2650 2660 2670 2680 2690 2700
CAGCGCTCAACCGACAAGCTCGCAGCTCTGGGCGAGGAACTAACAGCAGAGCTGCCAAGT
Q R S T D K L A A L G E E L T A E L P S
S A Q P T S S Q L W A R N * Q Q S C Q V
A L N R Q A R S S G R G T N S R A A K Y

2710 2720 2730 2740 2750 2760
ACATCGGCAGGTATATGCCTATGCCATGCTTAGTGTATCGCGCTGTGCCTCCTGCTCTAA
T S A G I C L C H A * C I A L C L L L *
H R Q V Y A Y A M L S V S R C A S C S N
I G R Y M P M P C L V Y R A V P P A L T

2770 2780 2790 2800 2810 2820
CCAGAGTCTCATTGCTGATTAAGCATGGCGTGCTTGCCCAATTGCAACAGGATGCTGATG
P E S H C * L S M A C L P N C N R M L M
Q S L I A D * A W R A C P I A T G C * W
R V S L L I K H G V L A Q L Q Q D A D G

2830 2840 2850 2860 2870 2880
GATGACGACTCGTCTGTCATGGAGACGCAACCCCGCGGGAGCATGCTTCCACAGACCCG
D D D S S V M E T Q P R R E H A S T D P
M T T R L S W R R N P A G S M L P Q T R
* R L V C H G D A T P P G A C F H R P G

2890 2900 2910 2920 2930 2940
 GCCTTTGACGCTTGGCGAAGCCGCCTATCTTCACGTCTTACTTCTGCGTTAAAAAACTG
 A F D A W R S R L S S R L T S A L K K L
 P L T L G E A A Y L H V L L L R * K N W
 L * R L A K P P I F T S Y F C V K K T G

2950 2960 2970 2980 2990 3000
 GAGCCTAGTGTGCGATAGCACGTCTGTGGGCGCAGTTGCCGAAATAACGACTTTCCTTGT
 E P S V R * H V C G R S C R N N D F P C
 S L V C D S T S V G A V A E I T T F L V
 A * C A I A R L W A Q L P K * R L S L S

3010 3020 3030 3040 3050 3060
 CGATAGACAGGAAGATCATTTTGAATTGATTGACTCCTTGTAATAATGCTCACAGCAC
 R * T G R S F W N * F D S L * I C S Q H
 D R Q E D H F G I D L T P C K Y A H S T
 I D R K I I L E L I * L L V N M L T A P

3070 3080 3090 3100 3110 3120
 CAATGTTCCCTTGGGTAAAGCTTTCGTTAGACGACGGCATCTGCAAAAAGTCTGAGACTCT
 Q C S L G * S F R * T T A S A K V * D S
 N V P L G K A F V R R R H L Q K S E T L
 M F P W V K L S L D D G I C K S L R L Y

3130 3140 3150 3160 3170 3180
 ACACCGACACAAAAACACGAAATTCCATTAACCGCACATCCTCATCCGACCAGGATTTGT
 T P T Q K H E I P L T A H P H P T R I C
 H R H K N T K F H * P H I L I R P G F V
 T D T K T R N S I N R T S S S D Q D L C

3190 3200 3210 3220 3230 3240
 GCCGCCCTTGACAACCATATCCATAATCAGAAAGAAAACGGAATTGCGGGGCTCCAAAGTA
 A A L D N H I H N Q K E T E L R G S K V
 P P L T T I S I I R K K R N C G A P K Y
 R P * Q P Y P * S E R N G I A G L Q S T

3250 3260 3270 3280 3290 3300
 CAACAGATCTCTGCCGTACATCATCTCTCTCTCGAAACTGCAGCGTCGTCGGCGCAGTCCT
 Q Q I S A V H H L S S K L Q R R R R S P
 N R S L P Y I I S P R N C S V V G A V L
 T D L C R T S S L L E T A A S S A Q S C

