

Diplomarbeit zur Erlangung des Grades einer Diplom-Biologin

**Molekulare Analyse der Blütenterminierung
durch Viren bei der Coccolithophoride
*Emiliana huxleyi***



Freie Universität Berlin
Fachbereich Biologie

Erstgutachter: Prof. Dr. Dieter Wolf-Gladrow

Zweitgutachter: Dr. Holger Hesse

Vorgelegt von: Jessica Kegel

Bremerhaven, September 2005

Erklärung

Gemäß § 15 (1) der Diplomprüfungsordnung für den Studiengang Biologie der Freien Universität Berlin vom 14.06.1995 erkläre ich hiermit, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die in den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als Solche kenntlich gemacht.

Bremerhaven, den 12.09.2005

Jessica Kegel

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das Mögliche getan hat.“*

Johann Wolfgang von Goethe, 1787

Für meine lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis.....	2
Tabellenverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Phytoplankton	6
1.2 Coccolithophoriden.....	8
1.2.1 <i>Emiliana huxleyi</i>	9
1.3 Viren	12
1.4 <i>Expressed Sequence Tags</i> (ESTs).....	13
1.5 Zielstellung	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Chemikalien und Geräte	16
2.2 Algenkultur	20
2.3 Virus.....	20
2.4 Kultivierung	20
2.4.1 Vorexperimente.....	20
2.4.2 Hauptexperiment.....	21
2.5 Wachstumsmessung.....	21
2.5.1 Zellzahlbestimmung mittels Beckman Coulter Counter.....	21
2.5.2 Zellanalyse mittels Durchflusscytometer (FACS).....	22
2.6 Zellprobennahme	23
2.7 Genbibliotheken.....	24
2.7.1 RNA-Isolierung.....	24
2.7.1.1 Vorexperimente	24
2.7.1.2 RNA Isolierung zur Herstellung einer cDNA-Bibliothek	26
2.7.1.3 Qualitäts- und Quantitätskontrolle	27

2.7.2 mRNA-Isolierung	28
2.7.3 LiCl-Fällung	29
2.7.4 Herstellung der cDNA-Bibliotheken	29
2.7.4.1 <i>E. huxleyi</i> nach Virusinfektion	29
2.7.4.2 <i>E. huxleyi</i> vor Virusinfektion	30
2.7.5 Qualifizierung der cDNA-Bibliothek	34
2.7.5.1 Kultivierung der Klone	34
2.7.5.2 Präparation von Plasmid-DNA	34
2.7.5.3 Restriktionsverdau	37
2.7.5.4 Agarosegel-Elektrophorese	37
2.7.6. Sequenzierung	38
2.7.6.1 Sequenzierungsreaktion	38
2.7.6.2 Aufreinigung der PCR-Produkte	40
2.7.6.3 Sequenzanalyse	40
3. Ergebnisse	44
3.1 Algenwachstum	44
3.1.1 Vorexperimente	44
3.1.2 Hauptexperiment	48
3.1.2.1 Wachstumsmessung mittels Beckman Coulter Counter	48
3.1.2.2 Wachstumsrate mittels Durchflusscytometer	49
3.2 RNA-Isolierung	50
3.3 mRNA-Isolierung	52
3.4 Herstellung der cDNA-Bibliothek vor Virusinfektion	53
3.4.1 Titerbestimmung der cDNA	54
3.5 Plasmid-DNA Präparation	55
3.6 Restriktionsverdau	56
3.7 Analyse der in den cDNA-Bibliotheken gefundenen Gene	58

4. Diskussion	67
4.1 Wachstum und RNA-Isolierung von <i>E. huxleyi</i>	67
4.2 Identifizierung und Analyse von ESTs	68
4.3 Analyse der in den cDNA-Bibliotheken gefundenen Gene	69
4.3.1 cDNA-Bibliothek vor Virusinfektion	69
4.3.2 cDNA-Bibliotheken nach Virusinfektion	70
4.4 Reaktion der <i>E. huxleyi</i> Transkription nach Virusinfektion	71
4.5 Möglicher Infektionsverlauf des Virus <i>EhV86</i> bei <i>E. huxleyi</i>	72
4.6 Ausblick	73
5. Zusammenfassung.....	74
6. Literatur.....	76
7. Danksagung	85
8. Anhang	86

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cfu	Plaquebildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)
ddNTP	Didesoxynucleotide
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMS	Dimethylsulfid
DMSP	Dimethylsufoniopropionat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
HSP	Hitzeschockprotein
kb	Kilobasenpaare
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
OD	Optische Dichte
Oligo-dt	Oligodeoxythymidin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PSU	praktische Salzgehalts-Skala (<i>practical salinity unit</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SEM	scanning electron microscopy
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer; Elektrophoresepuffer
TEN	Tris-EDTA-NaCl-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1** Fotografie einer Phytoplankton-Mischkultur von Lester V. Bergmann. **S. 6**
- Abb. 1.2** Satellitenaufnahme einer schädigenden Phytoplanktonblüte (*harmful algal bloom*) des Cyanobakteriums *Nodularia* in der Mitte der Baltischen See. **S. 7**
- Abb. 1.3** SEM-Bild einer Coccolithe von *E. huxleyi*. **S. 9**
- Abb. 1.4** SEM Bild von einer *Emiliana huxleyi* Zelle. **S. 10**
- Abb. 1.5** Satellitenaufnahme einer Phytoplankton- Blüte der Coccolithophoride *Emiliana huxleyi* vor Neufundland im westlichen Atlantik. **S. 11**
- Abb. 1.6** SEM Bild eines Virus der an der Oberfläche eine *E. huxleyi* Zelle angeheftet ist. **S. 13**
- Abb. 2.1** Beispielbaum für eine sichere Annotierung eines Gens (Beta-hydroxyacyl-ACP Dehydratase) einer unbekanntem Teilsequenz. **S. 42**
- Abb. 2.2** Beispielbaum für die Annotierung einer unbekanntem Sequenz als fcp-ähnliches Protein. **S. 43**
- Abb. 3.1** Wachstumskurve von *Emiliana huxleyi* mit einer Anfangszellzahl von 50 Zellen pro ml. **S. 45**
- Abb. 3.2** Wachstumskurve von *Emiliana huxleyi* mit einer Anfangszellzahl von 500 Zellen pro ml. **S. 46**
- Abb. 3.3** Wachstumskurve von *Emiliana huxleyi* mit einer Anfangszellzahl von 5.000 Zellen pro ml. **S. 46**
- Abb. 3.4** Wachstumskurve von *Emiliana huxleyi* mit einer Anfangszellzahl von 50.000 Zellen pro ml. **S. 47**
- Abb. 3.5** Wachstumskurven der beiden 5 l *E. huxleyi* Kulturen, mit einer Anfangszellzahl von 5000 Zellen pro ml. Die Messung erfolgte mit dem Beckman Coulter. **S. 48**
- Abb. 3.6** Wachstumskurven der beiden 5 l *E. huxleyi* Kulturen, mit einer Anfangszellzahl von 5000 Zellen pro ml. Die Messung erfolgte mit einem Durchflußzytometer durchgeführt. **S. 49**
- Abb. 3.7** Qualitäts- und Quantitätskontrolle der isolierten RNA der Proben D und E. Die Messung erfolgte mittels Bioanalyser. **S. 51**

- Abb. 3.8** Kontroll- und cDNA-Fraktionen mit SYBRGreen gefärbt und unter UV-Licht visualisiert. **S. 54**
- Abb. 3.9** DNA-Proben 1-36 nach Restriktionsverdau aufgetragen auf ein 1.2%iges Agarosegel. **S. 56**
- Abb. 3.10** DNA-Proben 37-68 nach Restriktionsverdau aufgetragen auf ein 1.2%ige Agarosegel. **S. 57**
- Abb. 3.11** Annotierung einer Teilsequenz aus der cDNA-Bibliothek zum Zeitpunkt $T = 0$ als Beta-hydroxyacyl-ACP Dehydratase. **S. 59**
- Abb. 3.12** Annotierung einer Teilsequenz aus der cDNA-Bibliothek vor Virusinfektion als fcp-ähnliches Protein. **S. 60**
- Abb. 3.13** Häufigkeitsverteilung der aktiven Gene nach ihrer Funktion vor (Null) und nach Virusinfektion (6, 12 und 24 Stunden). **S. 66**
- Abb. 4.1** Phylogenetischer Stammbaum **S. 71**

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Verwendetes Kulturvolumen zur Probenextraktion für die RNA-Isolierung von <i>Emiliana huxleyi</i> .	S. 23
Tab. 2.2	Sequenz des <i>attB1</i> Adapter.	S. 31
Tab. 2.3	BP Rekombinationsreaktion	S. 32
Tab. 2.4	Verdünnungsreihe der cDNA-Bibliothek und ihrer Kontrollen.	S. 33
Tab. 2.5	Restriktionsverdau-Ansatz	S. 37
Tab. 2.6	Sequenzier-Reaktions-Ansatz für die Proben vor Virusinfektion.	S. 39
Tab. 2.7	Sequenzier-Reaktions-Ansatz für die Proben nach Virusinfektion.	S. 39
Tab. 2.8	Thermocycler Sequenzierungs-Programm für die Proben zum Zeitpunkt T_0 .	S. 39
Tab. 2.9	Thermocycler Sequenzierungs-Programm der virusinfizierten Proben.	S. 39
Tab. 3.1	Rohdaten des Zellwachstums der <i>E. huxleyi</i> Kulturen mit einer Anfangszellzahl von 500 Zellen pro ml.	S. 44
Tab. 3.2	Zellzahlen auf einem Filter, die für die RNA-Isolierung eingesetzt wurden.	S. 50
Tab. 3.3	Verwendete RNA-Proben für die mRNA-Isolierung.	S. 50
Tab. 3.4	Verwendetes Volumen der mRNA der verschiedenen Wachstumsstadien für den Pool der cDNA.	S. 52
Tab. 3.5	Schätzung der Konzentration der cDNA und der Kontrolle basierend auf der Abb. 3.9 A und B.	S. 53
Tab. 3.6	Konzentrationsbestimmung einiger DNA-Proben mittels NanoDrop [®] ND-1000 Spectrophotometer.	S. 55
Tab. 3.7	Annotierte ESTs des Wirtes <i>E. huxleyi</i> vor Virusinfektion sowie deren <i>e</i> value, Häufigkeit und Funktion.	S. 62
Tab. 3.8	Annotierte Gene des Wirtes <i>E. huxleyi</i> nach 6 Stunden Virusinfektion, deren Häufigkeit und Funktion.	S. 63
Tab. 3.9	Annotierte Gene des Wirtes <i>E. huxleyi</i> nach 12 Stunden Virusinfektion, deren Häufigkeit und Funktion.	S. 64
Tab. 3.10	Annotierte Gene des Wirtes nach 24 Stunden Virusinfektion, deren Häufigkeit und Funktion.	S. 65

Tab. 3.11	Annotierte ESTs des Virus im Wirt nach 24 Stunden Infektion.	S. 65
Tab. 4.1	Identifizierte Gene des Virus im Wirt nach 24 Stunden Infektion und deren mögliche Funktionen.	S. 72
Tab. 8.1	Zellzahlen der Vorkulturen mit einer Anfangszellzahl von 50 Zellen pro ml.	S. 88
Tab. 8.2	Zellzahlen der Vorkulturen mit einer Anfangszellzahl von 5.000 Zellen pro ml.	S. 89
Tab. 8.3	Zellzahlen der Vorkulturen mit einer Anfangszellzahl von 50.000 Zellen pro ml.	S. 89
Tab. 8.4	Zellzahlen des Hauptexperimentes mit einer Anfangszellzahl von 5.000 Zellen pro ml. Die Wachstumsmessung erfolgte sowohl mit dem Coulter Counter als auch mit dem Durchflußcytometer (FACS).	S. 90

1 Einleitung

1.1 Phytoplankton

Als Phytoplankton bezeichnet man mikroskopisch kleine, einzellige, photosynthetisierende Algen (Abb. 1.1), die im euphotischen Pelagial vorkommen. Durch ihre Fähigkeit, mit Hilfe von Chlorophyll oder anderen Pigmenten wie Carotinen, Xantophyllen oder Phycobilinen die Sonnenenergie in chemische Energie umzuwandeln und aus anorganischen Rohstoffen organische Verbindungen herzustellen, gehören sie zu den Primärproduzenten in aquatischen Ökosystemen. Die globale Phytoplankton Primärproduktion wird auf 10^{15} - 10^{16} g Kohlenstoff / Jahr geschätzt (<http://www.life.umd.edu/labs/delwiche/Pslife/lectures/phytoplankton.html>).

Aufgrund der Tatsache, dass das Phytoplankton den Hauptteil der pelagischen Biomasse ausmacht (Redfield *et al.*, 1963) und eine hohe Produktionskapazität aufweist, bildet es den Hauptträger der marinen Primärproduktion (Field *et al.*, 1998) und damit die Grundlage der aquatischen Nahrungskette.



Abb. 1.1: Fotografie einer Phytoplankton-Mischkultur von Lester V. Bergmann / CORBIS
(http://news.nationalgeographic.com/news/2002/08/0820_02080_Tvwireplankton.html).

Zu den wichtigsten Phytoplanktongruppen gehören die Cyanobakterien (Cyanophyta), Haptophyten, Diatomeen (Bacillariophyta), Dinoflagellaten (Dinophyta), Cryptomonaden (Cryptophyta), Euglenoiden (Euglenophycota) und Grünalgen (Chlorophyta).

Im globalen Kohlenstoff-Kreislauf spielt das Phytoplankton eine wichtige Rolle. Die Bildung und Ablagerung von organischem Kohlenstoff, sowie biogen gebildetem Carbonat in marinen Ökosystemen stellt eine wichtige potentielle Kohlenstoff-Senke dar.

Die Reproduktion der im Pelagial dahintreibenden Algen erfolgt vorwiegend durch Zweiteilung. Da ihr Wachstum, ihre Vermehrung und damit das Ausmaß ihrer assimilatorischen Leistungen von wichtigen Umweltfaktoren wie Temperatur-, Licht- und Nährstoffangebot (CO₂, Stickstoff, Phosphor und Schwefel) abhängen, werden sie oft als Indikator für Klimaänderungen verwendet.

Im Frühjahr, wenn die Wassertemperatur ansteigt und durch die Winterstürme genügend Nährstoffe vorhanden sind, können einige Gruppen des Phytoplanktons riesige Blüten bilden. Im Herbst kommt es in der Regel zu einer zweiten, meist schwächeren Phytoplanktonblüte. Diese Blüten können teilweise sogar von Satelliten beobachtet werden (Abb. 1.2). Bei der Blütenterminierung spielt nicht nur der Rückgang der Wachstumsfaktoren eine Rolle, sondern in einigen Fällen auch der Befall von Viren (Kap. 1.3).

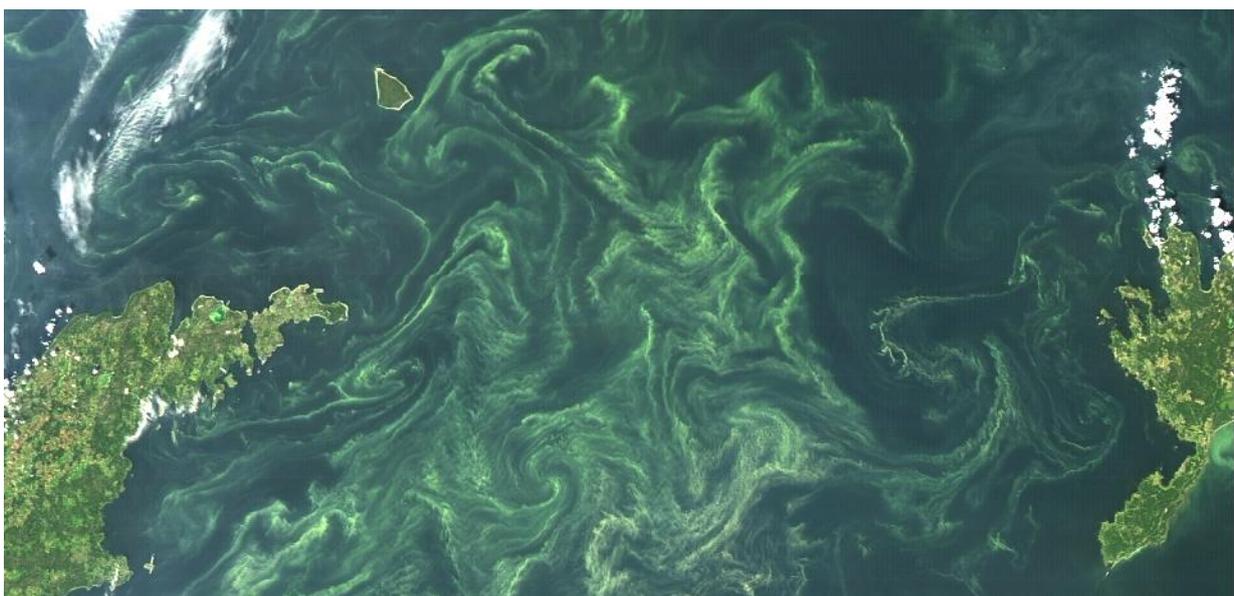


Abb. 1.2: Satellitenaufnahme einer schädigenden Phytoplanktonblüte (*harmful algal bloom*) des Cyanobakteriums *Nodularia* in der Mitte der Baltischen See (30.07.2003) (http://spg.ucsd.edu/Satellite_Projects/Various_HABs/Various_Habs.htm)

Während dieser Blüte sterben die meisten Phytoplankter und sinken zu Boden. Hier werden sie durch Sedimentationsprozesse, vor allem aber durch Remineralisation durch Bakterien abgebaut. Das gelöste remineralisierte Material wird der euphotischen Zone durch vertikale Wasserbewegungen wenigstens teilweise zurückerstattet.

Blüten können verschiedene Auswirkungen auf ihre Umwelt haben. Den Primärkonsumenten stellen sie durch ihre rapide Populationserhöhung mehr Nahrung zur Verfügung. Einige Arten können Toxine produzieren, die auch dann ein Problem sind, wenn die Blüte nicht mehr präsent ist. Durch Verzehr der Alge werden auch die Toxine in die Nahrungskette gebracht und können so dem Menschen gefährlich werden (z.B. beim Essen von Muscheln). Der Abbau solcher Algenblüten kann zu Sauerstoffschwund, faulem Tiefenwasser und im schlimmsten Fall auch zu Fischsterben führen.

Einige marine Phytoplankter produzieren Dimethylsulfoniopropionat (DMSP), das Zwischenprodukt von Dimethylsulfid (DMS). Nach dem Zelltod, viraler Lyse oder durch Fraß durch Primärkonsumenten wird das DMSP in die Umwelt entlassen und wandelt sich in DMS um (s. Kap. 1.2.1). In die Atmosphäre entweichen, tragen diese Schwefelverbindungen zum sauren Regen bei und beeinflussen das globale Klima (Charlson *et al.*, 1987). Vor allem Dinoflagellaten und Haptophyten produzieren DMSP (Keller *et al.*, 1989a, 1989b; Malin *et al.*, 1992). Das intrazellulär gebildete DMSP dient vermutlich der Osmoregulation und als Kälteschutz (Malin *et al.*, 1992).

1.2 Coccolithophoriden

Coccolithophoriden gehören zur Algenklasse der Prymnesiophyceen, Abteilung Haptophyta (Edwardsen *et al.*, 2000). Charakteristisch für diese Ordnung ist die Bildung von kalzifizierten Schalen, Plättchen oder Stäbchen, den sogenannten Coccolithen (Abb. 1.3), die die Zellen oft in mehreren Schichten umgeben können. Vermutlich wegen ihrer Coccolithen haben sie eine höhere Absinkrate als die meisten anderen Phytoplankter derselben Größe (Young *et al.*, 1994). Coccolithophoriden sind ausschließlich marin. Ihre Plastiden enthalten, wie bei allen Haptophyten, Chlorophyll a, c1 und c2 sowie Diatoxanthin, Diadinoxanthin und β , β -Carotine (Jeffrey & Wright, 1994).

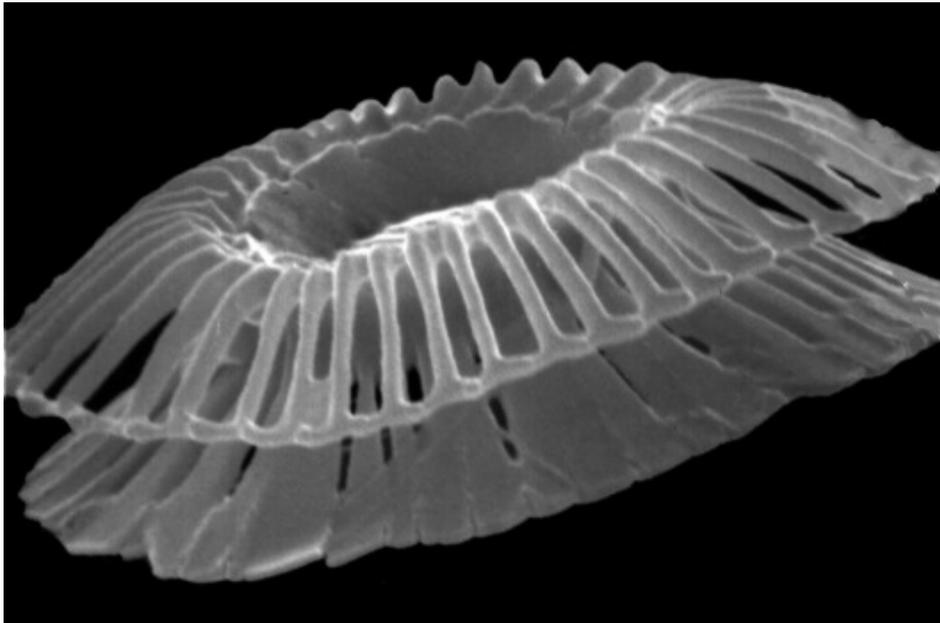


Abb. 1.3: SEM-Bild einer Coccolithe von *E. huxleyi* (<http://www.noc.soton.ac.uk/soes/staff/tt/eh/pics/lithsd1.jpg>).

Coccolithophoriden wurden zum ersten Mal in der späten Trias (vor ca. 225 Millionen Jahren) fossil aufgezeichnet (Brown *et al.*, 2004). Ab dem Jura (vor ca. 150 Millionen Jahren) bildeten sie größere fossile Lagerstätten (Morse & Mackenzie, 1990). Coccolithophoriden stellen wichtige Mikroleitfossilien dar (Young *et al.*, 1994) und sind für die Bildung bestimmter Kalksedimente verantwortlich, wie z.B. den Kreidefelsen von Rügen und Dover.

Durch ihre Fixierung von Kohlenstoff zur Produktion von organischem Material bei der Photosynthese und durch ihre Fähigkeit Coccolithen aus Calcium und Carbonat herzustellen, zählen sie zu den wichtigsten ozeanischen Kalzifizierern des Phytoplanktons (Westbroek *et al.*, 1989, 1993, 1994; Rost & Riebesell, 2004). Nach Milliman (1993) tragen sie zu 50% an der heutigen ozeanischen Kalzitproduktion bei. Weitere wichtige Kalzifizierer im Ozean sind Foraminiferen und Pteropoden. Eine der produktivsten Kalkbildner im Ozean ist die Coccolithophoride *Emiliania huxleyi* (Lohman) Hay und Mohler.

1.2.1 *Emiliania huxleyi*

Fossile Spuren deuten darauf hin, dass die Gattung *Emiliania* vor ungefähr 278.000 Jahren entstanden ist (Thierstein *et al.*, 1977). Vor ca. 70.000 Jahren wurde sie zum dominanten

Vertreter ihrer Ordnung (Bown *et al.*, 2004) und repräsentiert heute eine der wichtigsten im Ozean vorkommenden Coccolithophoriden.

E. huxleyi (Abb. 1.4) ist als Kosmopolit ein wichtiger Vertreter des marinen Phytoplanktons und kommt in allen Ozeanen außer den polaren Ozeanen vor (Winter *et al.* 1994). Ihre Coccolithen werden intrazellulär gebildet und über die Zelloberfläche abgegeben (Westbroek *et al.*, 1984; Young *et al.*, 1999).

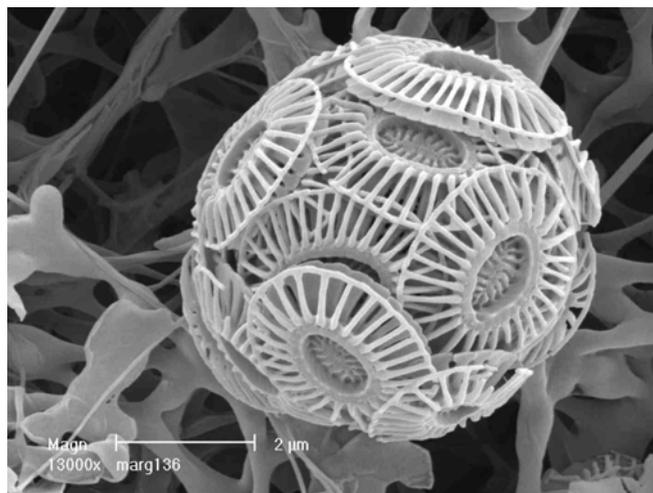


Abb. 1.4: SEM Bild von einer *Emiliana huxleyi* Zelle (www.soes.soton.ac.uk/staff/tt/eh/cellpics.thml).