3310 3320 3330 3340 -----ON15047--
 GTTCGCTCCGACCTGGTTCTGCAACAGACGGGCGAGCTCTTGGCCCTGTAAGCTGCCGAAAG
 V R S D L V L Q Q T G S S C P V S C R K
 F A P T W F C N R R A A L A L * A A E S
 S L R P G S A T D G Q L L P C K L P K A

Startcodon

--> 3370 3380 3390 3400 3410 3420
CTGGCCCCGAACCGGACTGAGCGTGGAGGGTCGCGGGAATGGGCGAGCAGCTCAGGCAA
 L A P N A D * A W R V A G M G E Q L R Q
 W P R T P T E R G G S R E W A S S S G N
 G P E R R L S V E G R G N G R A A Q A T

-----ON14887-----> 3450 3460 3470 3480
CGGGGAACCGTGAAGTGGTTCAACGCCACTAAGGGCTTTGGATTCATCACACCTGAAGGT
R G T V K W F N A T K G F G F I T P E G
 G E P * S G S T P L R A L D S S H L K V
 G N R E V V Q R H * G L W I H H T * R W
 <-----ON15233-----

3490 3500 3510 3520 3530 3540
 GGTGGCGAGGACTTCTTCGTCCATCAGGTCAGCGCTGAAGCTTTGCACAACACGTCGTTA
 G G E D F F V H Q V S A E A L H N T S L
 V A R T S S S I R S A L K L C T T R R Y
 W R G L L R P S G Q R * S F A Q H V V I

3550 3560 3570 3580 3590 3600
 TTGTTAGCGTTTCAGCCGTCGAGACCAAGTTCTTGAGGCTGGCAAGGGTTCTCTGTGGAAC
 L L A F S R R D Q V L E A G K G S L W N
 C * R S A V E T K F L R L A R V L C G T
 V S V Q P S R P S S * G W Q G F S V E Q

3610 3620 3630 3640 3650 3660
 AGCGGTCTAGTGCATTTTTGACAGCTTTTTGTTACATGGACTTGCTGGGACCTCTTGGGATT
 S G L V H F D S F C Y M D L L G P L G I
 A V * C I L T A F V T W T C W D L L G L
 R S S A F * Q L L L H G L A G T S W D C

3670 3680 3690 3700 3710 3720
 GCACGCTGCTTATCTGCTGGGTGTGCGGGGGCCGTGCCAATGCAACGACCGCTATGGC
 A R C L S A G C A G A V P M Q R P R Y G
 H A A Y L L G V R G P C Q C N D R A M A
 T L L I C W V C G G R A N A T T A L W P

3730 3740 3750 3760 3770 3780
 CGCTGCACACGCTCCTTGATTTAGCGTAATATACGCTTAGTTTGCTTACCAAATCTTAA
 R C T R S L I * R N I R L V C L P K S *
 A A H A P * F S V I Y A * F A Y Q N L K
 L H T L L D L A * Y T L S L L T K I L S
 -----ON15232----->

3790 3800 3810 3820 3830 3840
 GCTCCAAAACGAATCCACAGCGGCTTGACCTGGACTGCTTTCTCTCGGTTGAGTGTGCA
 A P K R I H S G L T W T A F S R L S V A
 L Q N E S T A A * P G L L S L G * V L H
 S K T N P Q R L D L D C F L S V E C C M

3850 3860 3870 3880 3890 3900
 TGGTTGCTGCGCAGACCAACATCAACTCGGATGGCTTCCGCAGCCTGCGGGAGGGAGAGG
 W L L R R P T S T R M A S A A C G R E R
 G C C A D Q H Q L G W L P Q P A G G R G
 V A A Q T N I N S D G F R S L R E G E A

<-----ON14888----- 3930 3940 3950 3960
 CCGTCGAGTTTGAGGTTGAGGCAGGGCCGGATGGAAGATCCAAGCCGTGAGCGTGTCTG
 P S S L R L R Q G R M E D P R P * A C L
 R R V * G * G R A G W K I Q G R E R V W
 V E F E V E A G P D G R S K A V S V S G

3970 3980 3990 4000 4010 4020
 GCCCTGGTGGCTCTGCCCGGAGGTGAGAGCGCTTCTCTGGACTCCACCCACACAATTT
 A L V A L P R R * E R F L W T P P T Q F
 P W W L C P G G E S A S S G L H P H N L
 P G G S A P E V R A L P L D S T H T I W

4030 4040 4050 4060 4070 4080
 GGCTTATTATAATCGGAAGGCATCTATAGCAGCTATCTCCCATAGCTGCTGTTCTCTACT
 G L L * S E G I Y S S Y L P * L L F S T
 A Y Y N R K A S I A A I S H S C C S L L
 L I I I G R H L * Q L S P I A A V L Y F

4090 4100 4110 4120 4130 4140
 TCTACAAGGCGTGGGAGTCGAGCGGGTACCATACAACCTTACTGGCTTTGCTCGGTCTTG
 S T R R G S R A G T I Q P Y W L C S V L
 L Q G V G V E R V P Y N L T G F A R S C
 Y K A W E S S G Y H T T L L A L L G L A

4150 4160 4170 4180 4190 4200
 CCTTAATGTGTCGGCTGCGGACATTAGCTGCTGTGATTTATTACTAAGGCCTGCCGAGGG
 P * C V G C G H * L L * F I T K A C R G
 L N V S A A D I S C C D L L L R P A E G
 L M C R L R T L A A V I Y Y * G L P R G

4210 4220 4230 4240 4250 4260
 GGATGTGTACCTCAAGTACTTGAGGTTTCGTGAACATCCATGCCTGGTTGTCCGGGGATAA
 G C V P Q V L E V R E H P C L V V R G *
 D V Y L K Y L R F V N I H A W L S G D K
 M C T S S T * G S * T S M P G C P G I K

4270 4280 4290 4300 4310 4320
 AAGTGGCGACCCTGCTTTTCCAGGGTCAGGCGCCAAAGCGCGCTTCTGAGTATGTTCC
 K W R P C F S R V R R Q S A R S * V C S
 S G D P A F P G S G A K A R V P E Y V R
 V A T L L F Q G Q A P K R A F L S M F D

4330 4340 4350 4360 4370 4380
 ACGCAGTCCCTGTACGTATGCCTATGGTCCCGCTAATGTCACACTTCTGAGGCCTGGCGG
 T Q S L Y V C L W S R * C H T S E A W R
 R S P C T Y A Y G P A N V T L L R P G G
 A V P V R M P M V P L M S H F * G L A G

4390 4400 4410 4420 4430 4440
 GGTGGGTCTCTCTAGCTCGATGTGTCTGATCCCTGACGTCAAGCGGATGTGGCTAT
 G W V L S L A R C V * S L T S S G C G Y
 V G S S L * L D V S D P * R Q A D V A M
 L G P L S S S M C L I P D V K R M W L C

4450 4460 4470 4480 4490 4500
 GCAAAGGCATGGATTGCATTCCCCATTGCCACGCACAGGCCAGGGACATGCGCTGAGA
 A K G M D C I P P L P R T G Q G H A L R
 Q K A W I A F P H C H A Q A R D M R * D
 K R H G L H S P I A T H R P G T C A E M

4510 4520 4530 4540 4550 4560
 TGAAGCTGTGACAAGTTAGCCTGCGTACCCCTCATCTGCCCTCTGCTCTATGCTCCA
 * S C R Q V S L R T P H L P S V L Y A P
 E A V D K L A C V P L I C P L S S M L Q
 K L S T S * P A Y P S S A L C P L C S R

4570 4580 4590 4600 4610 4620
 GGGTGTCCAAGGAACCTCCGGGGCGGTGGCCGTGGTCGCGGCCGTGCCCGTGGCGCCCG
 G C S K E L P G R W P W S R P C P W R P
 G A P R N F R G G G R G R G R A R G A R
 V L Q G T S G A V A V V A A V P V A P V