E. huxleyi ist relativ klein (3 - 10 µm) und kann riesige Algenblüten von sub-polaren bis tropischen Breitengraden bilden (Holligan *et al.*, 1983; Balch *et al.*, 1992; Brown & Yoder, 1994). Anschließend sorgen sie durch ihr Absinken zum Meeresboden für eine beträchtliche Anreicherung von Kalk in den marinen Sedimenten (Eide, 1990; Samtleben & Bickert, 1990; Baumann *et al.*, 2004). Durch ihre reflektierenden Coccolithen können die Blüten sogar von Satelliten beobachtet werden (Holligan *et al.*, 1983; Balch *et al.*, 1991; Abb. 1.5). Sie können eine Größe von vielen Tausend km² bei ca. 1.000.000 Zellen pro ml erreichen (Berge, 1962; Holligan, 1986, 1993; Ackleson *et al.*, 1988; Aiken *et al.*, 1992; Brown & Yoder, 1994; Sukhanova & Flint, 1998). Auffallend dabei ist, dass *E. huxleyi* Blüten vorwiegend in stark stratifiziertem Wasser vorkommen. Dabei ist die durchmischte Schicht nie tiefer als 30 m, sondern meist etwa 10 bis 20 m tief (Robertson *et al.*, 1994; Nanninga & Tyrrell, 1996; Ziveri *et al.*, 2000). Die Blüten finden oft im Hochsommer bei hoher Oberflächenbestrahlung statt (Balch *et al.*, 1991; Fernández *et al.*, 1993). Daraufhin wurde vermutet, dass *E. huxleyi* bevorzugt bei hohen Lichtintensitäten wächst (Baumann *et al.*, 2000; Ziveri & Thunell 2000).



Abb. 1.5: Satellitenaufnahme einer Phytoplankton- Blüte der Coccolithophoride *Emiliana huxleyi* vor Neufundland im westlichen Atlantik (21.06.1999). (www.soes.soton.ac.uk/staff/tt/eh/watl.html).

Ihre ökologische Bedeutung beruht nicht nur auf ihrer weltweiten Verbreitung und ihrer Fähigkeit riesige Blüten zu bilden, sondern auch auf ihrer Emission von DMS (Malin *et al.*, 1994). DMS ist die dominante atmosphärische Schwefelverbindung biogenen Ursprungs (Bates *et al.*, 1992). Beim Eintreten von DMS in die Atmosphäre oxidiert es zu SO_2 und Schwefelsäure und bildet Kondensationskerne, welche die Wolkenbildung (Bates *et al.*, 1987; Charlson *et al.*, 1987; Ayers & Gras, 1991) und somit eine Abkühlung durch Reflexion der Sonneneinstrahlung fördern. Man nimmt an, dass DMSP für die Regulation des osmotischen Drucks in den Planktonzellen zuständig ist (Kirst, 1996) und vor dem Gefrieren schützen kann (Karsten *et al.*, 1992). *E. huxleyi* synthetisiert DMSP wahrscheinlich zum Schutz vor schädlicher UV-Strahlung und Umweltstress.

Sowohl die DMSP Produktion als auch die Erhöhung des Albedos, der auf der Reflexion des Lichtes von den Coccolithen beruht, können den globalen Klimawandel beeinflussen.

Wie bei vielen anderen Mikroalgen können auch Blüten von *E. huxleyi* durch Befall mit Phycoviren zusammenbrechen (Kap. 1.3).

1.3 Viren

In den letzten Jahren wurden signifikante Fortschritte in der Untersuchung von Viren und deren Dynamik und Effekt auf die marine eukaryotische Phytoplanktongemeinschaft gemacht. Viren sind die häufigsten biologischen Vertreter in marinen Gewässern (Bergh *et al.*, 1989; Fuhrmann, 1999; Suttle, 2000; Wommack & Colwell, 2000). Seit 1970 wird berichtet, dass Viren und virus-ähnliche Partikel (VLP) einen systematisch breit gefächerten Bereich aquatischer Algen infizieren (Van Etten *et al.*, 1991; Van Etten & Meints 1999) einschließlich Blüten bildendem marinen Phytoplankton (Nagasaki *et al.*, 1994a, b; Jacobsen *et al.*, 1996; Nagasaki & Yamaguchi, 1997; Sandaa *et al.*, 2001).

Mehrere Studien haben die Rolle der Viren bei der Kontrolle der Blütenbildung von *E. huxleyi* untersucht (Bratbak *et al.*, 1993, 1995, 1996; Brussaard *et al.*, 1996; Castberg *et al.*, 2001; Jaquet *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 1998, 2002a, 2002b). Diese Untersuchungen geben Rückschluss darauf, dass Viren wesentlich an der Blühterminierung von *E. huxleyi* beteiligt sind.

Vor der Küste von Plymouth (UK) und von Bergen (Norwegen) wurden aus *E. huxleyi* Blüten *E. huxleyi*-spezifische Viren (EhV) isoliert (Castberg *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2002b). Basierend auf der Phylogenie ihrer DNA-Polymerase Gene wurden sie einer neuen Gattung, *Coccolithovirus*, zugeordnet (Schroeder *et al.*, 2002). Diese neue Virusgattung hat einen Durchmesser von 170 – 200 nm (Abb. 1.6), eine Genomgröße von ungefähr 410 kb und gehört zu der Familie der *Phycodnaviridae*, die sich durch Viren mit einer icosaedrischen Symmetrie und einer doppel-strängigen DNA auszeichnet, die eukaryotische Algen infizieren (Van Etten *et al.*, 2002).

Unterschiedliche *E. huxleyi* Stämme reagieren verschieden auf Viren, so sind z.B. Stämme mit einer hohen DMSP-lyase Aktivität resistent gegen Virusinfektionen (Schroeder *et al.*, 2002).

Unter den Coccolithoviren ist bisher nur die Genomsequenz des EhV86 bekannt (Wilson *et al.*, in Revision).

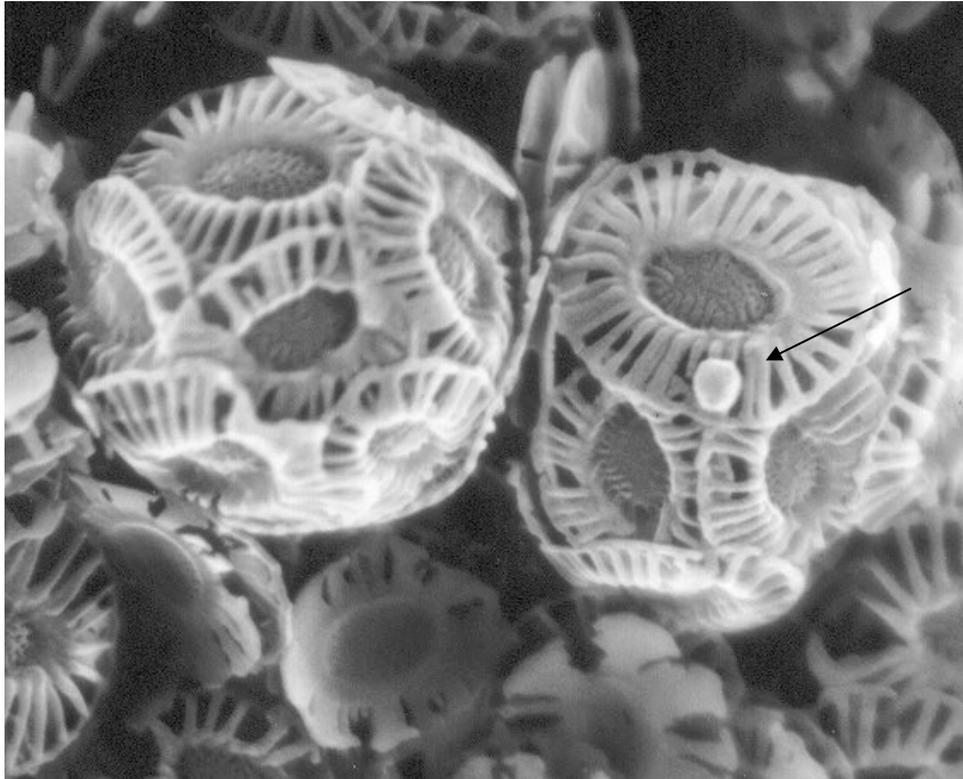


Abb. 1.6: SEM Bild eines Virus, der an der Oberfläche einer *E. huxleyi* Zelle befestigt ist (durch einen Pfeil verdeutlicht). Das Viruspartikel hat einen Durchmesser von ungefähr 180nm (Dr Keith Ryan, Marine Biological Association & Dr Willie Wilson, Plymouth Marine Laboratory). (http://sanger.ac.uk/Info/Press/gfx/050811_ehv-on-ehux-cell.jpg)

1.4 Expressed Sequence Tags (ESTs)

Die Funktionen eines Gens können durch Vergleich mit bekannten Genen aus Datenbanken bestimmt werden. Anhaltspunkte für die Funktion können auch durch die Untersuchung der Genexpression unter verschiedenen Umweltbedingungen hergeleitet werden. Bei den etablierten Verfahren wie z.B. dem Northern Blotting können nur halb-qualitative Aussagen über die Expression einzelner Gene gemacht werden. Anfang der neunziger Jahre führte Craig Venter eine neue Methode der Genexpressionsanalyse ein (Adams *et al.*, 1991, 1993), die auf der Herstellung von *Expressed Sequence Tags* (ESTs) beruht. ESTs sind Teil-Sequenzen von zufällig gewählten cDNA-Klonen, die meist mittels automatischer Sequenzierung gewonnen werden, und auf der Herstellung einer cDNA-Bibliothek basieren. Sie erlauben eine quantitative und skalierbare Auswertung der Ergebnisse, da i.d.R. viele hundert oder Tausend Klone aus einer Bibliothek sequenziert werden. Durch statistische Auswertung der Häufigkeit

der Sequenzen für bestimmte Gene kann man für Gene aus verschiedenen cDNA-Bibliotheken ein Expressionsprofil zu unterschiedlichen Umweltbedingungen erstellen. Dadurch kann man die Herauf- und Herunterregulierung von Genen untersuchen (Schmitt *et al.*, 1999) oder Genexpressionsmuster unter verschiedenen Bedingungen miteinander vergleichen (Rafalski *et al.*, 1998).

1.5 Zielstellung

Die marine Coccolithophoride *Emiliana huxleyi* ist weltweit verbreitet und für die Bildung von riesigen Blüten bekannt (Holligan *et al.*, 1993). Die Produktion von Coccolithen aus Calciumcarbonat, ihrer Rolle im CO₂-Zyklus und ihre Emission von DMS macht sie zu einer besonders wichtigen Art in Bezug auf mariner Primärproduktion, Sedimentformation und Klimawandel (Charlson *et al.*, 1987; Westbroek *et al.*, 1993; Malin *et al.*, 1994). *E. huxleyi* spielt eine Schlüsselrolle in globalen biogeochemischen Zyklen (Westbroek *et al.*, 1994). Untersuchungen über die Rolle von Viren bei der Kontrolle der Blütenbildung von *E. huxleyi* haben ergeben, dass Viren wesentlich an deren Blütenterminierung beteiligt sind (Bratbak *et al.*, 1993, 1996; Brussaard *et al.*, 1996; Wommack & Colwell, 2000; Castberg *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2002a).

Die Ziele der vorliegenden Diplomarbeit waren zum einen bei der Coccolithophoride *Emiliana huxleyi* grundlegende Erkenntnisse des Wachstumsverhalten zu erlangen und die RNA-Isolierung zu optimieren, zum anderen erste Erkenntnisse über die Interaktion zwischen dem Virus EhV86 und *E. huxleyi*, mit Schwerpunkt auf Ebene der Genexpression, zu gewinnen. Der molekularbiologische Aspekt stand bei dieser Arbeit im Vordergrund.

Für die Untersuchung der Genexpression, speziell aus virusinfizierten Kulturen, deren Virusgenom bekannt ist, bietet sich besonders die Herstellung von ESTs an. ESTs können die Art und Menge der viralen Transkripte und die des Wirtes zum jeweiligen Zeitpunkt angeben. Aufgrund dessen kann eine Aussage über die Wirkung des Virus auf das Expressionsmuster des Wirtes *E. huxleyi* getroffen werden.

Zu Beginn der Arbeit waren drei *E. huxleyi* cDNA-Bibliotheken nach *EhV86*-Virusinfektion vorhanden. Ziel der Arbeit war deshalb die Erstellung einer cDNA-Bibliothek aus uninfizierten *E. huxleyi* Kulturen und der Vergleich aller Banken durch Sequenzierung und phylogenetische Auswertung. Für die Erstellung der cDNA-Bibliothek vor Virusinfektion musste das Wachstumsverhalten des von uns verwendeten *E. huxleyi* Stammes (CCMP1516) genauer untersucht und die RNA-Isolierung optimiert werden. Anschließend sollten aus allen cDNA-Bibliotheken einige hundert Klone gepickt und sequenziert werden. Diese ESTs sollten durch Sequenzanalyse mit dem Programm PhyloGena miteinander verglichen werden. Ziel waren zum einen Erkenntnisse zu den Unterschieden im Expressionsmuster von *E. huxleyi* Genen vor und während Virusbefall. Der Anteil der Virustranskripte am gesamten Transkriptom der Wirt-Virus Interaktion im zeitlichen Verlauf der Infektion sollte abgeschätzt werden. Dazu stand die Genomsequenz des Virus *EhV86* zur Verfügung. Des Weiteren sollten die Virusgene identifiziert werden, die während der Infektion aktiv sind, um daraus Schlüsse auf die Mechanismen der Infektion ziehen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Allgemein

- Reaktionsgefäße: 0.5, 1.5 und 2.0 ml, Eppendorf, Deutschland
- Spritzen: 10, 30 und 50 ml, Norn-Ject, Henke Sass Wolf GmbH, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen: 15 und 50 ml, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Deutschland
- Pinzetten
- Pipetten: 10, 20, 100, 200 und 1000 µl, Eppendorf, Deutschland / Gilson, Frankreich
- Pipettenspitzen: epT.I.P.S. PCR clean, Eppendorf, Deutschland / SafeSeal-Spitzen[®], Biozym budget line, Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland
- Chemikalien: Alle Chemikalien waren pro Analysis und produziert von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland. Ethanol 100%, K₂HPO₄ und NA₂HPO₄ x 2 H₂O waren von MERCK KgaA, Deutschland produziert. (Spezielle Chemikalien siehe unten)

Algenkultivierung

- Filter: Midisart[®] 2000 (Sterilfilter), 0,20 µm Porenweite, Sartorius, Deutschland
- Vakuumpumpe: Masterflex[®] Easy-Load[®], Cole-Parmer[®], Novodirect, GmbH, Deutschland
- Kolben: 1 und 5l
- Filter
- Schläuche und Stopfen
- Zellkulturflaschen (250 ml), CORNING[®], Corning Inc., USA
- Lichtthermostat, RUMED, Rubarth Apparate GmbH, Deutschland
- LI-COR Radiation Sensor, Typ LI-1000, LI-COR[®] Biosciences, USA

Wachstumsmessungen

- 20 ml Probengefäße, Beckman Coulter[™], Beckman Coulter GmbH, Deutschland
- Coulter[®] Isoton[®] II Diluent, Beckman Coulter[™], Beckman Coulter GmbH, Deutschland
- Multisizer[™] 3 COULTER COUNTER[®], Beckmann Coulter[™], Beckman Coulter

GmbH, Deutschland

- 5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol, Becton Dickinson Labware Europe, Frankreich
- FACSCalibur, Becton Dickinson, Deutschland

RNA-Isolierung

- Filteraufsätze
- 3-fach Filtriergestell
- Vakuumpumpe: KNF Neuburger, Typ NO35 AN 18, P_{max} 4.0 bar, Deutschland
- Filter: ISOPORETM Membranfilter, 25 mm Durchmesser, 1,2 µm Porenweite, Millipore, Irland
- Cryo-Röhrchen, Nalgene[®] System, Nalgene[®] Brand Products, Nalge Company, USA
- 0,2 µm filtriertes Seewasser
- Flüssiger Stickstoff
- RNaqueous[®], Ambion, Inc., USA
- RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Deutschland
- RNase-Free DNase Set, Qiagen, Deutschland
- β-Mercaptoethanol, MERCK KgaA, Deutschland
- Mini-BeadbeaterTM, Biospec products, Biospec products Inc, USA
- Zentrifuge: Biofuge pico, Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Deutschland
- Photometer: Eppendorf Biophotometer, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland
- Thermoshaker, Schutron, CLF Laborgeräte, Deutschland
- Agilent 2100 Bioanalyzer, RNA Nano Chip, Agilent technologies, Deutschland

mRNA-Isolierung

- Oligotex mRNA Mini Kit, Qiagen, Deutschland
- Thermoshaker, Schutron, CLF Laborgeräte, Deutschland
- Agilent 2100 Bioanalyzer, RNA Pico Chip, Agilent technologies, Deutschland

LiCl-Fällung

- Lithium-Chlorid-Lösung, aus dem RNaqueous Kit, Ambion, Inc., USA
- 70%iges, eiskaltes Ethanol

cDNA-Bibliothek Herstellung

- CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit, Invitrogen™ life technologies, Invitrogen GmbH, Deutschland
- Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland
- 0,5 M EDTA, pH 8.0, Ambion, Inc., USA
- Phenol:chloroform:isoamyl Alkohol (25:24:1), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- 7,5 M NH₄Oac (Ammoniumacetat), MERCK KgaA, Deutschland
- 70 und 100%iges Ethanol
- Trockeneis
- TEN Puffer (10mM Tris-HCL, pH 7.5; 0.1 mM EDTA; 25 mM NaCl)
- TE Puffer (10mM Tris-HCL, pH 8.0; 1 mM EDTA)
- SYBR® Green Nucleic Acid Gel Stain, Molecular Probes™, invitrogen detection technologies, Invitrogen™ life technologies, Invitrogen GmbH, Deutschland
- elektrokompetente Zellen, DH10B™ – T1^R, ElectroMAX™ Competent Cells, T1 Phage Resistent Cells, Invitrogen™ life technologies, Invitrogen GmbH, Deutschland
- Gene Pulser Cuvette, 0.1 cm elektrode, BioRad, CA
- Elektroporator: BioRad Gene Pulser® II, BioRad, CA
- Inkubatorshaker: Innova™ 4080, New Brunswick Scientific GmbH, Deutschland
- Gefriermedium (60% S.O.C. Medium : 40% Glycerol)
- LB (Luria-Bertani)-Medium (Herstellung siehe Anhang)
- 24 LB-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin
- 2 LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin

Vorbereitung für die Sequenzierung

- sterile Zahnstocher oder Pipettenspitzen
- 2 ml –Assay Block, 96 Deep-Well-Platte (Polypropylene), Corning Inc., USA
- Hefeextrakt, Omnilab Laborzentrum GmbH & Co. KG, Deutschland
- AirePore™ Tape Sheet, Qiagen, Deutschland
- R.E.A.L. Prep 96 Plasmid Kit, Qiagen, Deutschland
- NanoDrop® ND-1000 Spectrometer, peQLab, Biotechnologie GmbH, Deutschland
- Restriktionsenzym *Bsr*G I, Ne Puffer und BSA, New England Biolabs® Inc., US
- DNA Ladder, Directload™, 1 kb, SIGMA®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Deutschland

- Agarose-LE, Ambion, Inc., USA
- Elektrophorese-Apparatur, Sub-Cell[®] GT, BioRad Laboratories Inc., CA
- Photo-Imager, Vilbert Lourmat
- ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, USA
- ABI PRISM[®] Big Dye[®] Terminator v1.1 / 3.1 Sequencing Buffer (5x), Applied Biosystems, USA
- Molekularbiologisches Wasser, Eppendorf, Deutschland
- M13 forward Primer, MWG-Biotech AG, Deutschland
- Mastercycler, Eppendorf, Deutschland
- DyeEx 96 Kit, Qiagen, Deutschland

Sequenzierung

- ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA

2.2 Algenkultur

Für die Experimente wurde der Stamm CCMP1516 der Coccolithophoride *Emiliana huxleyi* (Lohmann) Hay und Mohler verwendet. Der seit Februar diesen Jahres am Alfred-Wegener-Institut (AWI) kultivierte Stamm wurde 1999 aus einer Blüte vor Plymouth (UK) aus dem Englischen Kanal durch das *Plymouth Marine Laboratory* (PML) isoliert. Dieser Stamm ist ein guter Wirt für die meisten bisher isolierten Coccolithoviren (Schroeder *et al.*, 2002).

2.3 Virus

Für die Infektion von *E. huxleyi* wurde der Virus *EhV86* verwendet, da dessen Genomsequenz bekannt war (Wilson *et al.*, in Revision).

2.4 Kultivierung

Bei allen Experimenten wurde *Emiliana huxleyi* in F/2-Medium (s. Anhang; nach Guillard, 1975), basierend auf antarktischem Wasser, kultiviert.

Die Kultivierung erfolgte bei 15°C, einem 16:8 Hell-/Dunkelzyklus mit einer Lichtintensität von 150 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2\text{s}$ (kontrolliert durch LI-COR Radiation Sensor, Typ LI-1000), einem pH-Wert von 8.0 und einer Salinität von ca. 33 PSU.

2.4.1 Vorexperimente

Zur Ermittlung des Wachstumsverhaltens wurden jeweils drei Parallelen mit vier verschiedenen Anfangszellzahlen (50, 500, 5.000 und 50.000) in 250 ml Plastikkulturflaschen kultiviert.

Um erste Erkenntnisse über die Methode der RNA-Isolierung zu gewinnen und diese zu optimieren, wurden Kulturen in 250 ml Plastikkulturflaschen, mit einer Anfangszellzahl von ca. 100.000 Zellen/ml, angesetzt, die Mitte der exponentiellen Phase geerntet wurden.

2.4.2 Hauptexperiment

Für die RNA-Isolierung und für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek wurden 2 Parallelen in 5 l-Kolben mit einer Anfangszellzahl von 5000 Zellen/ml angesetzt. Die 5 l-Kolben waren mit einem Stopfen verschlossen, der mindestens einen Außenfilter hatte und einen Schlauch, der bis zum Boden des Kolbens reichte. Dieser Schlauch diente der Probenentnahme.

2.5 Wachstumsmessung

Vor der Entnahme wurden die Algen durch sanftes Schwenken der Kulturflaschen vermischt und vom Boden gelöst. Es wurde solange geschwenkt, bis die Zellen komplett vom Boden gelöst und gut verteilt waren. Die Probenentnahme erfolgte bei den 250 ml Plastikkulturflaschen durch Pipetten, bei den 5 l-Kolben durch sterile Einmalspritzen.

2.5.1 Zellzahlbestimmung mittels Beckman Coulter Counter

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte durch das Coulter Prinzip mittels dem Multisizer 3 COULTER COUNTER.

Das Coulter Prinzip basiert auf messbaren Veränderungen im elektrischen Widerstand, die durch nichtleitende Partikel, die in einer elektrolytischen Lösung suspendiert sind, produziert werden (<http://www.beckman.com/products/instruments/partChar/technology/CoulterPrinciple.asp>).

Um die Anzahl und Größe der Zellen pro ml zu bestimmen, wurde dreimal ein Volumen von 500 µl gemessen. Die Größe der gemessenen Partikel reichte von 2.2 µm bis 10 µm.

Da die optimale Messung bei einer Zellkonzentration zwischen 10.000 und 20.000 Zellen/ml liegt, wurde die Verdünnung der erhaltenen Zellkonzentration angepasst und variierte zwischen 1:1 und 1:200. Die Verdünnungen erfolgten mit ANT-F/2-Medium oder Isoton. Das angesetzte Volumen für die Messung betrug 20 ml.

2.5.2 Zellanalyse mittels Durchflusscytometer (FACS)

Die Durchflusscytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting / Scan) dient der quantitativen Analyse von Zellsuspensionen anhand zellspezifischer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die zu untersuchenden Zellen gelangen durch einen Aufbau von Überdruck im Probenröhrchen in einem Flüssigkeitsstrom in die Messküvette. Dort werden die Zellen von einem fokussierten Argon-Ionen-Laserstrahl erfasst. Das entstehende Streulicht wird durch zwei Lichtdetektoren registriert. Durch Lichtbeugung und -streuung werden Informationen über die Zelle gewonnen.

Das Durchflusscytometer diente zur Wachstumsmessung sowie zur Kontrolle, ob die Algen axenisch wachsen. Bei der Messung der Zellen wurden folgende Partikelparameter erfasst:

1. Größe (Vorwärtsstreulicht, forward light scatter, FSC)
2. Granularität (Seitwärtsstreulicht, side scatter, SSC)
3. Fluoreszenz (FL1) bei einer Wellenlänge von 515-545 nm zur Ermittlung von Chlorophyll
4. Fluoreszenz (FL3) mit einer Wellenlänge über 650 nm zur Ermittlung von Xantophyllen

Die verschiedenen Parameter wurden in einer Punktgrafik (Dot-Plot) grafisch dargestellt. Es korrelierten jeweils zwei verschiedene Parameter miteinander.

Die Messung am FACSCalibur erfolgte unter Verwendung der CELLQuest™ Software (Becton Dickinson) ausschließlich bei den Proben der 5 l Kolben und nur bis zum Ende der Zellprobennahme für die RNA-Isolierung.

Die Einstellungen MED und HI stellen die Durchflussrate dar: je höher die Algendichte, desto geringer die Durchflussrate. Das Volumen bei der Einstellung HI beträgt $60 \mu\text{l} \pm 7 \mu\text{l} / \text{min}$, bei MED $35 \mu\text{l} \pm 5 \mu\text{l} / \text{min}$. Daraus ergibt sich ein Faktor von 17 ± 2 bei HI und bei MED einer von 29 ± 4 . Um eine Zellzahl pro ml zu erhalten, multipliziert man das gemessene Ergebnis mit dem dazugehörigen Faktor.

2.6 Zellprobennahme

Die Zellen der 250 ml Kulturen, die Mitte der exponentiellen Phase geerntet wurden, wurden durch Zentrifugation (4000 rpm, 5 min) in einem 50 ml Falcontube gesammelt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen danach sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Nachdem alle Proben verarbeitet waren, erfolgte die RNA-Isolierung.