4630 4640 4650 4660 4670 4680
 TGGTGTATGCTGCTTACGGCTATCCTCAGATGCCGCCCATGTACCCCGGCTACTACTT
 W C L C C L R L S S D A A H V P R L L L
 G A Y A A Y G Y P Q M P P M Y P G Y Y F
 V L M L L T A I L R C R P C T P A T T F

4690 4700 4710 4720 4730 4740
 TTTCCCAGCTGGTATGTTTCAGTCCCTGTGCAATCACTGGCTAGGACAGGCCGCGCGCGC
 F P S W Y V Q S L C N H W L G Q A A A R
 F P A G M F S P C A I T G * D R P R R A
 S Q L V C S V P V Q S L A R T G R G A R

4750 4760 4770 4780 4790 4800
 GCGTGTTTACAGTTATGCATGTTTACAGTTATGTCTACAGTTCTAAAAAACATTTTCGGAC
 A C L Q L C M F T V M S T V L K N I S D
 R V Y S Y A C L Q L C L Q F * K T F R T
 V F T V M H V Y S Y V Y S S K K H F G Q

4810 4820 4830 4840 4850 4860
 AATCTTTACCAGATGTGGACAATTTGATTAGATTTGGCTGGCGACTATGTAATGGGAAAT
 N L Y Q M W T I * L D L A G D Y V M G N
 I F T R C G Q F D * I W L A T M * W E I
 S L P D V D N L I R F G W R L C N G K F

4870 4880 4890 4900 4910 4920
 TCGCGGGCGCAATCGGGAAATGGTGTGGTGTAAAGCATTTCGTAAAAATGATAAAAAA
 S R A Q S G N G V V L K H S * K * * K K
 R G R N R E M V W C * S I R K N D K K N
 A G A I G K W C G V K A F V K M I K K T

4930 4940 4950-----ON15045-----> 4980
 CAGAATCCAGCTGTCTCGACGGGTAAGACCGAAGCTGCAGGCTGACAGTGGCCGGAATCC
 Q N P A V S T G K T E A A G * Q W P E S
 R I Q L S R R V R R K L Q A D S G R N P
 E S S C L D G * D G S C R L T V A G I L

4990 5000 5010 5020 5030 5040
 TGCAGGACCAGTAACCCCCGAGGATCCATTCTTCGCAACAGAATTAACACGTCACGTC
 C R T S N P R G S I P S Q Q N * T R H V
 A G P V T P E D P F L R N R I K H V T S
 Q D Q * P P R I H S F A T E L N T S R P

<-----ON15044----- 5070 5080 5090 5100
 CTGCGAAACGTCGAACTTCAATGGCAAAATGTGCTATTTTGCTGCCGTCGCTTTTGTGC
 L R N V R T S W Q N C A I L L P S L L C
 C E T S E L H G K I V L F C C R R F C A
 A K R P N F M A K L C Y F A A V A F V Q

5110 5120 5130 5140 5150 5160
 AGATCCAACCTGGCCGGGGACGGGGTCGCGGCCGTCGCGGCATGCCTATTCAGGGTATGAT
 R S N W P G T G S R P W R H A Y S G Y D
 D P T G R G R G R G R G R G G M P I Q G M I
 I Q L A G D G V A A V A A C L F R V * S

5170 5180 5190 5200 5210 5220
 CCAGGGTATGCCGTACCCTGGCATCCCCATTCCCGGTGGCTTGGAAACCGACGGGCGAGCC
 P G Y A V P W H P H S R W L G T D G R A
 Q G M P Y P G I P I P G G L E P T G E P
 R V C R T L A S P F P V A W N R R A S R

5230 5240 5250 5260 5270 5280
 GTCGGGACTGCAGGTGCGGCTGGTTGGATTGGATGCTATGGTATAACCGAACACCACCA
 V G T A G A A G W I G C Y G I T E H H P
 S G L Q V R L V G L D A M V * P N T T Q
 R D C R C G W L D W M L W Y N R T P P S

5290 5300 5310 5320 5330 5340
 GCGTTCCTGTTGGCGGTTCCCTTCTGCGGCAGGTTTACTATCGGCTTCGCAAGCAGACC
 A F P V G G S F C G R F D Y R L R K Q T
 R S L L A V P S A A G L T I G F A S R P
 V P C W R F L L R Q V * L S A S Q A D L

5350 5360 5370 5380 5390 5400
 TTTTGAATCGGGGCCGATTGGTTTCGGATATCTGTGAAACATGAAAGAGTTTTTAGGTAC
 F W N R G R L V R I S V K H E R V F R Y
 F G I G A D W F G Y L * N M K E F L G T
 L E S G P I G S D I C E T * K S F * V P

5410 5420 5430 5440 5450 5460
 CATACGGAAGGCGATTCCGCGTCAAGGGATATGAGGCTTGATGGCATTAAAGTTAATTGCC
 H T E G D S A S R D M R L D G I K L I A
 I R K A I P R Q G I * G L M A L S * L P
 Y G R R F R V K G Y E A * W H * V N C Q

5470 5480 5490 5500 5510 5520
 AGAGCAATGCTGTCAAGTTCTGTTGGCAATAAATCACGGGAAAGAATCTGTTCAATGCCGT
 R A M L S V L L A I N H G K E S V Q C R
 E Q C C Q F C W Q * I T G K N L F N A V
 S N A V S S V G N K S R E R I C S M P W

5530 5540 5550 5560 5570 5580
 GGGGATGTTGATGCAATGACTGGGCGTGTGATCGTCTGCAGCCCTGCATAATTCCTCACC
 G D V D A M T G R V I V C S P A * F L T
 G M L M Q * L G V * S S A A L H N S S P
 G C * C N D W A C D R L Q P C I I P H L

5590 5600 5610 5620 5630 5640
 TTTCCGTACCTAAGTACTTAGTTTACAATTTGTGTCAATTTGTTTTACATTGCGGCAGGTTG
 F P Y L S T * F T I V S F V L H C G R L
 F R T * V L S S Q L C H L F Y I A A G C
 S V P K Y L V H N C V I C F T L R Q **V V**

5650 5660 5670 5680-----ON15105-----
 TGGTCCACAACCTGCCGTGGAGCTGCCAGTGGCAGCAGCTCAAGGATCACTTCAAGGAGT
 W S T T C R G A A S G S S S R I T S R S
 G P Q P A V E L P V A A A Q G S L Q G V
V H N L P W S C Q W Q Q L K D H F K E W

-> 5710 5720 5730 5740 5750 5760
 GGAGGGTGAACGCGCTGATGTTGTGTATGATGCATGGGCGGTCAGGTGAGACTGTC
 G G W N A L M L C M M H G A G P G E T V
 E G G T R * C C V * C M G P V Q V R L S
R V E R A D V V Y D A W G R S R * D C R

5770 5780 5790 5800 5810 5820
 GCAACGTGTGCGCAAGGATAGAATTGTTACTGGTGCCTGAAACCCCAACGCCCGGAAGC
 A T C R A R I E L L L V P E T P T P G S
 Q R V A Q G * N C Y W C L K P Q R P E A
 N V S R K D R I V T G A * N P N A R K L

5830 5840 5850 5860 5870 5880
 TGCATGTGTGTGCGGCTGAATCCCCTCCACTTACACATCGTTTCAGCTGCATTGGTGTTC
 C M C V R A E S P P L T H R S A A L V L
 A C V C A L N P L H L H I V Q L H W C *
 H V C A R * I P S T Y T S F S C I G V D

5890 5900 5910 5920 5930 5940
 ATAGTGCCTTAATTGCTGTTTCTATATGGCCACCTTGGAGAATCGTCTACTTGTCTAAAG
 I V L N C C F Y M A T L E N R L L V L K
 * C L I A V S I W P P W R I V Y L S * R
 S A * L L F L Y G H L G E S S T C P K D

5950 5960 5970 5980 5990 6000
 ATTTGCAACTCGTTACCCGCTCGGCAGGGGCTTTGGCACCGTCCGGTTCGCCACGAAGGA
 I C N S L P A R Q G L W H R P V R H E G
 F A T R Y P L G R G F G T V R F A T K E
 L Q L V T R S A G A L A P S G S P R R R