Für die RNA-Isolierung der 5l-Kulturen erfolgte die Probennahme ab Anfang der exponentiellen bis Anfang der stationären Wachstumsphase.

Mit einer 50 ml Spritze wurde die Probe aus den 5 l Kulturen entnommen. Die Proben wurden in einem bzw. zwei sterilen 250 ml-Erlenmeyerkolben gesammelt.

Die Zellen wurden mittels Vakuumfiltration auf ISOPORE™ Membranfilter geerntet. Pro Kultur wurden vier Proben genommen. Nach jeweils 20 ml Kultur wurde mit sterilfiltriertem Seewasser gespült. Das Volumen der Proben variierte zwischen 30 ml und 100 ml (Tab. 2.1). Der Filter wurde mit einer sterilen Pinzette einmal gefaltet, in ein Cryo-Röhrchen transferiert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zur Analyse wurden alle Proben bei –80°C aufbewahrt.

Tab. 2.1: Verwendetes Kulturvolumen zur Probenextraktion für die RNA-Isolierung von *Emiliana huxleyi*.

Probentag	Stamm CCMP1516
A	100 ml
B	50 ml
C	50 ml
D	50 ml
E	50 ml
F	50 ml
G	50 ml
H	30 ml

2.7 Genbibliotheken

Zur Isolierung von Genen oder Genfragmenten dient als Ursprung eine Genbibliothek. Diese repräsentiert einen Pool rekombinanter Klone, in der als DNA Fragmente die gesamte genetische Information eines Organismus oder Teile davon vorliegen. Die DNA-Fragmente sind in Vektormoleküle integriert. Es gibt zwei verschiedene Typen von Genbibliotheken: Genomische und cDNA-Bibliotheken. Diese Arbeit beruht auf der Herstellung von cDNA-Bibliotheken, deren Vorteil darin besteht, dass sie keine Introns enthalten.

Zuerst wird die gesamte RNA aus den Zellen isoliert. Anschließend erfolgt eine Abtrennung der mRNA von den anderen RNA-Spezies (Kap. 2.7.2). Daraufhin wird die mRNA durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, durch Klonierung vermehrt und letztendlich sequenziert.

Die ESTs vor und nach Virusinfektion wurden mittels dem Programm PhyloGena (Kap. 2.7.6.3) analysiert und anschließend miteinander verglichen.

2.7.1 RNA-Isolierung

In Mesokosmos Experimenten wurden in Plymouth Blüten des *E. huxleyi*-Stammes CCMP1516 simuliert und durch Zugabe des Virus *Ehv86* terminiert. Parallel dazu wurden durch Dr. Mike Allen Proben genommen und RNA aus *E. huxleyi* isoliert.

2.7.1.1 Vorexperimente

Zuerst wurden für die RNA-Isolierung aus *Emiliania huxleyi* zwei verschiedene Kits verglichen:

1. RNaqueous (Ambion)
2. RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

Bei beiden erfolgte die Isolierung strikt nach Protokoll. Aufgrund der einfacheren Durchführung wurde für alle weiteren Proben das Kit von Qiagen genommen.

Bei der RNA-Isolierung durch Qiagen werden die Zellen zuerst lysiert und die RNasen inaktiviert. Anschließend wird die Gesamt-RNA auf eine Mini Chromatographie Säule gebunden und es folgen mehrere Waschstritte. Zum Schluss wird die RNA von der Säule

eluiert.

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Mikrozentrifuge (Heraeus) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Das Protokoll kann in folgende Schritte unterteilt werden:

1. Lysierung und Inaktivierung der RNasen: Durch Zugabe von 450 μ l RLT Puffer (Zu 1 ml RLT Puffer wurden 10 μ l β -Mercaptoethanol zugegeben) und 1 min vortexen wurden die Zellen vom Filter gelöst und lysiert. Das Guanidinisothiocyanat, welches die RNasen inaktiviert, ist im Puffer enthalten. Um eine erfolgreiche Lyse der Zellen zu bewirken, wurde auch mit Glaskügelchen und einem Bead-beater experimentiert, die jedoch keine Verbesserungen der Ergebnisse ergaben.

2. Entfernung von Zelltrümmern und Polysaccharidkontaminationen: Die lysierten Zellen wurden auf die QIAshredder Spin Säulen geladen und bei der ersten Isolierung für 2 min, bei allen anderen für 15 min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen und Polysaccharide zu separieren.

3. Binden der RNA: Zu dem Überstand aus Schritt 2 wurde in einem neuen Reaktionsgefäß das halbe Volumen (225 μ l) an 100%igem Ethanol dazugegeben. Das Gemisch wurde auf eine Mini Spin Säule geladen und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert, um die RNA an die Säule zu binden. Der Überstand wurde verworfen.

4. Waschschritte: Zuerst wurde die Säule mit 700 μ l RW1 Puffer gewaschen und bei 10000 rpm für 15 s zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe zweimal mit 500 μ l RPE Puffer gewaschen. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Der letzte Zentrifugationsschritt betrug 2 min bei max. Geschwindigkeit (13.000 rpm), um auch die letzten Reste des RPE Puffers von der Säule zu entfernen.

5. Eluierung der Gesamt-RNA: Die RNA wurde mit 35 μ l (später mit 40 μ l) RNase freiem Wasser durch 1 min zentrifugieren von der Säule eluiert. Das Eluat wurde anschließend noch mal auf die Säule gegeben und für eine weitere Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert.

Wie schon erwähnt, wurden zur Optimierung der RNA-Isolierung durch verschiedene Varianten Kulturen angesetzt, die Mitte der exponentiellen Phase geerntet wurden.

Zuerst wurde das oben beschriebene RNeasy-Protokoll durchgeführt jedoch mit zweimal 30 μ l Elutionslösung. Danach erfolgte ein DNase I Verdau im Reaktionsgefäß (3 μ l DNase + 6 μ l RDD Puffer), der für eine Stunde bei 30°C inkubierte. Anschließend wurden immer zwei

Proben miteinander vereinigt und noch einmal mit dem RNeasy-Protokoll aufgereinigt. Diesmal wurde jedoch nach dem 3. Schritt ein DNase I Verdau über die Säule (Skript) durchgeführt. Das Eluat (30 µl) wurde zweimal über die Säule gegeben.

2.7.1.2 RNA Isolierung zur Herstellung einer cDNA-Bibliothek

Das endgültige Protokoll für die zurzeit optimale RNA-Isolierung bei *Emiliana huxleyi* wird in den folgenden Punkten erläutert:

1. **Lysierung und Inaktivierung der RNasen:** Durch Zugabe von 450 µl RLT Puffer und 30 - 60 s vortexen wurden die Zellen vom Filter gelöst und lysiert.
2. **Entfernung von Zelltrümmern und Polysaccharidkontaminationen:** Die lysierten Zellen wurden auf die QIAshredder Spin Säule gegeben und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 rpm) zentrifugiert
3. **Binden der RNA:** Zu dem Überstand aus Schritt 2 wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß das halbe Volumen (225 µl) an 100%igem Ethanol dazugegeben. Das Gemisch wurde auf eine Mini Spin Säule geladen und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert, um die RNA an die Säule zu binden. Der Überstand wurde verworfen.
4. **Waschschritte:** Die Säule wurde zweimal mit 700 µl RW1 Puffer gewaschen. Nach Zugabe des Puffers wurde eine Minute gewartet, bevor bei 10.000 rpm für 15 s zentrifugiert wurde. Anschließend wurde die Probe zweimal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen und jeweils für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Um auch die letzten Reste des RPE Puffers von der Säule zu entfernen, wurde die Probe ohne Puffer für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 rpm) zentrifugiert.
5. **Eluierung der Gesamt-RNA:** Die RNA wurde zweimal mit 30 µl RNase freiem Wasser durch 1 min Zentrifugieren bei 10.000 rpm von der Säule eluiert, so dass sich ein Endvolumen von 60 µl ergab.
Anschließend wurde die RNA-Konzentration im Photometer gemessen.
6. **RNA Aufreinigung:** Das Volumen der Probe wurde mit RNase-freiem Wasser auf 100 µl angepasst. Anschließend wurden 350 µl RLT Puffer zugegeben und kurz gevortext. Es folgte eine Zugabe von 250 µl 100%igem Ethanol. Die Probe wurde auf eine RNeasy mini Säule gegeben und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert.

7. **DNase I Verdau über die Säule:** Auf die Säule wurden 350 µl RW1 Puffer gegeben und bei 10.000 rpm 15 s zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde eine Mischung aus 10 µl DNase I Stocklösung und 70 µl RDD Puffer auf die Säule gegeben und für 15 min bei 25°C in einem Thermomixer inkubiert.
8. **Waschschritte:** Nach der 15 minütigen Inkubationszeit wurde einmal mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen und bei 10.000 rpm für 15 s zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen, wobei der erste Zentrifugationsschritt (10.000 rpm) nur 15 s, der zweite dagegen 2 min betrug. Um den RPE Puffer vollständig von der Säule zu entfernen, wurde die Probe ohne Puffer für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 rpm) zentrifugiert.
9. **Eluierung der Gesamt-RNA:** Um die Gesamt-RNA zu eluieren, wurden 30 µl RNase-freies Wasser zweimal über die Säule gegeben. Zentrifugiert wurde jeweils für eine Minute bei 10.000 rpm.

2.7.1.3 Qualitäts- und Quantitätskontrolle

Anfangs wurde die Konzentration und die Reinheit der RNA mit einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Absorptionen bei 280 nm (A_{280}) und 230 nm (A_{230}) messen Kontaminationen von Proteinen, Kohlenhydraten, Phenolen und Aromaten (Sambrook & Russel 2001). Die Verhältnisse A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} geben Rückschluss auf die Reinheit der RNA-Proben (http://www.eppendorf.com/biophotometer/download/tipps_tricks_biophotometer_e.pdf).

Die Messung erfolgte in einem Mischungsverhältnis von 3 µl Probe und 57 µl RNase-freiem Wasser oder DEPC-Wasser. Beim Mischen musste aufgepasst werden, dass sich keine Luftblasen entwickelten.

Am Ende erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (unter Verwendung von RNA NanoChips), da dieser nur 1 µl der Probe benötigt und die ribosomalen Peaks mit aufzeigt.

Funktion:

Durch Laser-induzierte Fluoreszenz weist der Agilent 2100 Bioanalyzer Biomoleküle nach. Auf jedem LabChip[®] befinden sich untereinander verbundene Mikrokanäle. Durch diese Mikrokanäle werden, basierend auf ihrer Größe, Nukleinsäurefragmente elektrophoretisch

aufgetrennt. Während der Chip-Vorbereitung werden die Kanäle des Chips mit einer Gel-Farbstoff-Mischung gefüllt. Anschließend wird zuerst in jede Tasche ein Marker gegeben, danach werden die Taschen mit 12 Proben und dem RNA 6000 Ladder (Ambion) beladen. Während des Laufs interkaliert der Farbstoff direkt mit den Proben und die Fragmente passieren den Detektor mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Um die RNA-Konzentration der unbekannt Proben zu bestimmen und die ribosomalen RNA-Spitzen zu identifizieren, vergleicht die Software automatisch die unbekannt Proben mit den Ladder-Fragmenten (<http://biomicro.mit.edu/forms/FAQ%20for%20Bioanalyzer%20service%20RNA012804.pdf>).

2.7.2 mRNA-Isolierung

Um die mRNA aus der gesamten RNA herauszufiltern, nutzt man die Tatsache, dass eukaryotische mRNA am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz besitzt. Die Abtrennung der mRNA erfolgt über Affinitätschromatographie.

Die mRNA-Isolierung wurde auf chemischen Wege mit dem Oligotex mRNA Mini Kit durchgeführt. Dafür wurden immer zwei RNA-Proben zusammengegeben und anschließend mit RNase-freiem Wasser (190 µl) auf ein Startvolumen von 250 µl gebracht.

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Mikrozentrifuge (Heraeus) bei Raumtemperatur und bei 13.000 rpm durchgeführt.

Das Protokoll kann in folgende Schritte eingeteilt werden:

1. **Bindung der mRNA:** Zu der Gesamt-RNA wurden 250 µl OBB Puffer und 15 µl Oligotex Suspension (auf 37°C erhitzt, gevortext und bei RT gelagert) zugegeben. Um sekundäre Strukturen der RNA zu zerstören, wurde die Probe für 3 min bei 70°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Dieser Schritt erlaubt die Hybridisation zwischen dem Oligo dT₃₀ des Oligotexpartikel und dem Poly-A-Schwanz der mRNA. Nach der Inkubation wurde der mRNA-Oligotex-Komplex für 2 min pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen.
2. **Waschschritte:** Das Pellet des mRNA-Oligotex-Komplexes wurde mit 400 µl OW2 Puffer resuspendiert und anschließend auf eine kleine Spin Säule gegeben und für 1 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte ein erneuter Waschschritt mit 400 µl OW2 Puffer bei gleichen Zentrifugationsbedingungen.

3. **Elution:** Zum Eluieren der mRNA wurden 50 µl heißer (70°C) OEB Puffer auf die Säule gegeben, kurz hoch und runter pipettiert und anschließend für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde wieder auf 70°C erhitzt und noch einmal auf die Säule transferiert.

Nach der Isolierung wurde die mRNA im Bioanalyzer auf einem Pico-Chip gemessen. Um später eine cDNA-Bibliothek zu erhalten, die über exprimierte Gene der exponentiellen und der stationären Phase verfügt, wurde die mRNA der verschiedenen Wachstumsstadien gepoolt. Dazu wurde von jedem Wachstumstag die gleiche Menge an mRNA eingesetzt. Anhand der mit dem Bioanalyzer gemessenen Konzentrationen wurde das benötigte Volumen berechnet.

2.7.3 LiCl-Fällung

Zu der gepoolten mRNA, die ein Volumen von 339,4 µl hatte, wurde das halbe Volumen an Lithiumchlorid (190 µl) dazugegeben. Die Mischung inkubierte über Nacht bei -20°C. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugieren in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf) bei einer maximalen Geschwindigkeit von 14.000 rpm für 60 min bei 4°C am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Anschließend folgten drei Waschschrte mit jeweils 100 µl eiskaltem 70%igem Ethanol. Nach der Zugabe von Ethanol wurde bei 14.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde mit einer Pipette abgenommen. Die RNA wurde am Ende bei 40°C in einem offenen, horizontal liegenden Reaktionsgefäß im Thermocycler getrocknet.

Die LiCl-Lösung war in dem RNAqueous Kit enthalten.

2.7.4 Herstellung der cDNA-Bibliotheken

2.7.4.1 *E. huxleyi* nach Virusinfektion

Aus der in Plymouth isolierten RNA wurden drei Zeitpunkte (6 Std., 12 Std. und 24 Std.) nach Virusinfektion ausgewählt, aus denen jeweils eine cDNA-Bibliothek bei der Firma vertis Biotechnologie AG (Freising, Deutschland) hergestellt wurde (siehe Zertifikate im Anhang). Für das Klonieren wurde die cDNA in den Plasmidvektor pBS II sk+ (*Eco* RI und *Bam* HI

Seite) ligiert und anschließend in elektro-kompetente Zellen elektroporiert (T1 Phage resistent TransforMax™ EC100™-T1^R).

2.7.4.2 *E. huxleyi* vor Virusinfektion

Die cDNA-Bibliothek der nicht-infizierten Alge *E. huxleyi* wurde mit dem CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit (Invitrogen) hergestellt.

Die Herstellung erfolgte nach den Angaben in dem Skript für $\leq 1\mu\text{g}$ mRNA. Als Kontrolle diente die 2.3 kb RNA, welches ein *in vitro* Transkript ist und das Tetracyclinresistenzgen und seinen Promoter (Tc^r) enthält.

Das Protokoll kann in folgende Schritte unterteilt werden:

1. **Erststrangsynthese:** Zuerst wurde an den Poly-A-Schwanz der mRNA der Biotin-*attB2*-Oligo(dT) Primer (5'-Biotin-GGCGGCCGCACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGT (T)₁₉-3') hybridisiert. Der mRNA-Primer-dNTPs-Mix wurde für 5 min auf 65°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen und auf 45°C für 2 min abgekühlt, damit die Primer hybridisieren konnten. Anschließend erfolgte die Erststrangsynthese durch die Superscript™ II Reverse Transcriptase, wobei die mRNA als Schablone diente. Während der Zugabe der Reversen Transcriptase wurden die Proben bei 45°C aufbewahrt. Daran schloss sich eine Inkubation bei 45°C für 60 min an.
2. **Zweitstrangsynthese:** Die Zugabe der Reagenzien erfolgte auf Eis. Der Zweitstrang wurde durch die *Escherichia coli* DNA Polymerase I hergestellt. Die RNA-Hydrolyse erfolgte durch die *E. coli* RNase H. Die Inkubation betrug 2 Stunden bei 16°C. Um stumpfe (*blunt-ended*) Enden der cDNA zu erzeugen, erfolgte nach der Inkubation eine Zugabe von T4 DNA Polymerase. Die Enzymreaktion wurde mit 0.5 M EDTA, pH 8.0 gestoppt. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform Extraktion, nach der sich eine Ethanol-fällung anschloss.
3. **Ligation des *attB1* Adapters:** Während einer Inkubation von 16-24 Stunden bei 16°C wurde der *attB1* Adapter (Tab. 2.2) durch die T4 DNA Ligase an das stumpfe 5'-Ende der cDNA ligiert.

Tab. 2.2: Sequenz des *attB1* Adapter. Die *attB1* Sequenz ist in fett gedruckt

<i>attB1</i> Sequenz
5' - TCGTCGGGGACA ACTTTGTACAAAAAAGTTGG - 3'
3' - CCCCTGTTGAAACATGTTTTTTCAACCp - 5'

4. **Größenfraktionierung durch Säulen-Chromatographie:** Um möglichst große cDNA Fragmente (> 500 bp) zu bekommen, wurden Säulen verwendet, die 1 ml Sephacryl[®] S-500 HR Harz enthalten. Überreste von Adaptern und kleine cDNAs (< 500 bp) werden durch das poröse Harz eingefangen. Dadurch, dass große Moleküle das Harz umgehen, eluieren sie schneller. Kleine Moleküle dagegen dringen in das Harz ein und eluieren sehr viel langsamer.

Die Ligase wurde durch Inkubieren bei 70°C für 10 min inaktiviert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert. Die Säulen wurden vor der Fraktionierung viermal mit 800 µl TEN Puffer gewaschen. Pro Probe wurden jeweils 20 sterile 1.5 ml Reaktionsgefäße verwendet. Zu der Probe wurden 100 µl TEN Puffer gegeben und anschließend auf die Säule transferiert. Im ersten Reaktionsgefäß wurde das gesamte Eluat gesammelt. Danach erfolgte eine Zugabe von 100 µl TEN Puffer direkt auf die Säule. Das gesamte Eluat wurde im zweiten Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend schloss sich eine erneute Zugabe von 100 µl TEN Puffer an. Diesmal wurde das Eluat tropfenweise in den Reaktionsgefäßen 3 – 20 gesammelt. Um die Konzentration und Menge der erhaltenen cDNA Fraktionen zu bestimmen, wurde zuerst das Volumen in jedem Reaktionsgefäß bestimmt und addiert. Alle Fraktionen über einem Gesamtvolumen von 600 µl wurden für die weiteren Tests nicht mehr verwendet, da diese eine erhöhte Menge an *attB1* Adapter enthielten. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung auf 1%igen Agaroseplatten. Dabei wurden von jeder Fraktion 1 µl aufgetragen. Als Vergleichswert wurde eine Verdünnungsreihe der pEXP7-tet Control DNA angesetzt (1, 5, 10, 25 und 50 ng/µl) und jeweils 1 µl auf die Platte aufgetragen. Bevor auf die Proben ca. 15 ml SYBR[®] Green (1:10 Verdünnung in TAE Puffer) gegeben wurden, erfolgte eine Trocknung bei RT für 20 min. Nach der Zugabe von SYBR[®] Green wurden die Platten in Alufolie eingewickelt und für 30 min auf einem Shaker geschüttelt. Anschließend wurde das SYBR[®] Green abgegossen, die Platten für 10 min bei RT getrocknet und unter UV-Licht visualisiert. Die Konzentration wurde anhand der Vergleichswerte geschätzt.

Vor der BP Rekombinationsreaktion wurde die cDNA gepoolt und anschließend mit

Ethanol gefällt. Da durch die Ethanolfällung ungefähr die Hälfte der Probe verloren geht, wurden mindestens 150 ng der cDNA eingesetzt. Die gefällte cDNA wurde in 4.5 µl TE Puffer resuspendiert. Um die Ausbeute der cDNA zu schätzen, erfolgte eine 1:10 und eine 1:20 Verdünnung der Probe. Jeweils 1 µl der Verdünnung wurde auf eine 1%ige Agaroseplatte gespottet und wie oben beschrieben weiter bearbeitet.

5. Rekombinationsreaktion der cDNA und des pDONR 222 Vektors mit der BP Clonase

Enzymmischung: Die BP Rekombinationsreaktion fand in einem 10 µl Ansatz statt (Tab. 2.3). Dazu wurden ca. 120 ng cDNA und 250 ng pDONRTM222 eingesetzt. Nachdem alle Komponenten bei RT zusammengegeben und gemischt wurden, wurden 3 µl BP Clonase Enzymmischung hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben bei 25°C für 16 –20 Stunden.

Tab. 2.3: BP Rekombinationsreaktion

Komponente	cDNA Probe	2.3 kb RNA-Kontrolle	BP Negativ-Kontrolle	BP Positiv-Kontrolle
<i>attB</i> -flankierte cDNA (75-100 ng)	4 µl	3 µl	--	--
pDONR TM 222 (250 mg/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
pEXP7-tet Positiv-Kontrolle	--	--	--	0.5 µl
5X BP Clonase TM Reaktionspuffer	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
TE Puffer, pH 8.0	--	1 µl	4 µl	3.5 µl

6. Vorbereitung für die Transformation: Um die Enzymreaktion zu stoppen, erfolgte eine Zugabe von 2 µl Proteinase K. Die Proben wurden zuerst für 15 min bei 37°C inkubiert, danach bei 75°C für 10 min. Anschließend schloss sich eine Ethanolfällung an. Das Pellet wurde in 9 µl TE Puffer resuspendiert.

7. Transformation in kompetente *E. coli* Zellen: Um die Transformationseffizienz zu überprüfen, wurde das pUC19 Plasmid als Kontrolle genommen (im Kit enthalten). Die Elektroporation wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

- Spannung: 2.0 kV
- Widerstand: 200 Ω
- Kapazität: 25 µF

Bevor den Proben 50 µl aufgetaute ElectroMAXTM DH10BTM kompetente Zellen zugegeben wurde, erfolgte eine Entsalzung auf Wasser schwimmenden Filtern (Millipore,

0,025 µm, 13 mm) für 10 min. Anschließend wurde die Mischung in eine kalte 0.1 cm Küvette transferiert und elektroporiert. Danach erfolgte sofort eine Zugabe von 1 ml S.O.C Medium und eine folgende Übertragung der Probe in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß. Nachdem alle Proben elektroporiert waren, schloss sich eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C und 250 rpm an. Alle Zellen einer Bibliothek wurden nach der Inkubation in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gepoolt und das Volumen bestimmt. Zu jeder Probe – bis auf die pUC19 Kontrolle – wurde das gleiche Volumen an sterilem Gefriermedium (60% S.O.C. : 40% Glycerol) zugefügt und gemischt. Die cDNA-Bibliotheken wurden bis zur weiteren Bearbeitung aliquotiert und bei –80°C gelagert.

8. **Titer Bestimmung:** Für jede cDNA Bibliothek und BP Kontrolle wurden 6 LB -Platten (insgesamt 24) mit 50 µg/µl Kanamycin und für die pUC 19 Kontrolle zwei LB-Platten mit 100 µg/µl Ampicillin hergestellt (siehe Anhang). Die Verdünnung der Proben erfolgte durch S.O.C. (Tab. 2.4). Pro Verdünnung wurden auf zwei Platten jeweils 100 µl der Probe mit einem Drygalski-Spatel ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tab. 2.4: Verdünnungsreihe der cDNA-Bibliothek und ihrer Kontrollen.

	cDNA Bibliothek	2.3 kb RNA Kontrolle	BP Negativ-Kontrolle	BP Positiv-Kontrolle	pUC 19 Kontrolle
Verdünnungen	10 ⁻²	10 ⁻²	unverdünnt	10 ⁻²	10 ⁻²
	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻³	--
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴	--

Um den Titer der cDNA Bibliothek zu bestimmen, wurden die ausplattierten Klone gezählt. Anschließend wurde nach folgender Formel der Titer jeder Platte berechnet:

$$\text{cfu / ml} = \frac{\text{Kolonien auf der Platte} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{ausplattiertes Volumen (ml)}}$$

Danach erfolgte die Berechnung des Durchschnittstiters für die ganze cDNA-Bibliothek. Die gesamte Anzahl der *colony-forming units* (cfu) wurde durch folgende Rechnung festgestellt:

$$\text{Total CFU (cfu)} = \text{Durchschnittstiter (cfu / ml)} \times \text{gesamtes Volumen der cDNA-Bibliothek (ml)}$$

2.7.5 Qualifizierung der cDNA-Bibliothek

Um festzustellen, ob die Herstellung der cDNA-Bibliothek erfolgreich war, wurde die Durchschnittsgröße der Inserts mittels Restriktionsverdau (Kap. 2.7.5.3) bestimmt. Dafür musste zuerst die DNA aus den Plasmiden der kultivierten Kolonien isoliert werden.

2.7.5.1 Kultivierung der Klone

Zuerst wurden 2 x 96 Klone mit sterilen Zahnstochern gepickt und in 1 ml LB-Medium (mit 50 µg / µl Kanamycin) in 96er Deep Well Platten über Nacht (mind. 18 Stunden) bei 37°C und 250 rpm kultiviert. Die Platten wurden mit einem AirePore™ Tape Sheet von Qiagen verschlossen.