6010 6020 6030 6040 6050 6060
 GGACGCCGACAGGCGTGTGAGAAGATGAACAACAGCCAGATCGACGGGCGCACAATAAG
 G R R T G V * E D E Q Q P D R R A H N K
 D A A Q A C E K M N N S Q I D G R T I S
 T P H R R V R R * T T A R S T G A Q * V
Stopcodon

6070 6080 6090 <-----ON15048-----6120
 TGTGCGTTTGGATCGGTTTGGAGTGAAGGACTACCGGGCGGATGTTGAGGGACAGTTGAGG
 C A F G S V * V K D Y R A D V E G Q L R
 V R L D R F E * R T T G R M L R D S * G
 C V W I G L S E G L P G G C * G T V E G

6130 6140 6150 6160 6170 6180
 GACCGCTGAGGATGAGGCGATGATGAGCAGCCGATAACTTCTCCCCCTCACACGCTCTT
 D R * G * G D D E Q P D N F S P S H A L
 T A E D E A M M S S P I T S P P H T L F
 P L R M R R * * A A R * L L P L T R S S

6190 6200 6210 6220 6230 6240
 CATTGTAGTGCTTCCCCAAGAGAAGAAGACCCTGTGTGTATATGTGCCGTGTGTGAGCG
 H C S A S P R E E D H C V Y M C R V * A
 I V V L P Q E K K T T V C I C A V C E R
 L * C F P K R R R P L C V Y V P C V S V

6250 6260 6270 6280 6290 6300
 TGTGTGAACCGGCCCCAGTCCGCCGCGGTTAGCTGCGTTTGGCCATTGATAGGATAGA
 C V N R P P V R R A V A A F C H * * D R
 V * T G P Q S A A R * L R F A I D R I D
 C E P A P S P P R G S C V L P L I G * T

6310 6320 6330 6340 6350 6360
 CCCTGGGTATATTACACACCCACGCGTGTCCGAAAACTATGTATGACAAATCCGCTGCCT
 P W V Y Y T P T R V R K L C M T N P L P
 P G Y I T H P R V S E N Y V * Q I R C L
 L G I L H T H A C P K T M Y D K S A A C

6370 6380 6390 6400 6410 6420
 GCGTGATTGACGCCGCCGATAAACGTGCTTTTGTTCGGTTGTGTGCGTCTCAACCTTTGG
 A * L T P P H K R A L F G C V R L N L W
 R D * R R R I N V L C S V V C V S T F G
 V I D A A A * T C F V R L C A S Q P L E

6430 6440 6450 6460 6470 6480
 AAGATTAGGGAACAGCTGAAAGTTGCGTTTTCGGGCCAGGACAGCATTTGTGCTGCGCAGCG
 K I R E Q L K V A F R A R T A L C C A A
 R L G N S * K L R F G P G Q H C A A Q R
 D * G T A E S C V S G Q D S I V L R S G

6490 6500 6510 6520 6530 6540
GTGTGCTTGCAGCGCAGCCTCTATTGCCCGGGAATGCTCGTGTGCGGGTTTCGGATG
V C L Q R S L Y C P P G M L V L R V R M
C A C S A A S I A P R E C S C C G F G C
V L A A Q P L L P P G N A R A A G S D A

6550 6560 6570 6580 6590 6600
CAAGCTGAGTGCCTTGATTGCCATGACTCACCTGGCTGCCGTTTCCTACGGGTTCTCTCA
Q A E C L D C H D S P G C R F L R V L S
K L S A L I A M T H L A A V S Y G F S H
S * V P * L P * L T W L P F P T G S L I

6610 6620 6630 6640 6650 6660
TTGAAGGGTCGAGTAGGGAGCGATGTGGCCGGGTTGGTTCGTAGGCTGGGTTCTGCAGAGC
L K G R V G S D V A G L V V G W V L Q S
* R V E * G A M W P G W S * A G F C R A
E G S S R E R C G R V G R R L G S A E R