Während meines Aufenthaltes in Plymouth wurden von jeder cDNA-Bibliothek 2000 Klone mit Pipettenspitzen gepickt und in 2 ml LB-Medium in 2 ml Reaktionsgefäßen über Nacht bei 37°C und 250 rpm kultiviert.

2.7.5.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmidpreparation des nicht infizierten Stammes erfolgte mittels des R.E.A.L Prep 96 Plasmid Kit von Qiagen. Das Prinzip beruht auf einer alkalischen Lyse der bakteriellen Zellen, gefolgt von einem Säubern des Lysates durch Filtration und einer Aufreinigung und Konzentration der DNA durch eine Isopropanolfällung. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Zentrifuge mit einem Rotor für 96-well Mikrotiterplatten.

Das Protokoll kann in folgende Schritte eingeteilt werden:

1. **Sammeln der Zellen:** Die über Nacht inkubierten *E.coli*-Zellen wurden mit Adhesiv-tape zugeklebt und für 5 min bei 2245 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium durch Umdrehen des Blockes verworfen.
2. **Resuspendierung:** Die Pellets wurden in 300 µl R1 Puffer resuspendiert. Die Platte wurde mit einem Tape zugeklebt und gevortext, bis alle Zellen gelöst waren.
3. **Lysierung und Neutralisierung:** Durch Zugabe von 300 µl R2 Puffer erfolgte die Lyse der Zellen. Die Platte wurde wieder zugeklebt, vorsichtig 10 mal umgedreht, um die Proben zu vermischen und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde sofort

300 µl R3 Puffer auf die Proben gegeben, die Platte zugeklebt und durch 10maliges Umdrehen vermischt. Hierbei handelt es sich um einen kritischen Schritt, da eine längere Inkubation zu einer Erhöhung von offen zirkulären Plasmiden führt.

4. **Filtrierung der Lysate mittels QIAfilter 96:** Die Proben wurden auf die Filter gegeben und mithilfe einer Vakuumpumpe bei 200-300 mbar in einen neuen Block transferiert.
5. **Entsalzung und DNA Konzentration durch Isopropanol-Fällung:** Zu den gefilterten Proben wurden 630 µl Isopropanol gegeben und anschließend durch Zukleben und dreimaliges Umdrehen vermischt. Um die Plasmid-DNA zu pelletieren, wurden die Proben bei 3320 rpm für 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.
6. **Waschschritte:** Die DNA-Pellets wurden zweimal mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte für 5 min bei 3320 rpm. Der Überstand wurde jedes Mal verworfen, indem der Block umgedreht und anschließend auf einem Papiertuch sachte abgetropft wurde. Nach den Waschschritten erfolgte eine Lufttrocknung der Pellets für 15 min unter einem Abzug.
7. **Lösen der DNA-Pellets:** Auf die Pellets wurden 100 µl H₂O gegeben und anschließend über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Bis zur weiteren Bearbeitung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

Um die Konzentration der Plasmid-DNA zu bestimmen, wurden von beiden Platten etwa 12 Proben mit dem **NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer** gemessen. Dabei wird 1 µl der Probe direkt auf den Messsockel gegeben, unter dem sich das eine Ende eines optischen Glasfaserkabels befindet. Anschließend wird das eine Ende mit dem anderen Ende des optischen Glasfaserkabels in Kontakt gebracht. Durch ihre Oberflächenspannung bleibt die Probe in ihrer Position. Nun schießt ein Xenonblitz durch die Probe und wird im Spektrometer analysiert. Mittels einer speziellen Software wird das Spektrum der Probe und deren Analyse auf dem PC angezeigt.

Die Plasmid-DNA des virusinfizierten Stammes wurde zusammen mit Matt Hall in Plymouth mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 13.000 rpm in einer Mikrozentrifuge bei RT durchgeführt.

Das verwendete Protokoll kann in folgende Schritte unterteilt werden:

1. **Pelletieren:** Die über Nacht inkubierten Kulturen wurden durch 5 minütiges Zentrifugieren

bei max. Geschwindigkeit pelletiert.

2. **Resuspendierung:** Das Pellet der bakteriellen Zellen wurde in 250 µl P1 Puffer durch hoch- und runter-pipettieren resuspendiert.
 3. **Lysierung und Neutralisierung:** Nachdem die Zellen komplett resuspendiert waren, wurden 250 µl P2 Puffer hinzugegeben, um die Zellen zu lysieren. Die Proben wurden durch sechsmaliges Umdrehen gemixt. Danach erfolgte eine Zugabe von 350 µl N3 Puffer. Nach Zugabe wurde sofort durch erneutes sechsmaliges Umdrehen die Probe gemischt. Anschließend wurden die Proben für 10 min zentrifugiert.
 4. **Binden der DNA:** Der klare Überstand aus dem zweiten Schritt wurde abgenommen und auf eine QIAprep Spin Säule pipettiert. Anschließend wurde für 60 s zentrifugiert und der Überstand verworfen.
 5. **Waschschritte:** Die Probe wurde zuerst mit 500 µl PB Puffer, dann mit 750 µl PE Puffer gewaschen und für jeweils 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde jedes Mal verworfen. Um den PE Puffer vollständig von der Säule zu entfernen, wurde die Probe ohne Puffer für eine Minute zentrifugiert.
 6. **Elution:** Die Säule wurde in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß platziert. Anschließend erfolgte die Elution der DNA von der Säule durch 50 µl EB Puffer. Bevor die Probe für eine Minute zentrifugiert wurde, musste die Probe 1 min inkubieren.
- Bis zur weiteren Bearbeitung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

2.7.5.3 Restriktionsverdau

Zur Bestimmung der Größe und Häufigkeit der Inserts wurde ein Restriktionsverdau von 68 Proben mit dem Enzym *BsrG1* durchgeführt. Nachdem die Reagenzien aus Tabelle 2.5 gut miteinander vermischt wurden, erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 2 Stunden.

Tab. 2.5: Restriktionsverdau-Ansatz

Substanz	Volumen
DNA	10 µl
Ne Puffer	2,5 µl
BSA	0,25 µl
Wasser	12 µl
<i>BsrG1</i> Enzym	0,25 µl

2.7.5.4 Agarosegel-Elektrophorese

Um die DNA-Fragmente voneinander zu trennen und die Größe der Inserts zu bestimmen, wurde nach dem Restriktionsverdau eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Es wurden 1.2% ige Agarosegele mit 0.1 µl / ml Ethidiumbromid in TAE Puffer nach Ausubel *et al.* (1985-2004) hergestellt.

Die Geltaschen wurden mit einer Mischung aus 8 µl DNA und 4 µl Ladepuffer beladen. Als Größenvergleich wurde ein 1 kb DNA Ladder eingesetzt. Das Gel lief 15-30 min bei ca. 70 V. Die DNA wurde unter UV-Licht visualisiert und mit einem Photo-Imager (Vilbert Lourmat) fotografiert.

2.7.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der „Kettenabbruch“- oder „Didesoxy“-Methode von Sanger (1977) unter Verwendung des ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer.

Die Methode erfolgt mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (Stopnukleotide). Diese bewirken nach Einbau in die DNA einen Abbruch der Polymeraseaktivität während der *in-vitro* DNA-Synthese. Dadurch entsteht ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten, die an ihren Enden jeweils mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Nachdem die Proben aufgereinigt wurden, werden sie in einen Sequenzer gestellt. Dort gelangen sie in das Kapillarsystem, das *Array*. In den Kapillaren befindet sich ein Trennmedium (Polymer), indem sich die DNA-Fragmente aufgrund eines starken elektrischen Feldes bewegen und dabei nach ihrer Länge aufgetrennt und schließlich an der Detektionszelle vom Laser differenziert werden.

2.7.6.1 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Hilfe des BigDye^R Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits von Applied Biosystems hergestellt.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden in 96- Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Reagenzien wurden miteinander vermischt (Tab. 2.6 und 2.7) und anschließend nach den Programmen in Tabelle 2.8 und 2.9 linear amplifiziert.

Cycle Sequencing: Beim Denaturieren wird die Doppelhelix der DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten. Im nächsten Schritt, dem Annealing, hybridisiert der Sequenzierungsprimer mit dem DNA-Matrizenstrang und markiert so die Stelle, an der die Polymerase zum Ablesen ansetzt. Bei der Elongation (DNA-Synthese) wird der komplementäre Strang synthetisiert, indem die Polymerase die Einzelstränge abliest und die komplementären dNTP's (Nukleotide) und ddNTP's (Stopnukleotide) anlagert. In jedem Zyklus wächst die Menge der neusynthetisierten DNA-Fragmente.

Tab. 2.6: Sequenzier-Reaktions-Ansatz für die Proben vor Virusinfektion

Volumen	Komponente
3,5 µl	Molekularbiologisches Wasser
1,5 µl	5 x Sequenzierungs Puffer
1,0 µl	Premix – „BigDye RR100“
1,0 µl	M13 Forward Primer (~ 1pmol/µl)
3 µl	DNA Probe

Tab. 2.7: Sequenzier-Reaktions-Ansatz für die Proben nach Virusinfektion

Volumen	Komponente
9,7 5µl	H ₂ O
1 µl	Primer (M13 uni(-21) seq)
3,75 µl	Dilution Buffer
0,5 µl	Read Reaction Premix
5 µl	Template

Tab. 2.8: Thermocycler Sequenzierungs-Programm für die Proben zum Zeitpunkt T₀

Funktion	Schritt	Temperatur	Zeit
Anfängliche Denaturierung	1	96°C	1 min
Denaturierung	2	96°C	10 s
Annealing	3	50°C	5 s
Elongation	4	60°C	4 min
Kühlung	5	4°C	∞
24 Wiederholungen der Schritte 2 – 4			

Tab. 2.9: Thermocycler Sequenzierungs-Programm der virusinfizierten Proben

Funktion	Schritt	Temperatur	Zeit
Anfängliche Denaturierung	1	95°C	1 min
Denaturierung	2	95°C	10 s
Annealing	3	50°C	5 s
Elongation	4	60°C	4 min
Kühlung	5	4°C	∞
20 Wiederholungen der Schritte 2 – 4			

2.7.6.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um nicht gebundene Primer, DNA-Polymerase-Reste, Enzyme und Salze von den PCR-Produkten abzutrennen, wurden sie vor dem Sequenzieren mit dem DyeEx 96 Kit von Qiagen nach dem modifiziertem Protokoll aufgereinigt.

Bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte die Lagerung der Eluate bei -20°C .

Die Aufreinigung der PCR-Produkte des Virusinfizierten Stammes wurde mittels des genCLEAN Plates Dye Terminator Removal (96 Well) von Genetix (Hampshire, UK) während meines Aufenthaltes in Plymouth von Matt Hall durchgeführt.

2.7.6.3 Sequenzanalyse

Typischerweise werden Gene oder ESTs mit Hilfe der Funktion „BLAST“-Suche (= basic local alignment search tool; Altschul *et al.*, 1990) im Internet durch Vergleich mit bekannten Genen aus Datenbanken wie z.B. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oder SwissProt (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>) identifiziert. Als zusätzliches Kriterium kann das Vorhandensein konservierter Domänen verwendet werden. Aufgrund der Tatsache, dass ESTs nur auf Teilsequenzen beruhen, ist die Identifizierung im Gegensatz zu ganzen Genen grundsätzlich schwieriger. Teilsequenzen liegen nicht notwendigerweise in den gut konservierten oder funktionellen Bereichen eines Gens.

Ein weiteres grundsätzliches Problem der Identifizierung liegt in dem verwendeten Suchalgorithmus BLAST, der sich auf paarweise Vergleiche der zu identifizierenden Sequenz mit Sequenzen aus der Datenbank stützt. Es wird also lediglich ermittelt, wie ähnlich die Testsequenz anderen Sequenzen ist. Ob diese Ähnlichkeit ausreicht ein Gen sicher zu identifizieren, hängt aber davon ab, wie gut das Gen in verschiedenen Organismen konserviert ist. Hierzu sind ein multiples Alignment vieler Gene und eine phylogenetische Analyse notwendig.

Für die Identifizierung der ESTs aus dieser Arbeit wurde deshalb das Programm „PhyloGena“ verwendet (Valentin *et al.*, in Vorbereitung). Dieses Programm führt zunächst automatisch eine

BLAST Suche für Testsequenzen durch. Aus der Liste der gefundenen Treffer wählt das Programm automatisch Sequenzen aus, die:

- (1) eine hinreichende Ähnlichkeit zur Testsequenz haben (hier: ein „*e* value“ von höchstens 10^{-7}) und
- (2) aus möglichst verschiedenen Organismen-Reichen stammen.

Stehen z.B. in der BLAST-Liste viele Sequenzen aus Pflanzen an der Spitze, wählt PhyloGena nur 3 Pflanzen-Sequenzen aus und selektiert dann bis zu 3 Sequenzen aus Tieren, Pilzen etc., auch wenn diese schlechtere „*e* values“ haben. Als nächstes wird aus den ausgewählten Sequenzen mit Hilfe von CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988) ein multiples Alignment erstellt, das als Basis für eine Phylogenetische Analyse nach dem „Neighbour-joining“ Verfahren dient.

Alle ESTs wurden mit Hilfe des Programms PhyloGena analysiert. Die gefundenen phylogenetischen Bäume wurden teilweise modifiziert und anschließend interpretiert. Falls vorhanden, wurden als Wurzel für den Baum Archaeobakterien, Tiere oder Pilze gewählt. Manchmal war es notwendig, zusätzliche Sequenzen mit in die Analyse einzubeziehen, wenn PhyloGena wichtig erscheinende Sequenzen nicht ausgewählt hatte. Es kam auch vor, dass einzelne Sequenzen, die als „hypothetical gene“ annotiert waren, entfernt wurden.

Ziel der Annotierung war es Bäume mit gut annotierten Sequenzen zu erstellen, deren Topologie bekannte Phylogenien widerspiegeln. Als nächstes wurde überprüft, ob die Testsequenzen Teil eines Clusters (Gruppe) mit identifizierten Genen sind. Diese Gene gelten als sicher annotiert (Abb. 2.1). War die Sequenz mit bekannten Clustern verwandt aber nicht Teil davon, wurde sie als „dieser Funktion ähnlich“ annotiert, z.B. als fcp-ähnliches Protein (Abb. 2.2).

Unabhängig davon, ob eine Funktion bekannt war, wurden ESTs die mit cyanobakteriellen Sequenzen gruppierten, als hypothetische Plastiden-Gene bezeichnet. Gruppierte ein EST mit alpha-Proteobakterien, galt es als hypothetisches Mitochondrien-Gen.

Einige ESTs zeigten zwar signifikante Treffer bei der BLAST-Suche, gruppierten im Baum jedoch nur mit Sequenzen unbekannter Funktion. Diese wurden als „unbekanntes konserviertes Protein“ bezeichnet. ESTs, die keine signifikanten Treffer ($= e \text{ value} > 10^{-7}$) erzielten, wurden als unbekanntes oder hypothetisches Protein eingestuft.

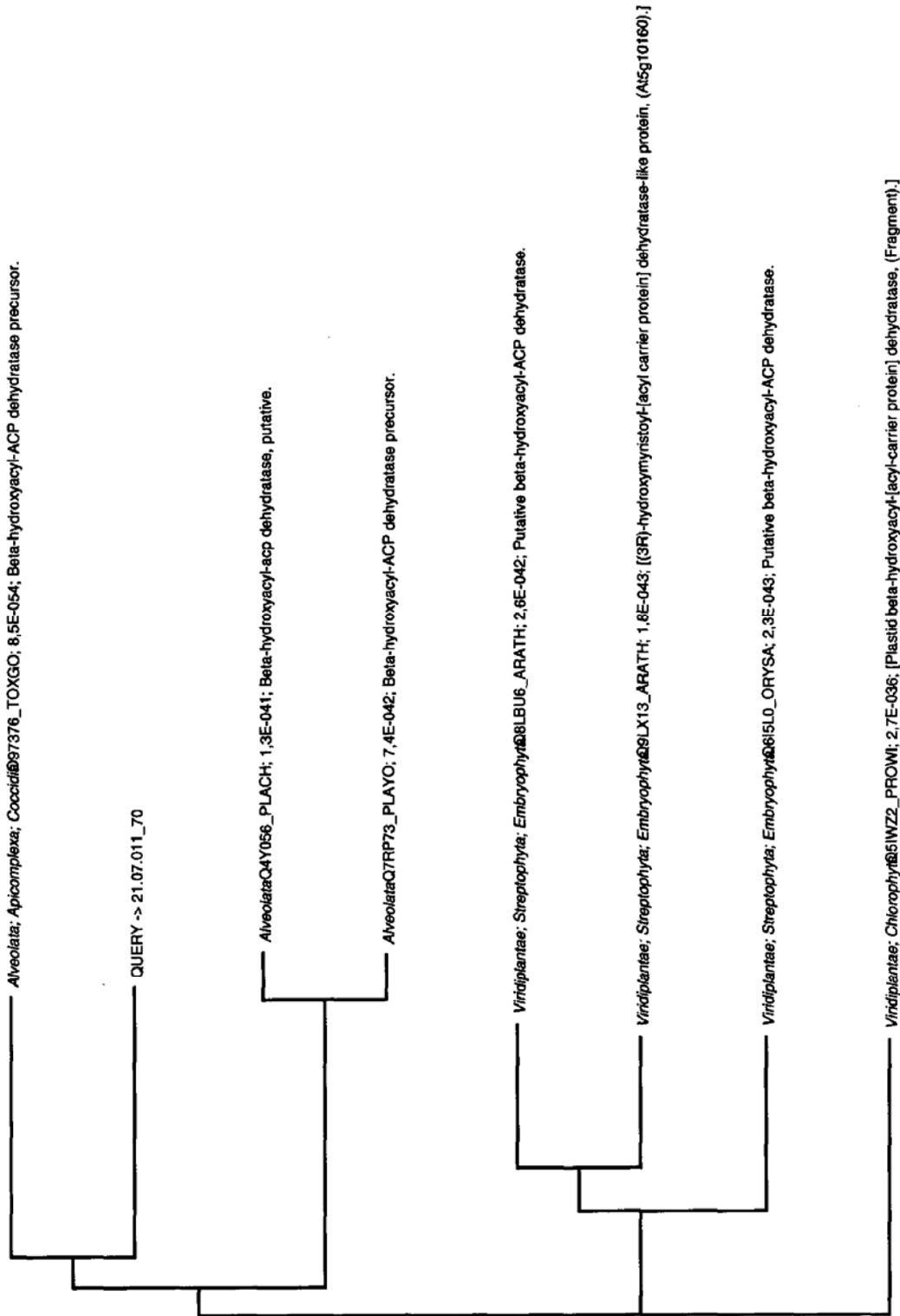


Abb. 2.1: Beispielbaum für eine sichere Annotierung eines Gens (Beta-hydroxyacyl-ACP Dehydratase) einer unbekanntem Teilsequenz.

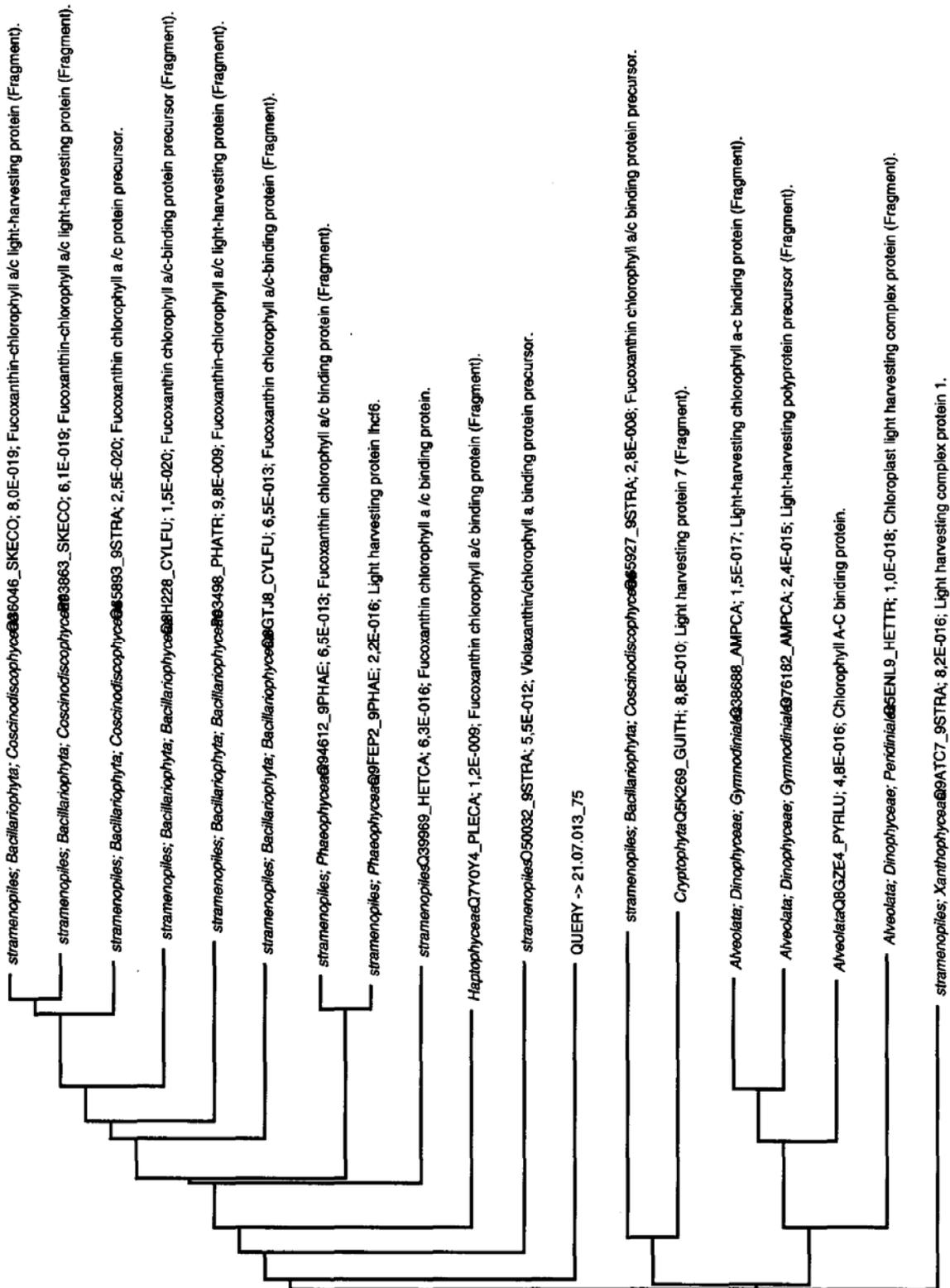


Abb. 2.2: Beispielbaum für die Annotierung einer unbekanntem Sequenz als fcp-ähnliches Protein.

3. Ergebnisse

3.1 Algenwachstum

3.1.1 Vorexperimente

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *Emiliana huxleyi* mit verschiedenen Anfangszellzahlen zielte darauf ab, eine Vorstellung über die Dauer der einzelnen Wachstumsphasen zu bekommen (Abb. 3.1 – 3.4).

Aufgrund der sehr geringen Anfangskonzentrationen ist nur anhand der Zellzahlen (Tab. 3.1 und Anhang) erkennbar, dass das Wachstum aller Kulturen ohne eine *lag* Phase startete. Tabelle 3.1 steht repräsentativ für alle verwendeten Kulturen der Vorexperimente und des Hauptexperiments und dient als Grundlage für alle weiteren Auswertungen.

Tab. 3.1: Zellzahlen der *E. huxleyi* Kulturen mit einer Anfangszellzahl von 500 Zellen pro ml.

Probentag	Kultur 1 [Zellen pro ml]	Kultur 2 [Zellen pro ml]	Kultur 3 [Zellen pro ml]
1	500	500	500
3	2.643	2.909	2.974
4	8.387	8.770	8.869
5	23.540	24.751	25.658
6	68.813	73.473	75.292
7	205.200	221.900	227.800
8	557.900	592.600	609.300
9	1.289.000	1.338.000	1.395.000
10	2.337.000	2.482.000	2.520.000
11	2.902.000	3.214.000	3.304.000
12	3.267.000	3.321.000	3.566.000
13	3.339.000	3.339.000	3.667.000
14	3.391.000	3.456.000	3.705.000
15	3.485.000	3.468.000	3.718.000
16	3.383.000	3.511.000	3.693.000
17	3.368.000	3.536.000	3.643.000
20	3.213.000	3.625.000	3.280.000

Am Anfang der Wachstumskurve und während der exponentiellen Phase weisen alle Kulturen eine durchschnittliche Teilungsrate von 1,2 Teilungen pro Tag auf (Abb. 3.1 - 3.4). Das Ende der exponentiellen Phase und der Übergang zur stationären Phase in den einzelnen Kulturen wird in den Abbildungen durch einen Pfeil angezeigt und liegt bei einer Zellzahl zwischen 250.000 bis 350.000 Zellen pro ml.

In einem Bereich von max. 4.000.000 Zellen/ml sind alle Kulturen zum Stagnieren gekommen. Dabei spielte es keine Rolle, wie lange die Kultivierung dauerte.