6670 6680 6690 6700 6710 6720
GACATAATGCGAGCTCTGCGCACCCCGGGGTTTGGTTGGCTGCCCTGTGCAGCAGCTGC
D I M R A L R T P G V W L A A L C S S C
T * C E L C A P R G F G W L P C A A A A
H N A S S A H P G G L V G C P V Q Q L L

6730 6740 6750 6760 6770 6780
TCACATGCACAGGGACTGGTTGAATGCTATGTTGCTGTGCGGAAGAAGTAACAGCCGGGA
S H A Q G L V E C Y V A V R K K * Q P G
H M H R D W L N A M L L C G R S N S R D
T C T G T G * M L C C C A E E V T A G T

6790 6800 6810 6820 6830 6840
CGCGATGTCTAGGCATTTCGGGACGTATGTGTTTGGCGTATGTGTATTTGGCGGTGTCATG
R D V * A F G T Y V F G V C V F G G V M
A M S R H S G R M C L A Y V Y L A V S C
R C L G I R D V C V W R M C I W R C H A

6850 6860 6870 6880 6890 6900
CTGGATGAAAGGGAATGTGAGCTGACCCTGTGAGAAAAGTGTCTGATTTTCTCCTCTTGT
L D E R E C E L T L * E N C L I F S S C
W M K G N V S * P C E K T V * F S P L V
G * K G M * A D P V R K L S D F L L L S

6910 6920 6930 6940 6950 6960
CTAAACGGTACCTCTTTTCGTTACCTTTAACACGTTGCGACCGACCGACTGTCCCCATGG
L N G T S F V T F N T L R P T D C A P W
* T V P L S L P L T R C D R P T V P H G
K R Y L F R Y L * H V A T D R L C P M A

6970 6980 6990 7000 7010 7020
CCCCTCGGTCTGTTGCGCTGAGCCTCGCCTTCGCGGGTCGACCCGACATCTTCGCCTCCA
P L G L L R * A S P S R V D P T S S P P
P S V C C A E P R L R G S T R H L R L H
P R S V A L S L A F A G R P D I F A S T

7030 7040 7050 7060 7070 7080
CATGTAACCTCCTCGCCTCATCTTCTTATCACATTAACGCCACAATTAATTTCTGAACA
H V T S S P H L P Y H I N A T I K F * T
M * P P R L I F L I T L T P Q L N S E Q
C N L L A S S S L S H * R H N * I L N K

```

<-----ON15046----- 7110      7120      7130      7140
AAGCTCGCTTACTCCGTCGACTATAACTAGATAATAAGACACTACCAAACATACGCCTAT
K L A Y S V D Y N * I I R H Y Q T Y A Y
S S L T P S T I T R * * D T T K H T P I
A R L L R R L * L D N K T L P N I R L Y

7150      7160      7170      7180      7190      7200
ACACAACACAACAGAAACTCCTAAATGACCGATAGAAGCCTAGATGCAGCGTACCCATCA
T Q H N R N S * M T D R S L D A A Y P S
H N T T E T P K * P I E A * M Q R T H H
T T Q Q K L L N D R * K P R C S V P I T

7210      7220      7230      7240      7250      7260
CCCGCCAAGCACATGTAGAAGAGAAGAGCATTTTCAGCCCTTGGGTGCTACATCAGTTTCC
P A K H M * K R R A F Q P L G A T S V S
P P S T C R R E E H F S P W V L H Q F P
R Q A H V E E K S I S A L G C Y I S F P

7270      7280      7290      7300      7310      7320
CCGTACCCATGGGACAGGTTGCCGCGTGGGGCGGCAGCTCCGTGCTCATACCCATGCATA
P Y P W D R L P R G A A A P C S Y P C I
R T H G T G C R V G R Q L R A H T H A Y
V P M G Q V A A W G G S S V L I P M H T

7330      7340      7350      7360      7370      7380
CACAAGTCAGGCACTACTGGAAAAGCACACACTGATGAGCCCGGAGGTTCCGGGATCGAG
H K S G T T G K A H T D E P G G S G I E
T S Q A L L E K H T L M S P E V P G S R
Q V R H Y W K S T H * * A R R F R D R D

7390      7400      7410      7420      7430      7440
ACCTATCACGGTCGAAATCCTTCCGATGGCGGTAGGTAAAAGCGCCCTAGTCGATGGAC
T Y H G R N P S D G G R * K R P * S M D
P I T V E I L P M A V G K S A P S R W T
L S R S K S F R W R * V K A P L V D G L