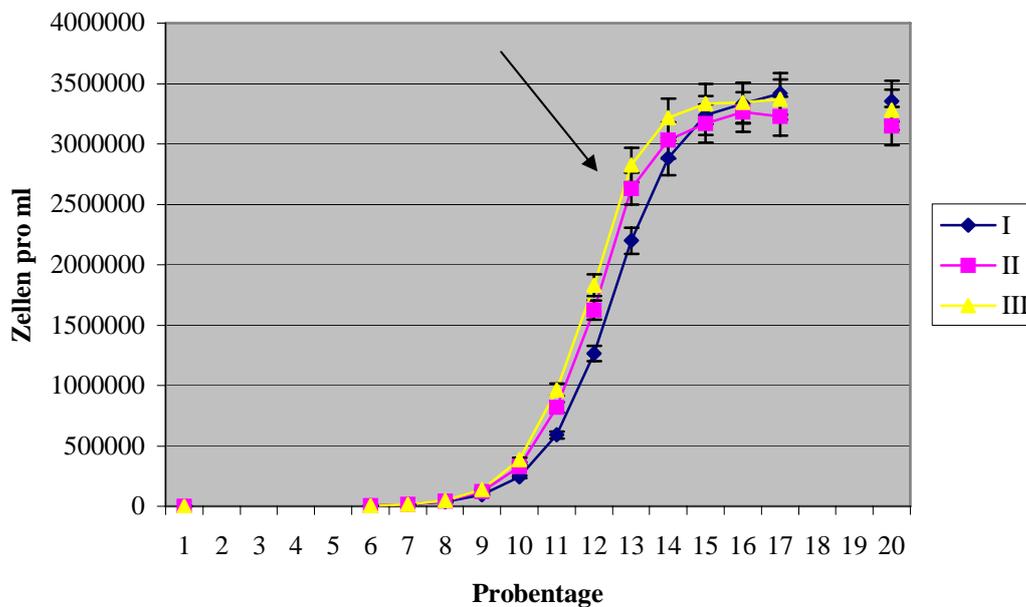


Abb. 3.1: Wachstumskurve von *Emiliana huxleyi* mit einer Anfangszellzahl von 50 Zellen pro ml und einer Standardabweichung von 5%. Der Pfeil gibt das Ende der exponentiellen Phase und den Übergang zur stationären Phase an.

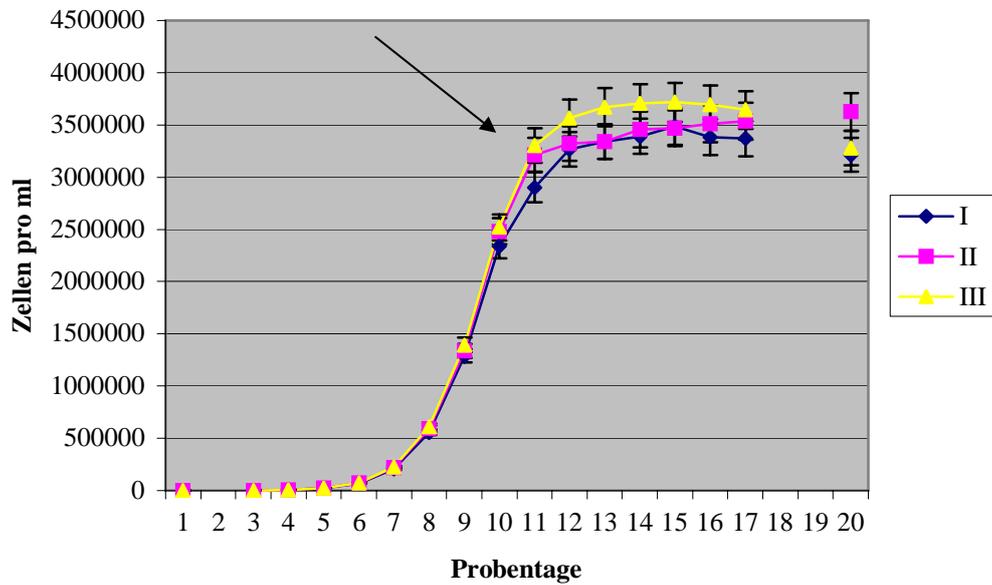


Abb. 3.2: Wachstumskurve von *Emiliana huxleyi* mit einer Anfangszellzahl von 500 Zellen pro ml und einer Standardabweichung von 5%. Der Pfeil gibt das Ende der exponentiellen Phase und den Übergang zur stationären Phase an.

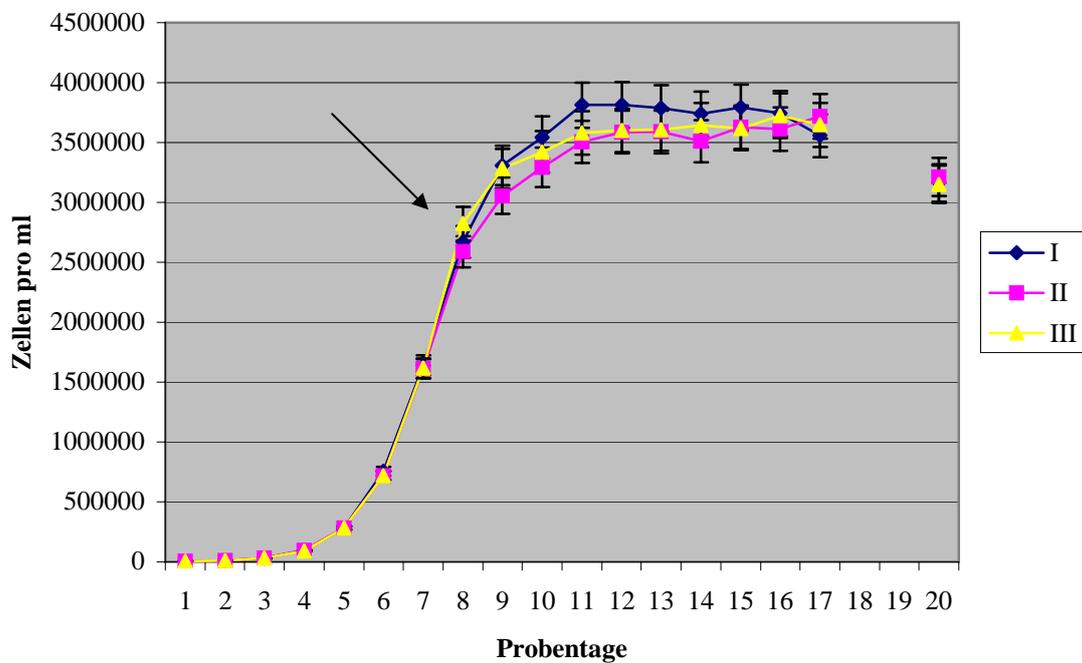


Abb. 3.3: Wachstumskurve von *Emiliana huxleyi* mit einer Anfangszellzahl von 5.000 Zellen pro ml und einer Standardabweichung von 5%. Der Pfeil gibt das Ende der exponentiellen Phase und den Übergang zur stationären Phase an.

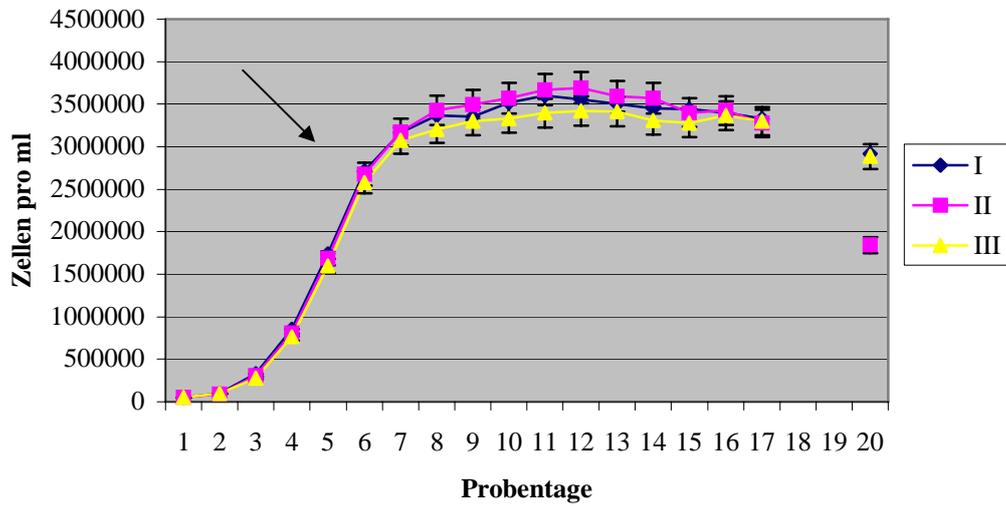


Abb. 3.4: Wachstumskurve von *Emiliana huxleyi* mit einer Anfangszellzahl von 50.000 Zellen pro ml und einer Standardabweichung von 5%. Der Pfeil gibt das Ende der exponentiellen Phase und den Übergang zur stationären Phase an.

3.1.2 Hauptexperiment

3.1.2.1 Wachstumsmessung mittels Beckman Coulter Counter

Das Wachstum der beiden 5 l Kulturen begann ohne eine *lag* Phase. Bis Ende der exponentiellen Phase weisen sie eine durchschnittliche Teilungsrate von 1,2 Teilungen pro Tag auf (Abb. 3.5). Das Ende der exponentiellen Phase und der Übergang zur stationären Phase liegt bei einer Zellzahl von ungefähr 300.000 Zellen pro ml.

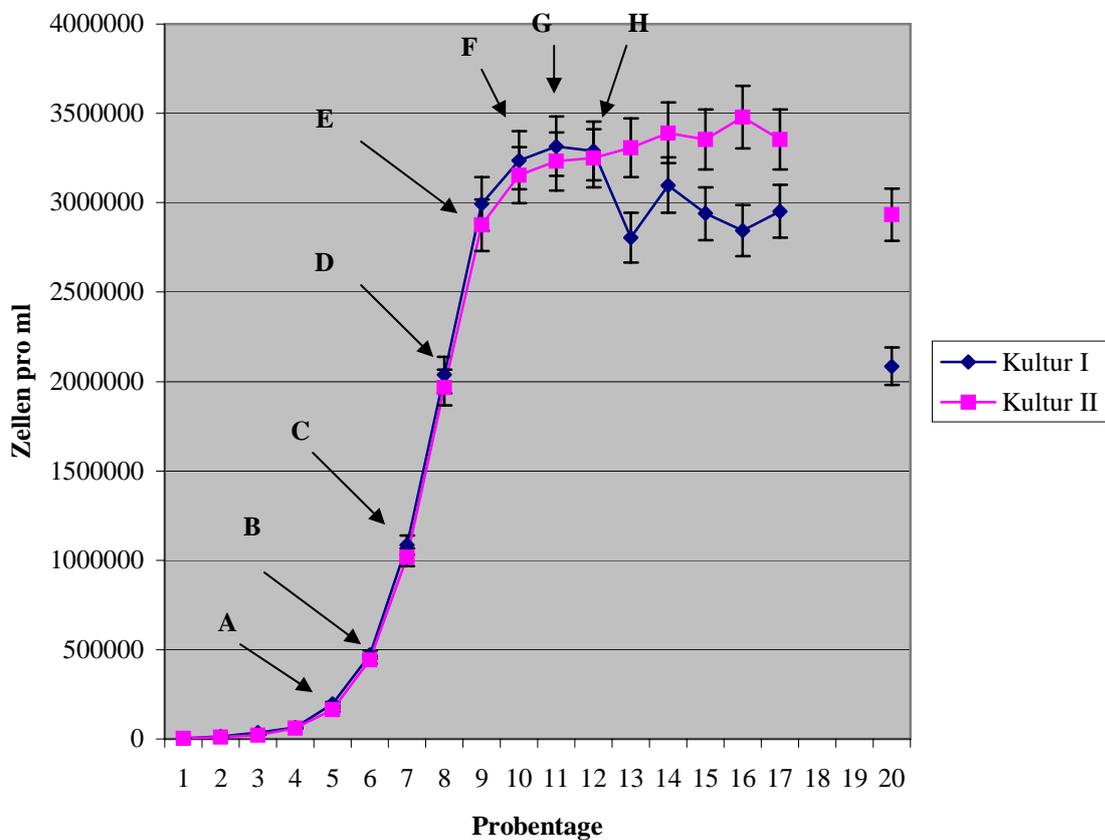


Abb. 3.5: Wachstumskurven der beiden 5 l *E. huxleyi* Kulturen, mit einer Anfangszellzahl von 5.000 Zellen pro ml und einer Standardabweichung von 5%. Die Pfeile und Buchstaben geben die Tage der Probenentnahme für die RNA-Isolierung an. Der Pfeil mit dem Buchstaben E gibt den Übergang zwischen exponentieller und stationärer Phase an. Die Messung erfolgte durch den Beckman Coulter Counter.

3.1.2.2 Wachstumsrate mittels Durchflusscytometer

Die Wachstumsmessung am Durchflusscytometer ergab, dass die exponentielle Phase am achten Wachstumstag abrupt aufhörte und ohne eine stationäre Phase sofort in die Absterbephase überging (Abb. 3.6). Bis Ende der exponentiellen Phase lag die durchschnittliche Teilungsrates der beiden 5 l Kulturen bei 1,2 Teilungen pro Tag (Abb. 3.6).

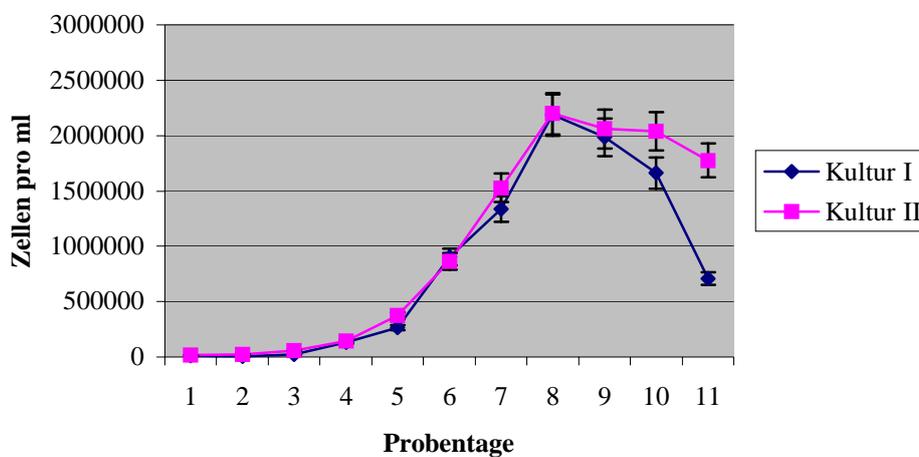


Abb. 3.6: Wachstumskurven der beiden 5 l *E. huxleyi* Kulturen, mit einer Anfangszellzahl von 5.000 Zellen pro ml und einer Standardabweichung von 8,5%. Die Messung wurde mit einem Durchflusscytometer durchgeführt.

Die Messung am Durchflusscytometer erwies sich als nicht praktikabel. Verantwortlich dafür sind in erster Linie unvollständige Probenverteilung durch verstopfte Schlauchleitungen und durch Sedimentationsverluste. Es können aber auch Ungenauigkeiten durch fehlerhafte Kalibrierung der Laser und durch defekte Laser auftreten.

Aufgrund der vielen Fehlerquellen wurde für alle weiteren Berechnungen den Ergebnissen des Coulter Counters Vorrang gegeben.

3.2 RNA-Isolierung

Ab dem fünften Wachstumstag (Abb. 3.5) erfolgte die Probenentnahme für die RNA-Isolierung. Die eingesetzte Menge an Zellen hing von der Zellzahl und der Probenmenge ab und variierte zwischen 16.000.000 und 166.000.000 Zellen pro Probe (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Zellzahlen auf einem Filter, die für die RNA-Isolierung eingesetzt wurden.

Probentag	Kultur 1 Zellen/ml	Kultur 2 Zellen/ml	Gesamtzellzahl auf einem Filter Kultur 1	Gesamtzellzahl auf einem Filter Kultur 2
A	196.000	162.500	19.600.000	16.2250.000
B	472.600	441.500	23.630.000	22.075.000
C	1.084.000	1.017.000	54.200.000	50.850.000
D	2.037.000	1.966.000	101.850.000	98.300.000
E	2.995.000	2.875.000	149.750.000	143.750.000
F	3.237.000	3.155.000	161.850.000	157.750.000
G	3.316.000	3.232.000	165.800.000	161.600.000
H	3.289.000	3.249.000	98.670.000	97.470.000

Die Qualitäts- und Quantitätskontrolle der isolierten RNA erfolgte mit dem Agilent 2100 Bioanalyser (Abb. 3.7 und CD* im Anhang). Dabei hat sich herausgestellt, dass die RNA-Ausbeute erst ab einer Gesamtzellzahl von mind. 100.000.000 Zellen eine angemessene Quantität zur weiteren Verarbeitung ergab (mind. 100 ng/µl).

Um die RNA für die mRNA-Isolierung anzureichern, wurden immer zwei Proben einer Kultur zusammengegeben (Tab. 3.3). Dafür wurden die RNA-Proben verwendet, die die stärksten und meisten Banden aufwiesen (Abb. 3.7 und CD im Anhang).

Tab. 3.3: Verwendete RNA-Proben für die mRNA-Isolierung

Probentag	Kultur 1	Kultur 2
C	1.2 + 1.3	2.2 + 2.3
D	1.2 + 1.3	2.2 + 2.4
E	1.2 + 1.3	2.1 + 2.2
F	1.2 + 1.3	2.2 + 2.4
G	1.3 + 1.4	2.3 + 2.4

* Die Ergebnisse der RNA-Isolierung, die mit dem Agilent 2100 Bioanalyser kontrolliert wurden, befinden sich als pdf-Dateien auf der beiliegenden CD.

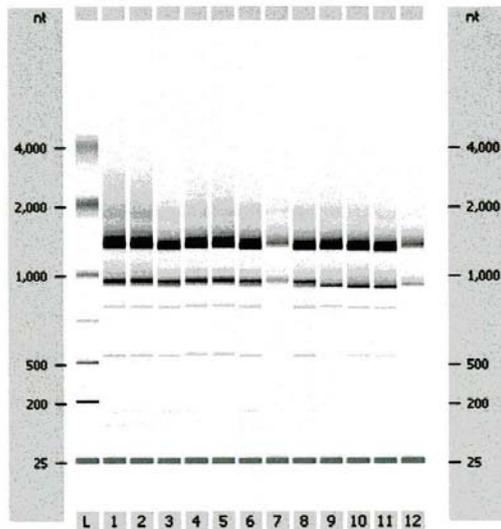
Assay Class: EukaryoteTotal RNA Nano

Read: 5/10/2005 11:18:28 AM

Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802716_2005-05-10_11-18-28.xad

Modified: 5/10/2005 11:43:11 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

Instrument Name: Ehux
 Product Id: G2938B
 Firmware: C.01.048
 Serial#: DE24802716

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\electrophoresis\RNA\Eukaryote Total RNA Nano
 Title: Eukaryote Total RNA Nano
 Version: 1.4
 Assay Comments: Copyright © 2003 Agilent Technologies

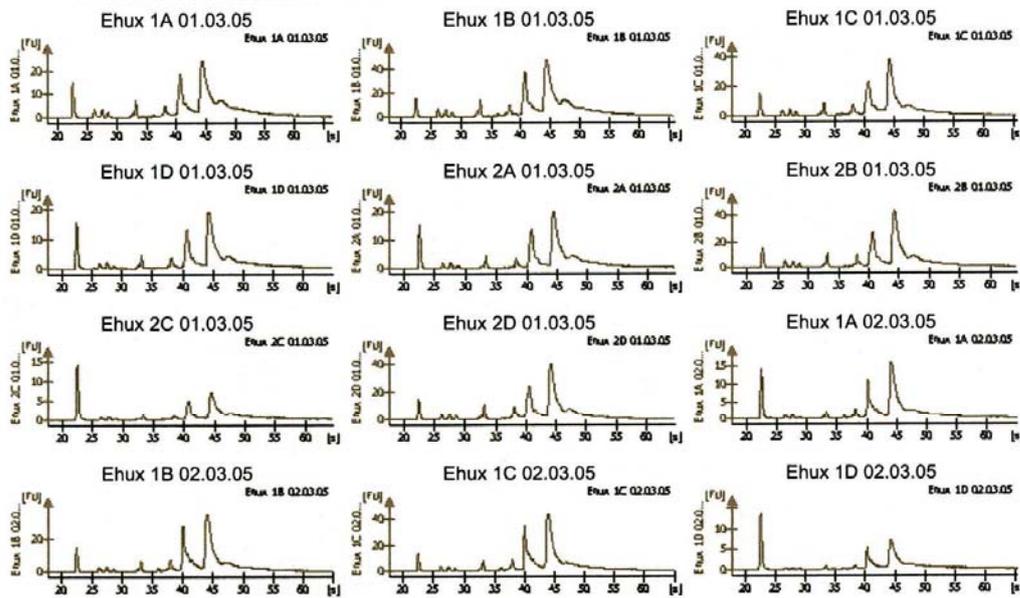


Abb. 3.7: Qualitäts- und Quantitätskontrolle der isolierten RNA der Proben D (01.03.05) und E (02.03.05). Die Messung erfolgte mittels Bioanalyser.

3.3 mRNA-Isolierung

Damit die cDNA-Bibliothek über exprimierte Gene verfügt, die während der exponentiellen Phase und am Anfang der stationären Phase aktiv sind, wurde die mRNA gepoolt. Ausgehend von der geringsten Menge an mRNA (s. CD im Anhang) erfolgte das Bestimmen des Volumens der verschiedenen Wachstumsstadien (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Verwendetes Volumen der mRNA der verschiedenen Wachstumsstadien für den Pool der cDNA.

Probenstag	Volumen
C	90 µl
D	81 µl
E	71,4 µl
F	47 µl
G	50 µl

Da die mRNA ca. 2% der gesamten RNA ausmacht, wäre es im Nachhinein besser gewesen, die gesamte RNA zuerst zu poolen und zu fällen und dann die mRNA zu isolieren, da bei jedem neuen Schritt Verluste auftreten.

3.4 Herstellung der cDNA-Bibliothek vor Virusinfektion

Die cDNA-Bibliothek wurde aus RNA hergestellt, die aus *E. huxleyi* Zellen extrahiert wurde, die unter normalen Bedingungen, d.h. ohne jeglichen Stress, gewachsen waren. Aufgrund der geringen Menge zur Verfügung stehender mRNA (~ 300 ng), stellte sich die Herstellung der cDNA-Bibliothek zwischenzeitlich als sehr schwierig heraus. Das Schätzen der Konzentration der cDNA nach der Säulenchromatographie (Abb. 3.8 A und B) erwies sich daher als sehr vage Vermutung (Tab. 3.5).

Nachdem die cDNA-Fractionen für die anschließende BP-Rekombinationsreaktion gepoolt und mit Ethanol gefällt wurden, erfolgte eine erneute Konzentrationsbestimmung mit SYBRGreen (Abb. 3.8 C und D). Die Konzentration der cDNA wurde auf 30 ng/μl, die der Kontrolle auf 40 ng/μl geschätzt.

Tab. 3.5: Schätzung der Konzentration der cDNA und der Kontrolle basierend auf der Abb. 3.9 A und B. Die erste definierte Konzentration soll nach Protokollangabe die größten cDNA-Fragmente enthalten und wird mit einer Konzentration von 0.5 ng/μl festgesetzt.

Probennummer	Konzentration der cDNA (ng/μl)	Konzentration der Kontrolle (ng/μl)
8	--	0.5
9	--	3
10	0.5	5
11	1	10
12	1	10
13	1	8
14	--	6

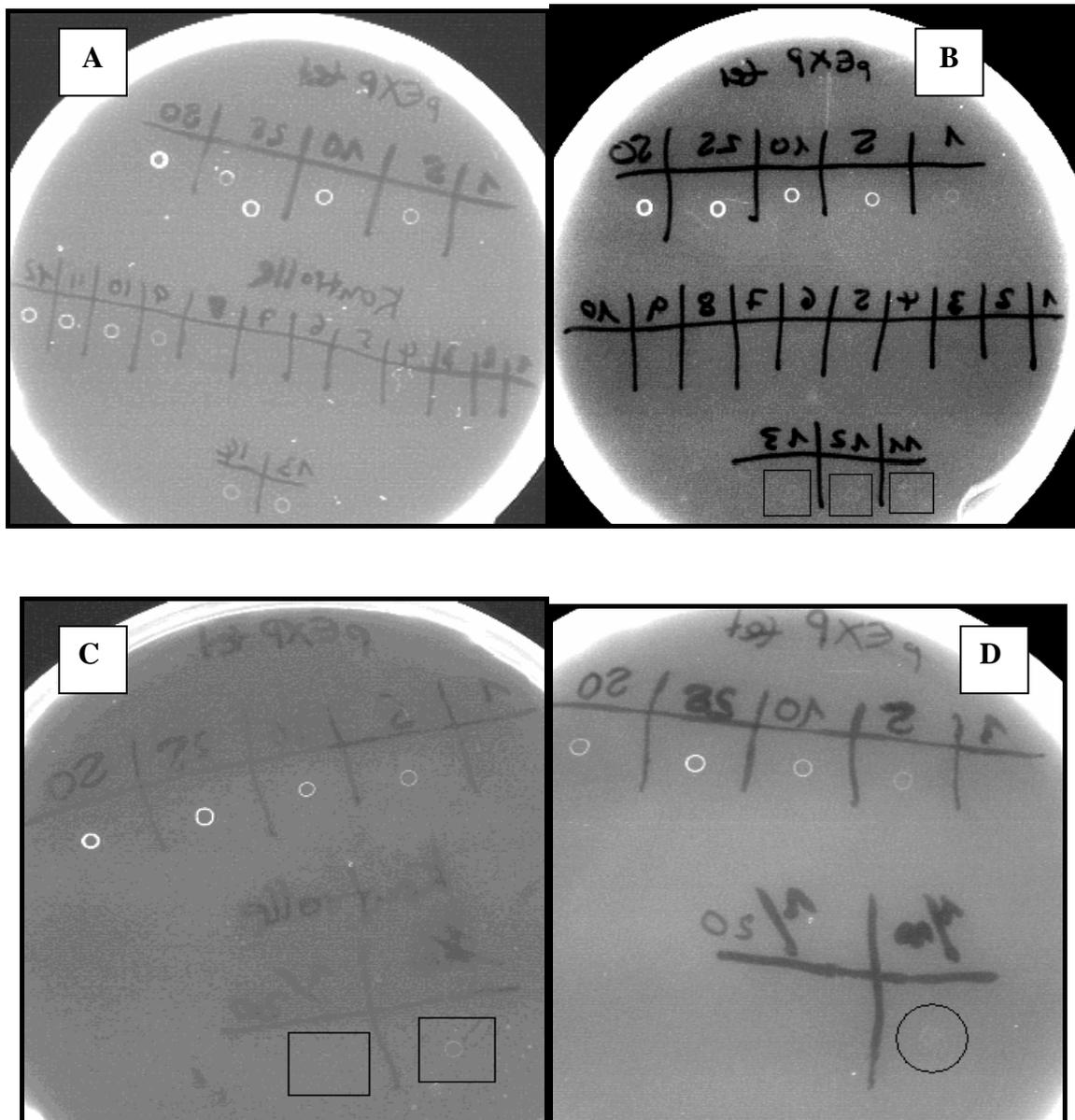


Abb. 3.8: Kontroll- und cDNA-Fractionen mit SYBRGreen gefärbt und unter UV-Licht visualisiert. A: Fractionen der Kontrolle nach der Säulenchromatographie; B: Fractionen der cDNA nach der Säulenchromatographie; C: 1:10 und 1:20 Verdünnung der gepoolten Kontroll-Fractionen; D: 1:10 und 1:20 Verdünnung der gepoolten cDNA-Fractionen. Beim Betrachten der Bilder ist zu beachten, dass die Reihenfolge der Proben in umgekehrter Richtung verläuft, also von rechts nach links.

3.4.1 Titerbestimmung der cDNA

Obwohl der Titer der cDNA-Bibliothek um die Hälfte niedriger ist als bei der Kontrolle, kann davon ausgegangen werden, dass 1.830.000 cfu/ml ausreichen, um statistisch alle aktiven Gene abzudecken.

3.5 Plasmid-DNA Präparation

Von den für die Sequenzierung verwendeten DNA-Proben wurde bei einigen die Qualität und Quantität mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer gemessen (Tab. 3.6). Die erste Platte weist eine durchschnittliche DNA-Konzentration von 142 ng/µl auf, die zweite eine von 79 ng/µl. Bei der zweiten Platte wurden die beiden geringsten Werte nicht mit einberechnet.

Tab. 3.6: Konzentrationsbestimmung einiger DNA-Proben mittels NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

DNA	A 260	$\frac{260}{230}$	$\frac{260}{280}$	ng / µl
Platte 1 A1	3.199	2.36	1.78	159.94
Platte 1 B2	1.605	2.18	1.65	80.26
Platte 1 C3	2.498	2.26	1.66	124.92
Platte 1 D4	1.835	2.25	1.60	91.76
Platte 1 E5	1.897	2.21	1.74	94.85
Platte 1 F6	2.843	2.26	1.64	142.17
Platte 1 G7	4.256	2.26	1.63	212.79
Platte 1 H8	2.511	2.33	1.72	125.57
Platte 1 G9	4.532	2.35	1.75	226.60
Platte 1 F10	5.211	2.33	1.80	260.57
Platte 1 E11	1.856	2.30	1.68	92.80
Platte 1 D12	1.888	2.32	1.64	94.41
Platte 2 A1	0.112	0.83	1.08	5.62
Platte 2 B2	0.959	1.91	1.49	47.93
Platte 2 C3	2.197	2.10	1.61	109.83
Platte 2 D4	0.165	1.01	1.18	8.25
Platte 2 E5	2.299	2.28	1.68	114.93
Platte 2 F6	1.709	2.15	1.62	85.44
Platte 2 G7	1.154	1.78	1.63	57.72
Platte 2 H8	1.395	2.12	1.62	69.77
Platte 2 D9	1.386	1.95	1.58	69.31
Platte 2 A10	1.265	1.92	1.59	63.25
Platte 2 F11	1.807	2.48	1.65	90.33
Platte 2 B12	1.409	2.18	1.64	70.46
Platte 2 B1	1.993	2.11	1.60	99.63
Platte 2 F4	1.285	1.99	1.59	64.27

3.6 Restriktionsverdau

Nach dem Restriktionsverdau von 68 Proben durch *BsrG1* zeigen 39 Proben ein Insert (Abb. 3.9 und 3.10). Dabei liegt der Hauptteil der Inserts (30) im Bereich zwischen 500 und 1.000 kb. Die restlichen neun liegen im Bereich zwischen 1.000 und 2.500 kb. Dass die Ausbeute der Inserts so gering ausgefallen ist (um die 50%), liegt vermutlich zum Einen daran, dass die Menge der mRNA zur Herstellung der cDNA zu gering war (weniger als 500 ng/ μ l). Ein weiterer Grund könnte die Menge der eingesetzten DNA beim Restriktionsverdau sein. Die anfänglichen Isolierungen der DNA aus den Plasmiden, die für den Restriktionsverdau verwendet wurden, ergaben nur eine geringe Ausbeute (um die 10 ng/ μ l).

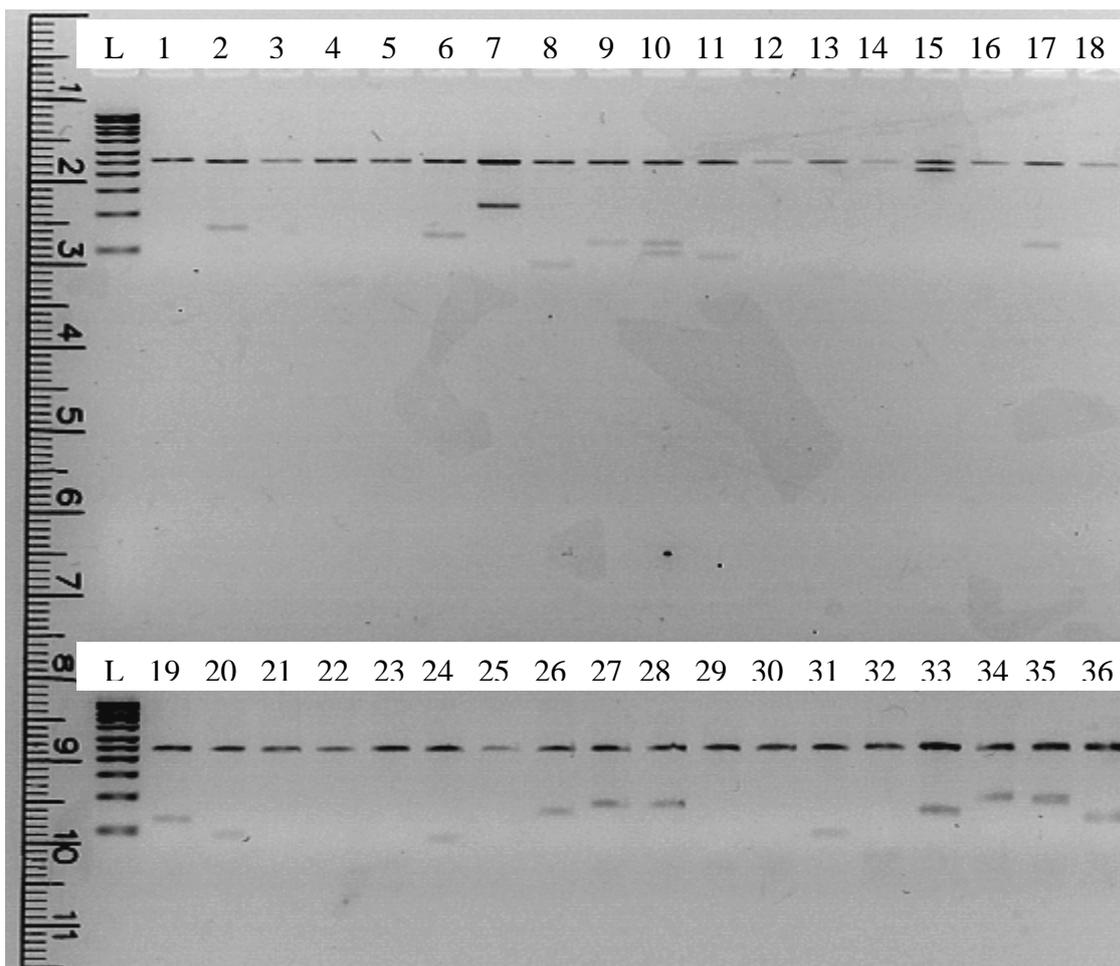


Abb. 3.9: DNA-Proben 1-36 nach Restriktionsverdau aufgetragen auf ein 1.2%iges Agarosegel mit 20 μ l Ethidiumbromid. Die erste Bande in einer Reihe enthält einen 1 kb DNA-Marker (L), der in 500 bp Schritten aufgetrennt ist. Die unterste Bande des Markers markiert die 500 bp Grenze.

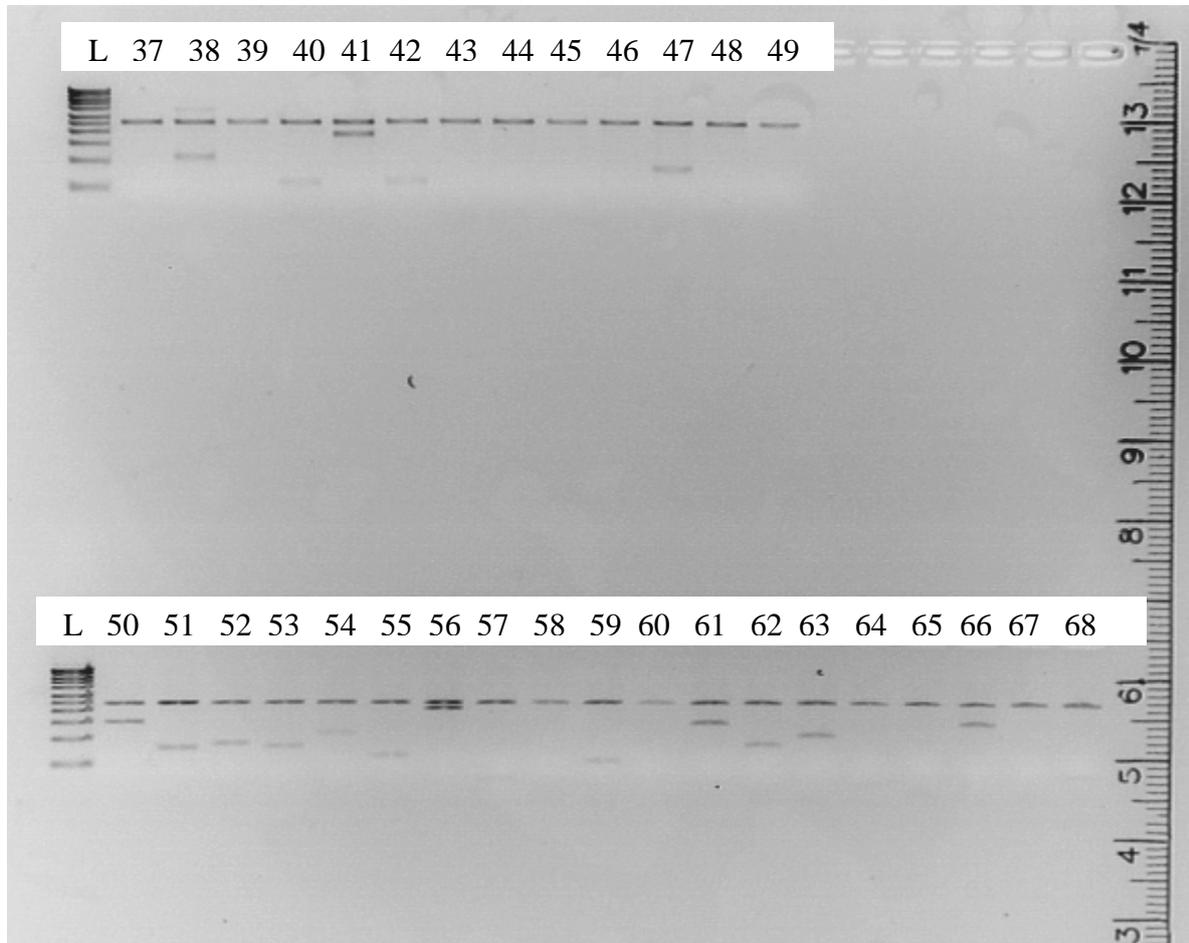


Abb. 3.10: DNA-Proben 37-68 nach Restriktionsverdau aufgetragen auf ein 1.2%ige Agarosegel mit 20 μ l Ethidiumbromid. Die erste Bande einer Reihe enthält einen 1 kb DNA-Marker (L), der in Abb. 3.9 beschrieben ist.

3.7 Analyse der in den cDNA-Bibliotheken gefundenen Gene

Die Analyse der gesamten ESTs wurde mit dem Programm PhyloGena durchgeführt. Bei den ESTs nach Virusinfektion erfolgte die Annotierung nur mit bekannten Genen der SwissProt Datenbank. Die gefundenen phylogenetischen Bäume wurden teilweise modifiziert und anschließend interpretiert. Falls vorhanden, wurden als Wurzel für den Baum Archaeobakterien, Tiere oder Pilze gewählt. Manchmal war es notwendig zusätzliche Sequenzen mit in die Analyse einzubeziehen, wenn PhyloGena wichtig erscheinende Sequenzen nicht ausgewählt hatte. Es kam auch vor, dass einzelne Sequenzen, die als „hypothetical gene“ annotiert waren, entfernt wurden.

Ziel der Annotierung war es, Bäume mit gut annotierten Sequenzen zu erstellen, deren Topologie bekannte Phylogenien widerspiegeln. Als nächstes wurde überprüft, ob die Testsequenzen Teil eines Clusters (Gruppe) mit identifizierten Genen sind. Diese Gene gelten als sicher annotiert (Abb. 3.11). War die Sequenz mit bekannten Clustern verwandt aber nicht Teil davon, wurde sie als „dieser Funktion ähnlich“ annotiert, z.B. als fcp-ähnliches Protein (Abb. 3.12). Unabhängig davon, ob eine Funktion bekannt war, wurden ESTs die mit cyanobakteriellen Sequenzen gruppierten, als hypothetische Plastiden-Gene bezeichnet. Gruppierte ein EST mit alpha-Proteobakterien, galt es als hypothetisches Mitochondrien-Gen. Einige ESTs zeigten zwar signifikante Treffer bei der BLAST-Suche, gruppierten im Baum jedoch nur mit Sequenzen unbekannter Funktion. Diese wurden als „unbekanntes konserviertes Protein“ bezeichnet. ESTs die keine signifikanten Treffer ($= e\text{-value} > 10^{-7}$) erzielten, wurden als unbekanntes oder hypothetisches Protein eingestuft.

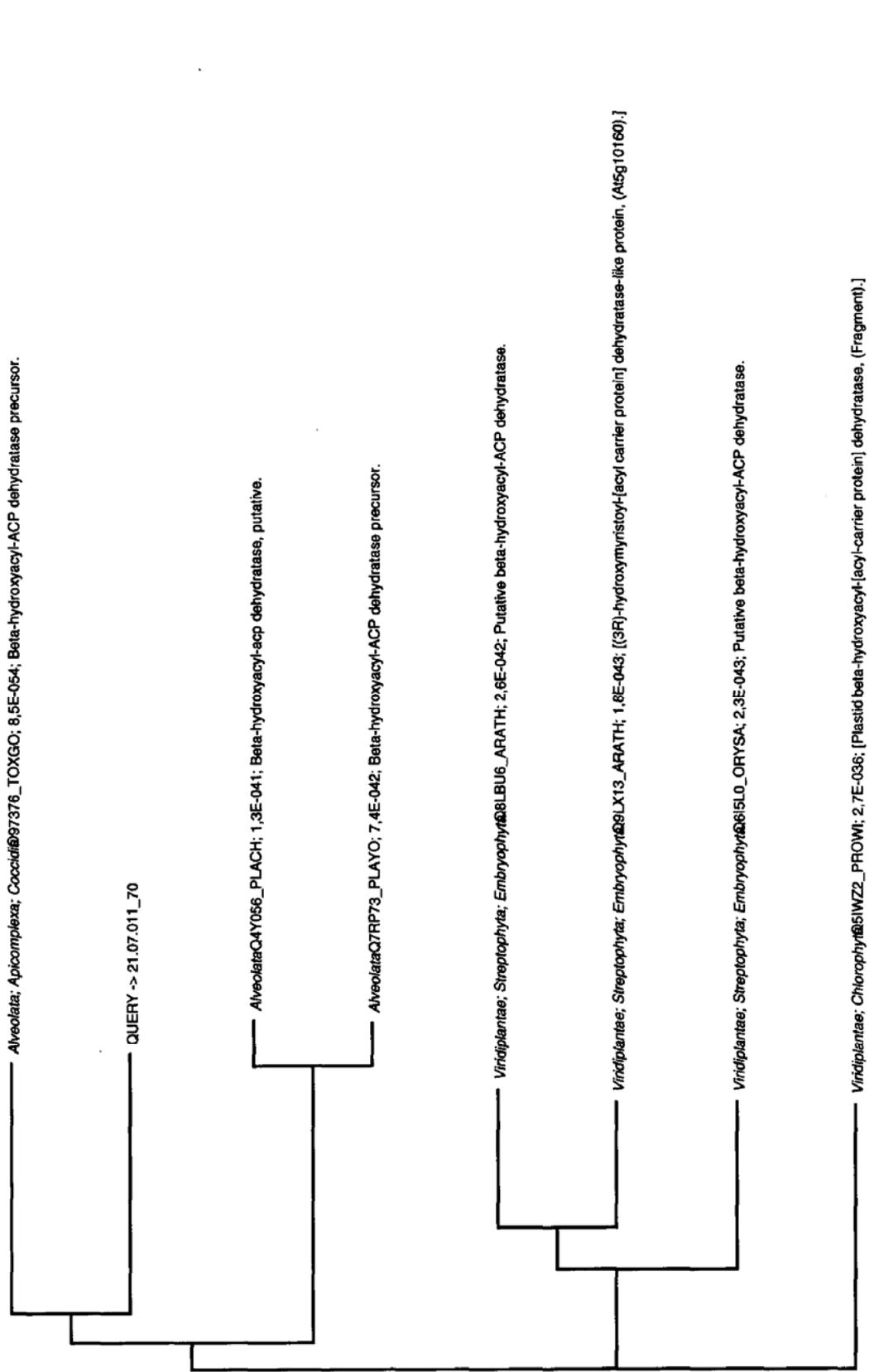


Abb. 3.11: Annotierung einer Teilsequenz aus der cDNA-Bibliothek zum Zeitpunkt T = 0 als Beta-hydroxyacyl-ACP Dehydratase: Die Sequenz ist Teil eines Clusters, das als Beta-hydroxyacyl-ACP Dehydratase annotiert ist.

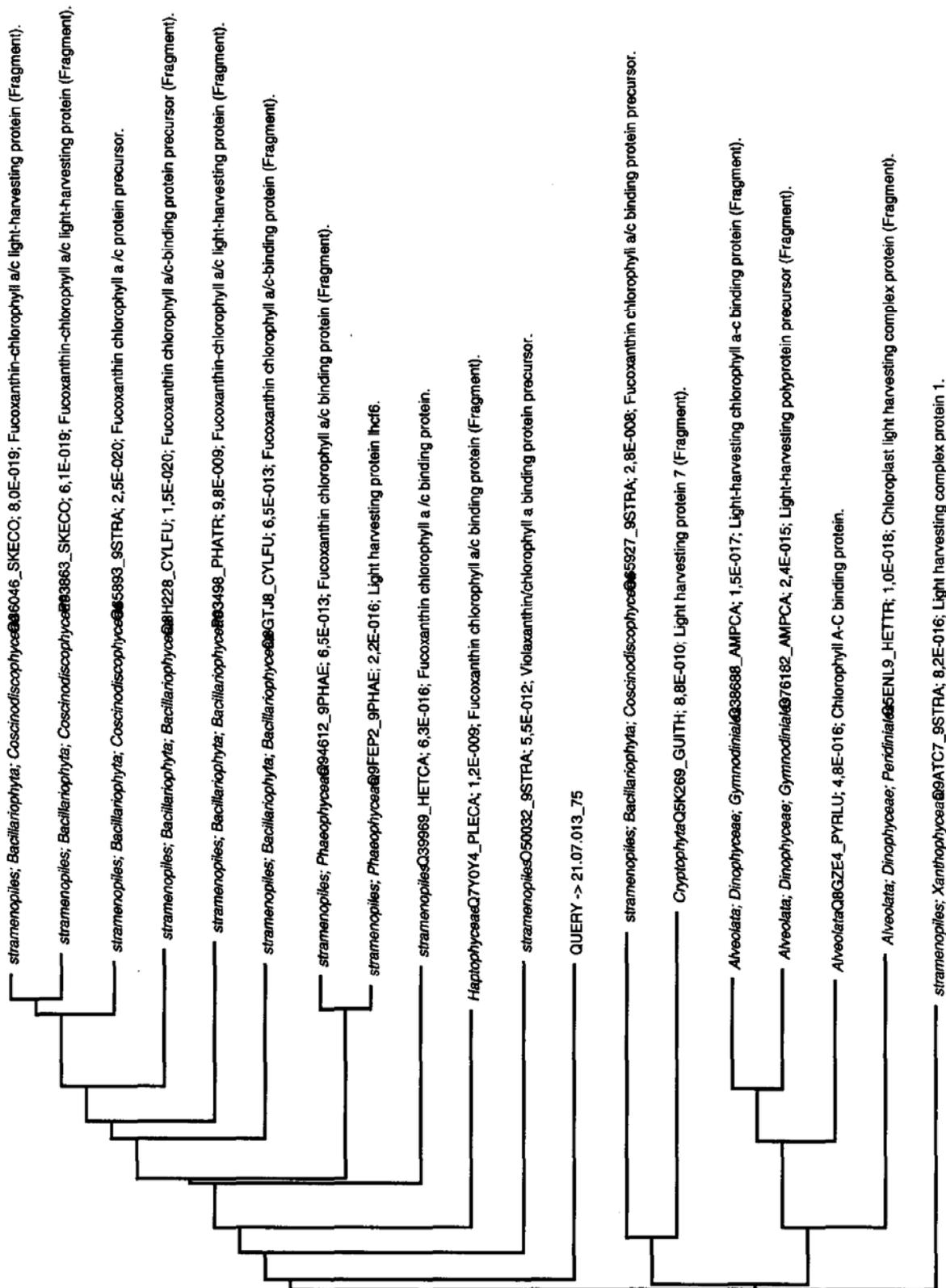


Abb. 3.12: Annotierung einer Teilsequenz aus der cDNA-Bibliothek vor Virusinfektion als fcp-ähnliches Protein: Die Sequenz zeigt zwar Ähnlichkeit zu fcp's, liegt aber außerhalb des fcp-Clusters.

Aus der cDNA-Bibliothek vor Virusinfektion konnten 77 Gene annotiert werden (Tab. 3.7, Abb. 3.12 und 3.13 und CD* im Anhang). Davon sind 13 FCP's oder FCP-ähnliche Proteine. 37 Sequenzen zeigten alle Ähnlichkeit zu demselben unbekanntem Protein (Q59ED3), der *e* value war allerdings kleiner als 10^{-7} . Des Weiteren wurden Proteine identifiziert, die für die Photosynthese, den Zellzyklus, die Transkription und für den Proteinmetabolismus zuständig sind (Tab. 3.7).

Aus der cDNA-Bibliothek sechs Stunden nach Virusinfektion konnten 67 Gene annotiert werden. 43 Sequenzen haben keinen Treffer bei der Analyse ergeben und wurden als unbekannte Proteine bezeichnet. 21 exprimierte Gene des Wirtes konnten identifiziert werden (Tab. 3.8). Die meisten der identifizierten Proteine sind ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren, die für die Proteinsynthese zuständig sind. Auffällig ist die Expression von HSP70 und S-Adenosylhomocysteinase, die ein Indikator für Stress sind. S-Adenosylhomocysteinase ist für den Aminosäureabbau zuständig. Es wurden keine FCP-ähnlichen Proteine gefunden.

Durch Vergleich mit dem Virusgenom konnten drei der 67 ESTs als unbekannte, exprimierte Gene des Virus identifiziert werden.

* Die Bäume der annotierten ESTs vor Virusinfektion befinden sich als jpg-Dateien auf der beiliegenden CD.

Tab. 3.7: Annotierte ESTs des Wirtes *E. huxleyi* vor Virusinfektion sowie deren *e* value, Häufigkeit und Funktion.