```

- Die Exons sind in blau und die Introns in rot dargestellt. Der grün markierte Bereich zeigt die zweite Hälfte der NAB1-Spleißvariante2, welche durch die Retention des ersten Introns gebildet wird. Der gelb markierte Bereich zeigt die NAB1-Spleißvariante1 (Siehe auch 5.3.3).

9 Publikationen

Nematollahi G, **Kianianmomeni A**, Hallmann A (2006) Quantitative analysis of cell-type specific gene expression in the green alga *Volvox carteri*. BMC Genomics 7: 321

Kianianmomeni A, Nematollahi G, Hallmann A (2008) A gender-specific retinoblastoma-related protein in *Volvox carteri* implies a role for the retinoblastoma protein family in sexual development. Plant Cell **20**: 2399-2419

Kianianmomeni A, Stehfest K, Nematollahi G, Hegemann P, Hallmann A (2008) Light-gated ion channels of *Volvox carteri* underlie a light-dependent, cell type-specific, stage-specific, and sex inducer-dependent regulation (Manuskript)

Publikation 1

**Quantitative analysis of cell-type specific gene expression in the green alga
*Volvox carteri***

Nematollahi G, **Kianianmomeni A**, Hallmann A

(2006)

BMC Genomics 7: 321

Publikation 2

A gender-specific retinoblastoma-related protein in *Volvox carteri* implies a role for the retinoblastoma protein family in sexual development

Kianianmomeni A, Nematollahi G, Hallmann A

(2008)

Plant Cell 20: 2399-2419

Publikation 3

Light-gated ion channels of *Volvox carteri* underlie a light-dependent, cell type-specific, stage-specific, and sex inducer-dependent regulation

Kianianmomeni A, Stehfest K, Nematollahi G, Hegemann P, Hallmann A

(2008)

Manuskript (submitted)

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Armin Hallmann für die Vergabe des interessanten Themas sowie für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kollegen für die gute Arbeitsatmosphäre bedanken. Hervorheben möchte ich mich an dieser Stelle bei Stephan Kuhlmann, Susanne Schmidt, Anne Vette, Kai Lerche und Jan Lessmann bedanken. Bedanken möchte ich mich auch bei der Frau Kordula Puls für die technische Assistenz im Labor.

Bei Calliope Diplas bedanke ich mich sehr für die lustigen Laborstunden und wahnsinnige Diskussionen angefangen beim Feminismus im Alltag bis hin zu den griechischen Spezialitäten in der Steinzeit.

Frau Dr. Andrea Kandlbinder und Herrn Dr. Thorsten Seidel möchte ich für die sprachlichen Korrekturen bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Ghazaleh für die seelische Unterstützung sowie hilfreiche und fachliche Kommentare bzw. Korrekturen beim Zusammenschreiben dieser Arbeit.

Als letztes möchte ich mich bei allen Freunden für die schöne Stunden während der regnerischen Zeit in Bielefeld bedanken, als da insbesondere wären: Zahra Kazemi, Zohreh Javaheri, Oezkan Ezli, Kimia Askari, Andrea Pena-Ahumada, Birgen H. Rothe, Thorsten Seidel und alle Mitglieder der „Iranian Society“.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und nur angegebene Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur entnommenen Zitaten sind als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation weder vollständig noch in Auszügen einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben. Ich bewerbe mich hiermit erstmalig um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Bielefeld.

Bielefeld, den

Arash Kianianmomeni