Name Protein	Häufigkeit	<i>e</i> value	Funktion
unbekanntes Protein	37	--	--
FCP ähnliches Protein	10	10 ⁻²⁰	Photosynthese
Fucoxanthin Chlorophyll a/c Bindeprotein (FCP)	3	10 ⁻¹⁰	Photosynthese
Lichtsammelkomplex (<i>light harvesting complex</i> , LHC)	3	10 ⁻¹⁰	Photosynthese
Ähnlich einer Untereinheit einer regulatorischen, Cyclin abhängigen Protein-Kinase, putativ	2	10 ⁻³⁰	Signaltransduktion, Zellkommunikation, Zellzyklus
Alpha-Glucosidase	2	10 ⁻⁵¹	Galactose-Metabolismus
Beta-hydroxyacyl-ACP Dehydratase	2	10 ⁻⁵⁴	Fettsäuresynthese
hypothetisches konserviertes Protein, plastidär	2	10 ⁻¹⁸	--
putativer Regulator des Chromosomkondensationsprotein	2	10 ⁻⁸	Reguliert die Kondensation der Chromosomen
Putativer Translations-Initiationsfaktor	2	10 ⁻²⁴	initiiert Translation
Trehalose 6-Phosphat-Synthase	2	10 ⁻²⁹	Stärke und Saccharose Metabolismus
Ankyrin verwandtes Protein	1	10 ⁻¹⁰	bei der Bindung von Spectrin an die Plasmamembran beteiligt
Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase (kerncodiertes Plastidenprotein)	1	10 ⁻⁷⁸	Photosynthese (Photosystem I)
Glutarredoxin, mitochondrial	1	10 ⁻³⁰	Glutathionstoffwechsel
Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	1	10 ⁻¹¹⁷	Glykolyse, Gluconeogenese
N5'-nucleotidase, cytosolisch	1	10 ⁻²⁰	Transkription
NADH-Dehydrogenase	1	10 ⁻¹²	Atmungskette, Fettsäureoxidation
Protein-Kinase	1	10 ⁻¹⁸	Signaltransduktion; Phosphorylierung
Putatives Membranprotein	1	10 ⁻¹²	--
Ribosomales Protein L3	1	10 ⁻³⁷	Proteinmetabolismus
RNA Helicase	1	10 ⁻⁴⁸	Transkription

Tab. 3.8: Annotierte Gene des Wirtes *E. huxleyi* nach 6 Stunden Virusinfektion

Protein	Häufigkeit	Funktion
40S ribosomales Protein S 11	2	Proteinmetabolismus
40S ribosomales Protein S13	2	Proteinmetabolismus
60S ribosomales Protein L7	2	Proteinmetabolismus
60S ribosomales Protein L25	1	Proteinmetabolismus
60S ribosomales Protein L27	1	Proteinmetabolismus
Adenylat-Kinase	1	Glykolyse; Phosphorylierung; Erzeugung und Bindung von ATP
ähnlich dem Elongationsfaktor 1 α (EF1 α)	1	Proteinmetabolismus
ähnlich dem Elongationsfaktor-Tu (EF-Tu)	1	Proteinmetabolismus
Caltractin-ähnliches Protein	1	Calciumbindeprotein
Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 3, Untereinheit 7	1	Proteinmetabolismus
Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase (kerncodiertes Plastidenprotein)	1	Photosynthese
GAPDH, cytosolisch	1	Glykolyse, Gluconeogenese
geringe Ähnlichkeit zu Ubiquitin	1	Aminosäurekatabolismus
geringe Ähnlichkeit zur Phosphoribulose-Kinase	1	Calvin-Zyklus
HSP70-ähnliches Protein	1	Stress induziertes Gen
Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide Synthase	1	Transkription
S-Adenosylhomocysteinase	2	Aminosäurekatabolismus
unbekannte Proteine	43	--

Von den bisher 96 sequenzierten ESTs aus der Bibliothek nach 12 Stunden Virusinfektion konnten 82 annotiert werden. Davon ergaben 48 Sequenzen keine signifikanten Treffer und wurden als unbekannte Proteine eingestuft. Bisher konnte von vier aktiven Genen des Virus eins als ein Protein mit Ferredoxin-Domänen identifiziert werden. Die 30 annotierten Gene des Wirtes *E. huxleyi* (Tab. 3.9) weisen einige ribosomale Proteine auf, die für die Proteinsynthese zuständig sind. Auffällig ist die Expression von Stressgenen, wie z.B. Rotamase, Proteine der Ras-Superfamilie und HSP70. FCP-ähnliche Proteine fehlen auch hier.

Tab. 3.9: Annotierte Gene des Wirtes *E. huxleyi* nach 12 Stunden Virusinfektion, deren Häufigkeit und Funktion.

Protein	Häufigkeit	Funktion
40S ribosomales Protein S19	2	Proteinmetabolismus
40S ribosomales Protein S19-like	1	Proteinmetabolismus
60S ribosomales Protein L10	2	Proteinmetabolismus
60S ribosomales Protein L8	1	Proteinmetabolismus
78kd Glucose-regulierendes Protein	1	Stress-induziertes Gen
Adenin-Phosphoribosyltransferase-ähnliches Protein	1	Transkription
ADP-ribosylation factor (Arf)	1	Stress-induziertes Gen
ähnlich EF1 α	1	Proteinmetabolismus
Calmodulin	2	Signaltransduktion; Calciumsensor
Calmodulin-ähnliches Protein	2	Signaltransduktion; Calciumsensor
GAPDH-ähnliches Protein, cytosolisch	1	Glykolyse, Gluconeogenese
GAPDH-ähnliches Protein, kerncodiert	1	Glykolyse, Gluconeogenese
Glycin-Spaltungsenzym, mitochondrial	1	Amminosäurekatabolismus
HSP70-ähnliches Protein	1	Stress-induziertes Gen
kerncodiertes Protein mit unklarer Funktion, Transkriptionsregulator?	1	--
Methionin-Aminopeptidase	1	Proteinmetabolismus
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Rotamase)	1	Stress-induziertes Gen
Phosphoribulose-Kinase-ähnlich	1	Calvin-Zyklus
processing Protease α Untereinheit, mitochondrial	1	Proteinstoffwechsel; Proteinkatabolismus
Ras-ähnliches Protein	1	Stress-induziertes Gent
Ras-verwandtes Protein, GTPase	1	Stress-induziertes Gen
S-Adenosylhomocysteinase-ähnliches Protein	1	Aminosäurekatabolismus
schwach konserviertes Protein mit ATP binding site, Elongationsfaktor ähnlich	1	Proteinmetabolismus
Stress-aktivierte Proteinkinase	1	Stress-induziertes Gen
Ubiquitin	1	Aminosäurekatabolismus
UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphatase	1	?
unbekanntes Protein	48	--

Nach 24 Stunden Virusinfektion konnten von den bisher 96 sequenzierten ESTs 91 annotiert werden, von denen elf aus der Wirtszelle stammen und 80 aus dem Virus. Zwei der elf annotierten Gene aus der Wirtszelle konnten bestimmt werden (Tab. 3.10). Von den 80 annotierten Genen aus dem Virus konnten neun identifiziert werden (Tab. 3.11). Die restlichen 71 ergaben keinen signifikanten Treffer, und wurden als unbekannte Proteine eingestuft, die alle eine Länge zwischen 800 und 1100 kb aufweisen.

Tab. 3.10: Annotierte Gene des Wirtes nach 24 Stunden Virusinfektion, deren Häufigkeit und Funktion.

Protein	Häufigkeit	Funktion
60S Ribosomales Protein L8	1	Proteinmetabolismus
GDP-D-Mannose 4, 6-Dehydratase	1	Zuckermetabolismus
unbekannte Proteine	11	--

Tab. 3.11: Identifizierte Gene des Virus im Wirt nach 24 Stunden Infektion

Protein
Clp Protease (<i>Casein lytic protein</i>)
Clp ähnliches Protein
DNA Topoisomerase II, mitochondrial?
DNA-abhängige RNA Polymerase I
DNA-abhängige RNA Polymerase II
non histone chromosomal protein
Flap Endonuclease
Deoxyuridin 5'-triphosphat Nucleotidhydrolase
Proteinkinase

Beim Gegenüberstellen der Funktionen der aktiven Gene, eingeteilt in verschiedene Kategorien, vor und nach Virusinfektion, wird erkennbar, dass vor Virusinfektion die Photosynthese im Vordergrund steht und schon nach sechs Stunden Virusinfektion rapide abnimmt (Abb. 3.13). Des Weiteren ist zu erkennen, dass nach 6 Stunden Virusinfektion Stress-induzierte Gene vom Wirt exprimiert werden und nach 24 Stunden Virusinfektion aktive Virusgene deutlich überwiegen. Auffällig bei allen Bibliotheken ist die hohe Anzahl an unbekanntem Genen.

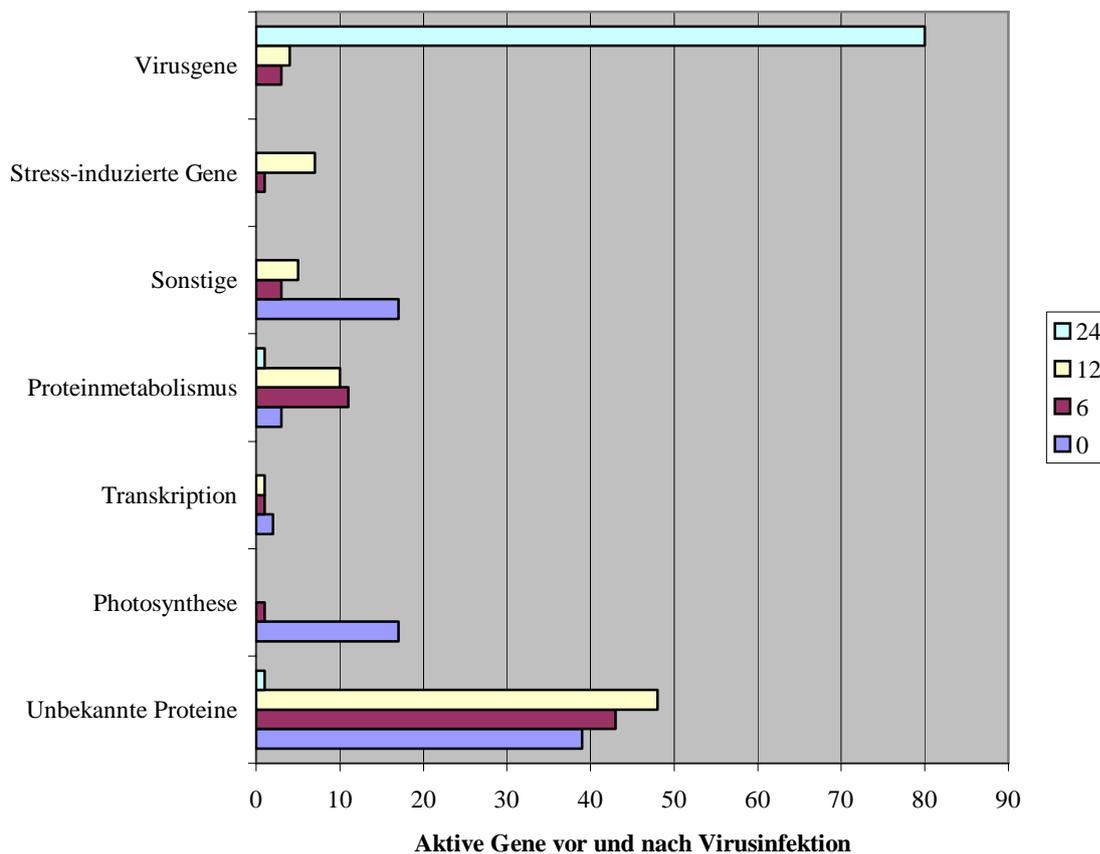


Abb. 3.13: Häufigkeitsverteilung der aktiven Gene nach ihrer Funktion vor (Null) und nach Virusinfektion (6, 12 und 24 Stunden).

4. Diskussion

Die Coccolithophoride *Emiliana huxleyi* ist als Kosmopolit ein wichtiger Vertreter des marinen Phytoplanktons und für die Bildung von riesigen Blüten bekannt (Holligan *et al.*, 1993; Winter *et al.*, 1994). Die Produktion von Coccolithen aus Calciumcarbonat, ihre Rolle im CO₂-Zyklus und ihre Emission von DMS macht sie zu einer besonders wichtigen Art für die marine Primärproduktion, Sedimentformation und den Klimawandel (Charlson *et al.*, 1987; Westbroek *et al.*, 1993; Malin *et al.*, 1994). *E. huxleyi* spielt eine Schlüsselrolle in globalen biogeochemischen Zyklen (Westbroek *et al.*, 1994). Untersuchungen über die Rolle von Viren bei der Kontrolle der Blütenbildung von *E. huxleyi* haben ergeben, dass sie wesentlich an deren Blütenterminierung beteiligt sein können (Bratbak *et al.*, 1993, 1996; Brussaard *et al.*, 1996; Castberg *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2002a). Das Verständnis der Mechanismen der Infektion von *E. huxleyi* Blüten durch Viren ist daher von großem Interesse.

Diese Diplomarbeit hatte zum Ziel, erste Erkenntnisse über den molekularen Mechanismus der EhV86 Virusinfektion von *E. huxleyi* zu erlangen. Der hier verwendete Ansatz beruht auf dem Vergleich von EST Banken, die auf der Synthese von cDNA-Bibliotheken vor und während der Virusinfektion basieren. Da ESTs die aktiven Gene zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung abbilden, könnte der Vergleich der aktiven Gene Rückschlüsse auf den Infektionsmechanismus liefern. Aufgrund dieser Tatsache sollte zunächst RNA aus gut wachsenden *E. huxleyi* Kulturen gewonnen werden, die zur Erstellung einer cDNA-Bibliothek unter guten Wachstumsbedingungen, wie sie etwa während einer Blüte herrschen könnten, verwendet werden sollte. Des Weiteren standen RNA Proben aus gut wachsenden virusinfizierten *E. huxleyi* Kulturen zur Verfügung, die 6, 12 und 24 Stunden nach Infektion gewonnen worden waren.

4.1 Wachstum und RNA-Isolierung von *E. huxleyi*

Um das Wachstumsverhalten des *E. huxleyi* Stammes CCMP1516 besser kennen zu lernen, wurden zunächst einige Wachstumsversuche durchgeführt. Diese ergaben, dass alle Kulturen von Anfang an eine Verdopplung der Zellzahl pro Tag aufwiesen. Keine der Kulturen startete

mit einer *lag* Phase. Dies wird wahrscheinlich an den optimalen Kultivierungskonditionen gelegen haben, die keine Einschränkung auf die wachsenden Zellen bewirkten. Des Weiteren erwies sich eine Anfangszellzahl von 5.000 Zellen pro ml als geeignet. Nach acht Tagen exponentieller Phase kam das Wachstum langsam zum Erliegen. Die stationäre Phase erstreckte sich über einen Zeitraum von weiteren acht Tagen, bis die Zellen langsam abstarben. Daraufhin wurde für die Erstellung einer cDNA-Bibliothek RNA ab Mitte der exponentiellen Phase bis Anfang der stationären Phase gewonnen, da diese den teilungsaktiven Bereich am Besten wiedergeben und so zu erwarten war, eine möglichst repräsentative Bibliothek zu erhalten.

Die RNA-Isolierung aus Mikroalgen kann problematisch sein. Deshalb wurden zwei verschiedene Kits für die RNA-Isolierung getestet und anschließend durch eine zweite Aufreinigung und einen DNase-Verdau optimiert. Schließlich wurde das RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen eingesetzt, da so intakte und saubere RNA als Ausgangsmaterial für eine cDNA Synthese gewonnen werden konnte (Abb. 3.7 und CD im Anhang). So waren die Voraussetzungen für die Erstellung einer optimalen cDNA-Bibliothek aus gut wachsenden Zellen geschaffen.

4.2 Identifizierung und Analyse von ESTs

Bei der Identifizierung von ESTs tritt ein grundsätzliches Problem auf, durch die Tatsache, dass meist nur Teilsequenzen eines Genes ermittelt werden. Diese werden dann normalerweise mit Hilfe der Funktion BLAST Suche im Internet mit bekannten Komplett- oder Teilsequenzen verglichen. Dieser Suchalgorithmus beruht auf paarweisen Vergleichen der zu identifizierenden Sequenz mit Sequenzen aus der Datenbank, der jedoch keine zweifelsfreie Identifizierung der Gene erlaubt. Aufgrund dessen wurde für diese Arbeit erstmalig eine phylogenetische Identifizierung von ESTs eingesetzt. Zuerst wurde für alle ESTs eine BLAST Suche durchgeführt. Anschließend erfolgte für diejenigen ESTs, die einen potenziell signifikanten BLAST Treffer ergaben (e value $< 10^{-7}$), eine Berechnung von phylogenetischen Bäumen mit Hilfe des Programms PhyloGena. Dieses Programm wurde von Kris Hanekamp, Uta Bohnebeck und Klaus Valentin entwickelt, eine Publikation dazu ist eingereicht. Die Bäume und die Sequenzauswahl von PhyloGena wurde für alle ESTs manuell überprüft.

Bei der von der BLAST Analyse vorhergesagten Funktionen der ESTs stellte sich heraus, dass über 50% der Vorhersagen, vor allem im Bereich der unbekanntenen Gene, nicht haltbar waren. Die Identifizierung der Virusgene in den Bibliotheken erfolgte durch BLAST Analyse mit dem bekannten Virusgenom und war stets eindeutig.

4.3 Analyse der in den cDNA-Bibliotheken gefundenen Gene

4.3.1 cDNA-Bibliothek vor Virusinfektion

Um einen Eindruck über die aktiven Gene einer gut wachsenden *E. huxleyi* Kultur zu bekommen, wurde RNA ab Mitte der exponentiellen bis Anfang der stationären Phase aus Kulturen isoliert, die unter normalen Bedingungen gewachsen waren. Anschließend erfolgte aus der gesamten RNA eine mRNA-Isolierung, die als Ausgangsmaterial für die Erstellung einer cDNA-Bibliothek diente.

Die cDNA-Bibliothek enthielt einen Titer von 1.830.000 cfu/ml, aufgrund dessen theoretisch alle aktiven Gene enthalten sein sollten. Eine Analyse von 68 Klonen aus der cDNA-Bibliothek durch Minipreps und anschließenden Restriktionsverdau ergab, dass nur 57% der Klone ein Insert, mit einer Durchschnittsgröße von ~ 800 bp, enthielten. Die kleinsten gefundenen Inserts waren etwa 500 bp groß, die größten ~ 2.300 bp. Theoretisch ist bei Inserts dieser Größe zu erwarten, dass bei einer Sequenzierung genügend Daten für eine Identifizierung von Genen herauskommen. Die Tatsache, dass nur 57% der Klone ein Insert enthielten ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass zu wenig mRNA für die Klonierung zur Verfügung stand (weniger als 500 ng gegenüber der niedrigsten Idealmenge von 1 µg). Aus diesem Grunde ist die Anzahl der sequenzierten Klone höher als die der annotierten Sequenzen.

Es wurden insgesamt 182 Klone sequenziert, von denen 77 annotiert werden konnten. 2200 weitere Sequenzierungen sind in Vorbereitung, die aber für diese Arbeit leider noch nicht zur Verfügung standen. Aber bereits aus den vorhandenen 77 annotierten ESTs lassen sich Schlussfolgerungen ziehen. Der größte Teil der identifizierten ESTs (21%) sind Proteine der Photosynthese, darunter vor allem FCP-ähnliche Proteine, FCP's und LHC's. Des Weiteren treten ESTs auf, die für Proteine kodieren, die für den Zellstoffwechsel (z.B. GAPDH und Trehalose 6-Phosphat-Synthase), den Zellzyklus, die Transkription (z.B. RNA-Helicase), die

Translation und für die Zellkommunikation (Protein-Kinase) zuständig sind. Eine gut wachsende, photosynthetisch aktive Kultur exprimiert also vor allem Gene der Photosynthese und Gene der Reproduktion, des Zellstoffwechsels und der Zellkommunikation. 48% der Gene sind unbekannt.

4.3.2 cDNA-Bibliotheken nach Virusinfektion

Insgesamt wurden bisher 246 Klone sequenziert. Aus den drei cDNA-Bibliotheken sind pro Bibliothek 2000 weitere Sequenzierungen in Vorbereitung, die aber für diese Arbeit leider noch nicht zur Verfügung standen. Trotz der geringen Anzahl an Sequenzen kann schon eine Tendenz über die Veränderungen im Expressionsmuster von *E. huxleyi* angegeben werden.

Schon nach sechs Stunden Virusinfektion wurde festgestellt, dass keine FCP-ähnlichen Proteine mehr aktiv sind. Knapp 17% der 68 Sequenzen kodierten für Proteine, die für die Translation zuständig sind und 4,5% für Proteine, die durch Stress aktiviert werden. 4,5% der Transkripte stammten aus dem Virus, die nicht identifiziert werden konnten. Über 64% der Gene sind unbekannt.

Aus der cDNA-Bibliothek nach 12 Stunden Virusinfektion konnten 82 Sequenzen annotiert werden. Knapp 11% der Sequenzen kodierten für Proteine der Translation und 8,5% für Stress-induzierte Proteine. 4,8% der Transkripte stammten aus dem Virus, von denen nur eins identifiziert werden konnte. Dieses Transkript kodiert für eine Ferredoxin-Domäne. Über 58 % sind unbekannte Proteine.

Aus der cDNA-Bibliothek nach 24 Stunden Virusinfektion konnten 91 Sequenzen annotiert werden. Davon stammten 88% der Transkripte vom Virus.

Aufgrund der viel zu geringen Anzahl an Sequenzen des Wirtes, ist eine Aussage über die Zusammensetzung des Expressionsmusters des Wirtes nach 24 Stunden Virusinfektion nicht möglich.

Das bei der Sequenzierung viele unbekannte Proteine festgestellt wurden, beruht auf der Tatsache, dass Haptophyten im phylogenetischen Stammbaum ursprünglich sind (Abb. 4.1) und bisher selten molekular untersucht wurden.

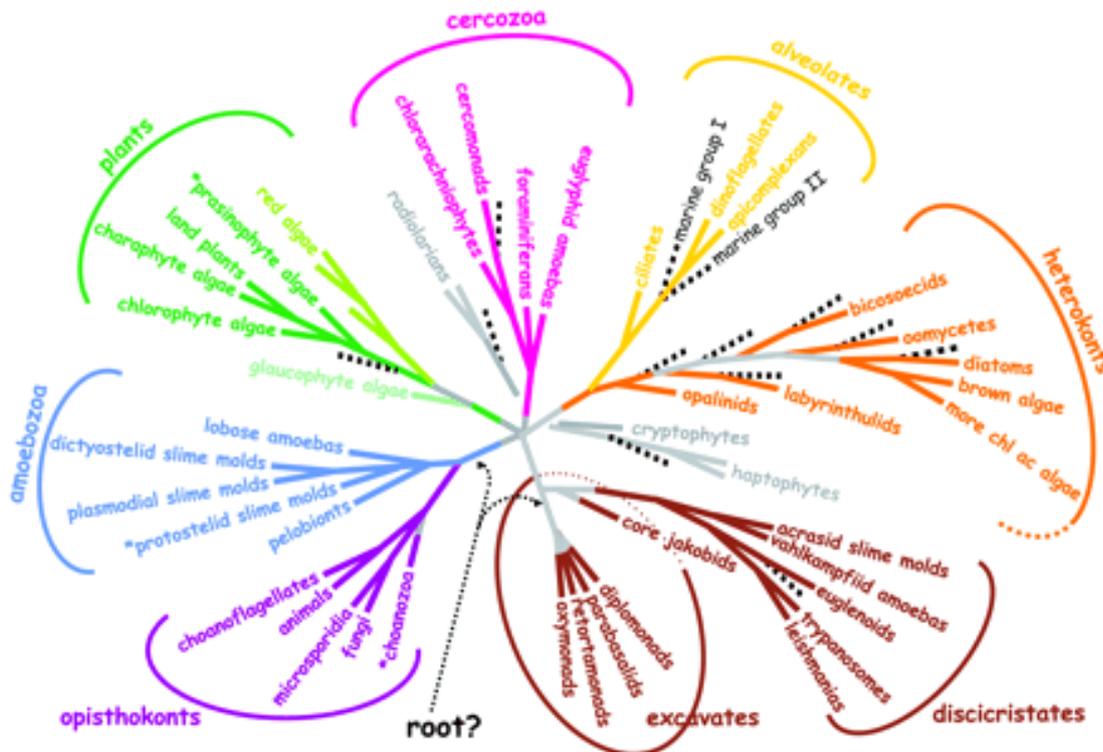


Abb. 4.1: Phylogenetischer Stammbaum („Tree of life“) (Baldauf, 2003).

4.4 Reaktion der *E. huxleyi* Transkription nach Virusinfektion

Bereits nach wenigen Stunden Virusinfektion ist die Transkription in *E. huxleyi* radikal umgestellt. Für die Photosynthese zuständige Transkripte verschwinden fast völlig. Zukünftig sollten deshalb Photosynthesemessungen in die Analyse der viralen Infektion mit einbezogen werden. Es treten vermehrt Transkripte für die Translation und Transkription auf. Des Weiteren werden Stress-induzierte Gene aktiviert. Anfangs sind nur wenige virale Transkripte nachweisbar, wie z.B. eins, das Ferredoxin-Domänen enthält und deshalb möglicherweise mit der Photosynthese interagiert. Da die Photosynthese auch über den Redox-Zustand reguliert wird, für den Ferredoxin eine wichtige Rolle spielt, könnte hier ein Ansatz für die beobachtete Abschaltung der Photosynthesetranskripte liegen.

Nach 24 Stunden Virusinfektion ändert sich das Expressionsmuster erheblich. 80 der 91 Transkripte stammen aus dem Virus und die Transkription von *E. huxleyi* ist stark zurückgegangen.

Unter den aktiven Virusgenen befinden sich Proteine wie Topoisomerase und „non histone chromosomal protein“, die vermutlich für die Verpackung der Virus-DNA verantwortlich sind, und Clp-Proteasen, die wahrscheinlich für den Abbau der Wirtszellproteine zuständig sind (Tab. 4.1). Eine Endonuklease könnte für den Abbau der Wirts-DNA verantwortlich sein. Des Weiteren treten verschiedene DNA-abhängige RNA-Polymerasen auf, die darauf hinweisen, dass bevorzugt Gene des Virus exprimiert werden.

Tab. 4.1: Identifizierte Gene des Virus im Wirt nach 24 Stunden Infektion und deren mögliche Funktion.

Protein	mögliche Funktion
Clp ähnliches Protein	Abbau von Wirtszellproteinen
Clp Protease (<i>Casein lytic protein</i>)	
Deoxyuridin 5'-triphosphat Nucleotidhydrolase	Nukleinsäuremetabolismus
DNA Topoisomerase II	Verpackung der Virus-DNA; Expression von Virusgenen
DNA-abhängige RNA Polymerase I	bevorzugte Expression der Virusgene
DNA-abhängige RNA Polymerase II	
Flap Endonuclease	Abbau von Wirtszellnucleinsäuren
<i>non histone chromosomal protein</i>	Verpackung der Virus-DNA
Proteinkinase	Regulation

4.5 Möglicher Infektionsverlauf des Virus *EhV86* bei *E. huxleyi*

Diese Schlussfolgerungen beruhen bisher nur auf der Sequenzierung von ca. 320 Klonen. Allerdings ist schon eine klare Tendenz zu erkennen. Der Virus scheint offensichtlich sehr schnell, in weniger als sechs Stunden nach Infektion, das Expressionsmuster von *E. huxleyi* stark zu verändern. Der Mechanismus ist bisher völlig unklar. Es könnte virale Gene geben, die vom zellulären Transkriptionsapparat erkannt und abgelesen werden und dann diese Umstellungen bewirken. Gene, die für die Photosynthese zuständig sind, werden auf Kosten von Transkriptions- und Translationsgenen herunterreguliert. In den Banken findet sich ein Kandidatengen: das virale Gen welches für eine Ferredoxin-Domäne kodiert, könnte mit dem

Redoxstatus der Photosynthese interagieren und die Regulation umstellen. Die Hochregulierung der Transkriptions- und Translations-Gene könnte bedeuten, dass der Virus die Transkription und Translation seiner eigenen Gene vorbereitet. Dafür sind anscheinend nur wenige virale Transkripte notwendig. Erstaunlich ist, dass sich in den Banken nach 6 und 12 Stunden Infektionsdauer relativ wenige Virus-Transkripte finden, während nach 24 Stunden diese Phase abgeschlossen ist und die Transkription von *E. huxleyi* fast zum Erliegen kommt. Nun steigt der Anteil der viralen Transkripte auf fast 90%.

Virale RNA Polymerasen sind aktiv und lesen möglicherweise bevorzugt virale Gene ab. Dazu kommen Endonukleasen und Clp-Proteasen, die für den Abbau von Wirts-DNA und Wirts-Proteinen zuständig sein könnten. Der Virus hat also nach spätestens 24 Stunden – etwa die Zeit, die *E. huxleyi* für einen Zellzyklus braucht (s. Abb. 3.1-3.5 und Tab. 3.1 und Anhang) – die Kontrolle übernommen. Dies könnte bedeuten, dass die Infektion irgendwie an den Zellzyklus gebunden ist, etwa weil bestimmte Wirtsproteine benötigt werden. Leider sind zu wenige Wirtssequenzen zu diesem Zeitpunkt bekannt, um darüber Aussagen zu treffen.

Nun ist es erforderlich, mehr ESTs aus den Banken, vor allem aus denen nach Infektion zu sequenzieren. In den Banken 6 und 12 Stunden nach Infektion stehen bisher zu wenige virale Sequenzen für umfassende Aussagen zur Verfügung, das Gleiche gilt für die Wirtstranskripte nach 24 Stunden. Leider war es nicht mehr möglich, diese zusätzlichen Sequenzierungen innerhalb der Zeitspanne, die für diese Diplomarbeit zur Verfügung stand, durchzuführen und auszuwerten.

4.6 Ausblick

Um eine signifikante Aussage über die Veränderungen im Expressionsmuster des Wirtes nach Virusinfektion treffen zu können, sind wesentlich mehr Sequenzen erforderlich. Nach 12 Stunden Virusinfektion nimmt der Virus kaum, nach 24 Stunden jedoch einen erheblichen Einfluss auf das Expressionsmuster von *E. huxleyi*. Um ein besseres Verständnis über den Infektionszyklus zu bekommen, bietet sich die Erstellung einer zusätzlichen cDNA-Bibliothek an. Da der Virus nach Castberg *et al.* (2002) eine Latenzzeit von 12-14 Stunden hat, wäre eine cDNA-Bibliothek nach mindestens 14 Stunden Virusinfektion von besonderem Interesse.

5. Zusammenfassung

Die Coccolithophoride *Emiliana huxleyi* ist als Kosmopolit ein wichtiger Vertreter des marinen Phytoplanktons und für die Bildung von riesigen Blüten bekannt. Ihre Produktion von Coccolithen aus Calciumcarbonat, ihre Rolle im CO₂-Zyklus und ihre Emission von DMS macht *E. huxleyi* zu einer besonders wichtigen Art für die marine Primärproduktion, Sedimentformation und den Klimawandel. *E. huxleyi* spielt eine Schlüsselrolle in globalen biogeochemischen Zyklen. Untersuchungen über die Rolle von Viren bei der Kontrolle der Blütenbildung von *E. huxleyi* haben ergeben, dass sie wesentlich an der Blühterminierung beteiligt sind.

Die vorliegende Diplomarbeit umfasste die Untersuchung der Interaktion zwischen dem Virus *EhV86* und *E. huxleyi* (Stamm CCMP1516) auf molekularer Ebene. Die hier verwendete Methode beruhte auf der Analyse von *Expressed Sequence Tags* (ESTs). ESTs basieren auf der Erstellung einer cDNA-Bibliothek und bilden die zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung aktiven Gene ab.

Um Einblick in das Wachstumsverhalten von *E. huxleyi* zu erhalten, wurden anfangs Wachstumsversuche durchgeführt. Damit für die Synthese einer cDNA-Bibliothek eine saubere und intakte RNA zur Verfügung steht, wurde die RNA-Isolierung optimiert.

Nach der Erstellung einer cDNA-Bibliothek von *E. huxleyi* (vor Virusinfektion) wurde diese mit drei *E. huxleyi* cDNA-Bibliotheken nach der Infektion mit dem Virus *EhV86* (6, 12, und 24 Stunden) durch Sequenzierung und phylogenetische Auswertung verglichen.

Für den Vergleich der exprimierten Gene vor und während des Virusbefalls standen zwar nur ca. 320 ESTs zur Verfügung, doch konnte trotz der geringen Anzahl an ESTs eine deutliche Veränderung im Expressionsmuster von *E. huxleyi* durch den Virusbefall festgestellt werden.

Sechs Stunden nach Virusinfektion nahm die Anzahl der Gene, die für die Photosynthese zuständig sind, rapide ab. Außerdem war eine Expression von Stress-Genen und das Auftreten von vereinzelt Virustranskripten erkennbar.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass nach 24 Stunden Virusbefall die Transkription des Wirtes stark zurückgegangen war. Der größte Teil der aktiven Gene stammte nun von dem Virus. Unter den aktiven Virus-Genen befanden sich solche, die für die Verpackung der Virus-DNA und den Abbau von Wirtsproteinen zuständig sein könnten.

In allen cDNA-Bibliotheken ist der große Anteil an unbekanntem Genen auffällig. Weitere Forschungen auf molekularer Ebene sind also für ein besseres Verständnis der Haptophyten notwendig.

6. Literatur

- Ackleson S, Balch WM & PM Holligan** (1988) White waters of the Gulf of Maine. *Oceanography* **1**: 18-22
- Adams MD et al.** (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tag and human genome project. *Science* **252**: 1651-1656
- Adams MD, Soares MB, Kerlavage AR, Fields C, Venter JC** (1993) Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nature Genetics* **4**: 373-380
- Aiken J, Moore GF & PM Holligan** (1992) Remote sensing of oceanic biology in relation to global climate change. *J. Phycol.* **28**: 579-590
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW & DJ Lipman** (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J & K Struhl** [Eds.] (1985-2004) Current protocols in molecular biology, 4 volumes, John Wiley & Sons, Inc., Boston
- Ayers GP & JL Gras** (1991) Seasonal relationship between cloud condensation nuclei and aerosol methanesulphonate in marine air. *Nature* **353**: 834-835
- Balch WM, Holligan PM, Ackleson SG & KJ Voss** (1991) Biological and optical properties of mesoscale coccolithophore blooms in the Gulf of Maine. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 629-643
- Balch WM, Holligan PM & AK Kilpatrick** (1992) Calcification, photosynthesis and growth of the bloom-forming coccolithophore, *Emiliana huxleyi*. *Cont. Shelf. Res.* **12**:1353-1374

- Baldauf SL** (2003) The deep roots of eukaryotes. *Science* **300**: 1703-1706
- Bates TS, Charlson RJ & RH Gammon** (1987) Evidence for the climatic role of marine biogenic sulfur. *Nature* **329**: 319-321
- Bates TS, Lamb BK, Guenther A, Dignon J & RE Stoiber** (1992) Sulfur Emissions to the Atmosphere from Natural Sources. *Journal Atmospheric Chemistry* **14**: 315-337
- Baumann K-H, Andruleit HA & C Samtleben** (2000) Coccolithophores in the Nordic Seas: comparison of living communities with surface sediment assemblages. *Deep sea Res. II* **47**: 1743-1772
- Baumann K-H, Böckel B & M Frenz** (2004) Coccolith contribution to South Atlantic carbonate sedimentation. In: Thierstein HR & JR Young [Eds.] *Coccolithophores*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 367-402
- Berge G** (1962) Discoloration of the sea due to *Coccolithus huxleyi* 'bloom'. *Sarsia* **6**: 27-40
- Bergh O, Borsheim KY, Bratbak G & M Heldal** (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**: 467-468
- Bown P, Lees JA & JR Young** (2004) Calcareous nannoplankton evolution and diversity through time. In: Thierstein HR & JR Young [Eds.] *Coccolithophores*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 481-508
- Bratbak G, Egge JK & M Heldal** (1993) Viral mortality of the marine alga *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **93**: 39-48
- Bratbak G, Levasseur M, Michaud S, Cantin G, Fernández E, Heimdal BR & M Heldal** (1995) Viral activity in relation to *Emiliania huxleyi* blooms: a possible mechanism of DMSP release? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **128**: 133-142

- Bratbak G, Wilson W & M Heldal** (1996) Viral control of *Emiliana huxleyi* blooms? *J. Mar. Syst.* **9**: 75-81
- Brown CW & JA Yoder** (1994) Blooms of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) in surface waters of the Nova Scotian shelf and the Grand Bank. *J. Plankton. Res.* **15**: 1429-1438
- Brussaard CPD, Kempers RS, Kop AJ, Riegman R & M Heldal** (1996) Virus like particles in a summer bloom of *Emiliana huxleyi* in the North Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **10**: 105-113
- Castberg T, Larsen A, Sandaa RA, Brussaard CPD, Egge JK, Heldal M, Thyrhaug R, van Hannen EJ & G Bratbak** (2001) Microbial population dynamics and diversity during a bloom of the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **221**: 39-46
- Castberg T, Thyrhaug R, Larsen A, Sandaa RA, Heldal M, Van Etten JL & G Bratbak** (2002) Isolation and characterization of a virus that infects *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). *J. Phycol.* **38**: 767-774
- Charlson RJ, Lovelock JE, Andreae Mo & SG Warren** (1987) Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature (Lond.)* **326**: 655-661
- Edwardsen B, Eikrem W, Green JC, Andersen RA, Moon-Van der Staay SY & LK Medlin** (2000) Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. *Phycologia* **39**: 19-35
- Eide LD** (1990) Distribution of coccolithophorids in surface sediments in the Norwegian-Greenland Sea. *Mar. Micropaleontol.* **16**: 65-75
- Fernández E, Boyd P, Holligan PM & DS Harbour** (1993) Production of organic and inorganic carbon within a large-scale coccolithophore bloom in the northeast Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **97**: 271-285

- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT & P Falkowski** (1998) Primary production of the biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* **281**: 237-240
- Fuhrmann JA** (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature (Lond.)* **399**: 541-548
- Guillard RRL** (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith WL & MH Chanley [Eds.] *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, pp 29-60
- Hay WW, Mohler HP, Roth PH, Schmidt RR & JE Boudreaux** (1967) Calcareous nannoplankton zonation of the Gulf Coast and Caribbean-Antillean area and transatlantic correlation. *Trans. Gulf Coastal Assoc. Geol. Soc.* **17**: 428-480
- Higgins DG & PM Sharp** (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**: 237-244
- Holligan PM, Viollier M, Harbour DS, Camus P & M Champagne-Philippe** (1983) Satellite and ship studies of coccolithophore production along a continental shelf edge. *Nature (Lond.)* **304**: 339-342
- Holligan PM** (1986) Phytoplankton distributions along the shelf break. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* **88B**: 239-263
- Holligan PM, Fernández E, Aiken J, Balch WM, Burkill PH, Finch M, Groom SB, Malin G, Muller K, Purdie DA, Robinson C, Trees CC, Turner SM & P van der Wal** (1993) A biogeochemical study of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* in the north Atlantic. *Glob. Biogeochem. Cycles* **7**: 879-900
- Jacobsen A, Bratbak G & M Haldal** (1996) Isolation and characterization of a virus infecting *Phaeocystis pouchetii* (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* **32**: 923-927

- Jaquet S, Heldal M, Iglesias-Rodriguez D, Larsen A, Wilson W & G Bratbak** (2002) Flow cytometric analysis of an *Emiliania huxleyi* bloom terminated by viral infection. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**: 111-124
- Jeffrey SW & SW Wright** (1994) Photosynthetic pigments in the Haptophyta. *In*: Green JC & B Leadbeater [Eds.] *The Haptophyte Algae*. Clarendon Press, Oxford, pp 111-132
- Karsten UC, Wiencke C & GO Kirst** (1992) Dimethylsulphoniopropionate (DMSP) accumulation in green macroalgae from polar temperate regions: Interactive effects of light versus salinity and light versus temperature. *Polar Biol.* **12**: 603-607
- Keller MD, Bellows WK & RRL Guillard** (1989a) Dimethyl sulfide production in marine phytoplankton. *In* Saltzman ES & JW Cooper [Eds.] *Biogenic sulfur in the environment*. ACS Symposium Series No. 393, American Chemical Society, Washington, DC, pp 167-182
- Keller MD, Bellows WK & RRL Guillard** (1989b) Dimethylsulfide production in marine phytoplankton: an additional impact of unusual blooms. *In* Coper EM, Bricelj VM & EJ Carpenter [Eds.] *Novel phytoplankton blooms*. Springer-Verlag, Berlin, pp 101-115
- Kirst GO** (1996) Osmotic adjustment in phytoplankton and microalgae: The use of Dimethylsulfonylpropionate (DMSP). *In*:Keine RP, Visscher PT, Keller MD & GO Kirst [Eds.] *Biological and environmental chemistry of DMSP and related sulfonium compounds*. Plenum Press, New York, pp 121-130
- Lohmann H** (1902) Die Coccolithophoridae, eine Monographie der Coccolithen bildenden Flagellaten. Zugleich ein Beitrag zur Kenntnis des Mittelmeerauftriebs. *Arch. Protistenk.* **1**: 89-165
- Malin G, Turner SM & PS Liss** (1992) Sulfur: the plankton/climate connection. *J. Phycol.* **28**: 590-597

- Malin G, Liss PS & SM Turner** (1994) Dimethyl sulphide: production and atmospheric consequences. In Green JC & BSC Leadbeater [Eds.] *The haptophyte algae*. Systematics Association Special Volume No. 51. Clarendon Press, Oxford, pp 303-320
- Milliman JD** (1993) Production and accumulation of calcium carbonate in the ocean – budget of a nonsteady state. *Glob. Biogeochem. Cycles* **7**: 927-957
- Morse JW & FT Mackenzie** [Eds.] (1990) *Geochemistry of sedimentary carbonates*. Elsevier, Amsterdam
- Nagasaki K & M Yamaguchi** (1997) Isolation of a virus infectious to the harmful bloom causing microalga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Aquat. Microb. Ecol.* **13**: 135-140
- Nagasaki K, Ando M, Imai I, Itakura S & Y Ishida** (1994a) Virus-like particles in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae): a possible red tide disintegration mechanism. *Mar. Biol.* **119**: 307-312
- Nagasaki K, Ando M, Itakura S, Imai I & Y Ishida** (1994b) Viral mortality in the final stage of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) red tide. *J. Plankton Res.* **16**: 1595-1599
- Nanninga HJ & T Tyrell** (1996) Importance of light for the formation of algal blooms by *Emiliana huxleyi*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **136**: 195-203
- Rafalski JA, Hanafey M, Miao GH, Ching A, Lee JM, Dolan M & S Tingey** (1998) New experimental and computational approaches to the analysis of gene expression. *Acta Biochim. Pol.* **45**: 929-934
- Redfield AC, Ketchum BH & FA Richards** (1963) The influence of organisms on the composition of sea-water. In: Hill MN [Ed.], *The sea: ideas and observations on progress in the study of the seas*. Interscience Publ., New York, pp 26-77

- Robertson JE, Robinson C, Turner DR, Holligan PM, Watson AJ, Boyd P, Fernández E & M Finch** (1994) The impact of a coccolithophore bloom on oceanic carbon uptake in the northeast Atlantic during summer 1991. *Deep Sea Res* **41**: 297-314
- Rost B & U Riebesell** (2004) Coccolithophores and the biological pump: responses to environmental changes. *In: Coccolithophores From Molecular Process to Global Impact*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 99-125
- Sambrook J & DW Russel** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition, Coldspring Harbor Lab. Press. ISBN 0879695773
- Samtleben C & T Bickert** (1990) Coccoliths in sediment traps from the Norwegian Sea. *Mar. Micropaleontol* **16**: 39-64.
- Sandaa RA, Heldal M, Castber T, Thyraug R & G Bratbak** (2001) Isolation and characterization of two viruses with large genome size infecting *Chrysochromulina ericina* (Prymnesiophyceae) and *Pyramimonas orientalis* (Prasinophyceae). *Virology* **290**: 272-280
- Sanger F, Nickeln S & AR Coulson** (1977) DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Schmitt AO, Specht T, Beckmann G, Dahl E, Pilarsky CP, Hinzmann B & A Rosenthal** (1999) Exhaustive mining of EST libraries for genes differentially expressed in normal and tumour tissues. *Nucl. Acids Res.* **27**: 4251-4260
- Schroeder D, Oke J, Malin G & WH Wilson** (2002) Coccolithovirus (*Phycodnaviridae*): characterization of a new large dsDNA algal virus that infects *Emiliania huxleyi*. *Arch. Virol.* **147**: 1685-1698
- Sukhanova IN & MV Flint** (1998) Anomalous blooming of coccolithophorids over the eastern Bearing Sea shelf. *Oceanology* **38**: 502-505

- Suttle CA** (2000) Ecological, evolutionary, and geochemical consequences of viral infection of cyanobacteria and eukaryotic algae. *In: Hurst CJ [Ed.] Viral Ecology*. Academic Press, New York, pp 247-296
- Thierstein HR, Geitzenauer KR, Molfino B & NJ Shackleton** (1977) Global synchronicity of late Quaternary coccolith datum levels: validation by oxygen isotopes. *Geology* **5**: 400-404
- Van Etten JL, Lane LC & RH Meints** (1991) Viruses and virus-like particles of eukaryotic algae. *Microbiol. Rev.* **55**: 586-620
- Van Etten JL & RH Meints** (1999) Giant viruses infecting algae. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 447-494
- Van Etten JL, Graves MV, Müller DG, Boland W & N Delaroque** (2002) *Phycodnaviridae* – large DNA algal viruses. *Arch. Virol.* **147**: 1479-1516
- Westbroek P, Dejong EW, Van der Wal P, Borman AH, Devrind JPM, Kok D, Debruijn WC & SB Parker** (1984) Mechanism of calcification in the marine alga *Emiliana huxleyi*. *Philosophical Society of the Royal Society B*, **304**: 435-444
- Westbroek P, Young JR & KJ Linchooten** (1989) Coccolith production (biomineralization) in the marine algae *Emiliana huxleyi*. *J. Protozool.* **36**: 368-373
- Westbroek P, Brown CW, Van Bleijswijk J, Brownlee C, Jan Brummer G, Conte M, Egge J, Fernandez E, Jordan R, Knappertsbusch M, Stefels J, Veldhius M, Van der Wal P & J Young** (1993) A model system approach to climate forcing. The example of *Emiliana huxleyi*. *Global Planet Change* **8**: 27-46
- Westbroek P, Van Hinte J, Brummer G-R, Veldhius M, Brownlee C, Green Jc, Harris R & B Heimdal** (1994) *Emiliana huxleyi* as a key to biosphere-geosphere interaction. *In: Green JC & B Leadbeater [Eds.] The Haptophyte Algae*. Clarendon Press, Oxford, pp 321-334

- Wilson WH, Turner S & NH Mann** (1998) Population Dynamics of Phytoplankton and Viruses in a Phosphate-limited Mesocosm and their Effect on DMSP and DMS Production. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **46**: 49-59
- Wilson WH, Tarran GA & MV Zubkov** (2002a) Virus dynamics in a coccolithophore-dominated bloom in the north Sea. *Deep Sea Res.* **49**: 2951-2963
- Wilson WH, Tarran GA, Schroeder DC, Cox M, Oke J & G Malin** (2002b) Isolation of viruses responsible for the demise of an *Emiliania huxleyi* bloom in the English Channel. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **82**: 369-377
- Wilson WH et al.** Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a Coccolithovirus. *Science*, In Revision.
- Winter A, Jordan RW, & PH Roth** (1994) Biogeography of living coccolithophores in ocean waters. In Winter A & WG Siesser [Eds.] *Coccolithophores*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 161-177
- Wommack KE & RR Colwell** (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 69-114
- Young JR, Bown PR & JA Burnett** (1994) Palaeontological perspectives. In Green JC & BSC Leadbeater [Eds.] *The haptophyte algae*. Systematics Association Special Volume No. 51. Clarendon Press, Oxford, pp 378-392
- Young JR, Davis SA, Bown PR & S Mann** (1999) Coccolith ultrastructure and biomineralization. *J. Struct. Biol.* **126**: 195-215
- Ziveri P & RC Thunell** (2000) Coccolithophore export production in Guaymas Basin, Gulf of California: response to climate forcing. *Deep Sea Res.* **47**: 2073-2100
- Ziveri P, Broerse ATC, van Hinte JE, Westbroek P & S Honjo** (2000) The fate of coccoliths at 48° N 21° W, northeastern Atlantic. *Deep Sea Res.* **47**: 1853-1875

7. Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Wolf-Gladrow (AWI Bremerhaven) für die Übernahme und Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Holger Hesse (FU Berlin) danke ich dafür, dass er das Risiko auf sich genommen hat, eine externe Arbeit zu betreuen, seinem Interesse an der Arbeit und seiner freundlichen Anteilnahme.

Bei meinem Betreuer Dr. Klaus Valentin möchte ich mich besonders bedanken, der es mir erst ermöglicht hat, diese Arbeit am AWI in Bremerhaven durchzuführen. Er stand mir bei all meinen Fragen und aussichtslosen Momenten immer hilfreich und geduldig zur Seite und ermöglichte mir in Frankreich bei einem Meeting dabei zu sein und in England molekularbiologische Arbeiten durchzuführen.

Für die freundliche Aufnahme in die verschiedenen Arbeitsgruppen, für hilfreiche Ratschläge und Unterstützung in manch aussichtslosen Situationen und für die netten Aktivitäten außerhalb des Instituts möchte ich mich sehr bei folgenden Mitarbeitern des AWI in alphabetischer Reihenfolge bedanken: Erika Allhusen, Bánk und Sará Beszteri, Maddalena Bayer, Richard M. Crawford, Gerhard Diekmann, Sonja Diercks, Steffani Gaebler, Christine Gescher, Nikolai Hoch, Sandra Jansen, Uwe John, Ines Jung, Andreas Krell, Henrik Lange, Gerald Langer, Linda Medlin, Helga Mehl, Katja Metfies, Shinya Sato, Sabine Strieben, Kerstin Toebe und Scarlett Trimborn.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. W. Wilson vom PML bedanken, der mir die Möglichkeit gab, in Plymouth einige molekularbiologische Arbeiten durchzuführen. Ein besonderer Dank geht an Matt Hall, der mir beim Klone picken und weiteren Schritten zur Seite stand. Vielen Dank an all die freundlichen und hilfsbereiten Mitarbeitern aus Plymouth.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich über das gesamte Studium und die Zeit am AWI moralisch und finanziell unterstützt haben, sowie meinen Großeltern Biba-Oma, Uschi-Oma und „Huschel“, ohne die ich den Aufenthalt in Bremerhaven nicht hätte finanzieren können.

Besonders möchte ich mich bei Jan-Erik Lentz bedanken, für seine liebevolle Unterstützung und Motivation auch in schweren Stunden.

Vielen lieben Dank auch an meinen Bruder und all meine lieben Berliner Freunde, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

VIELEN LIEBEN DANK!

8. Anhang

Herstellung des Salzwassermedium nach Guillard 1975

Die Stocklösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Zusammensetzung der Stocklösungen:

A) Nährsalzstocklösungen (alle Lösungen wurden mit bidest. Wasser angesetzt):

1) NaNO ₃	75 g/l
2) Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	6.24 g/l
3) Na ₂ SiO ₃ x 9 H ₂ O	15 g/l
4) Metall-Mix-Stocklösungen	
a) ZnSO ₄ x H ₂ O	0.15 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.10 g
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0.12 g
MnSO ₄ x H ₂ O	2.00 g
(gelöst in 100 ml bidest. Wasser)	
b) FeCl ₃ x 6 H ₂ O	5 g / 100ml bidest. Wasser
c) Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.065 g / 100 ml bidest. Wasser
d) Na ₂ EDTA (Titriplex III)	5 g / 100 ml bidest. Wasser

Zusammensetzung der Metal-Mischung:

10 ml der Stocklösung a)

10 ml der Stocklösung b)

10 ml der Stocklösung c)

100 ml der Stocklösung d)

Die Mischung wird auf 1000 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt.

Die Stocklösungen 1 – 4 wurden autoklaviert.

5) Vitaminlösung

Stocklösungen:

a) Biotin 1 mg / 10 ml bidest. Wasser

b) Vitamin B12 1 mg / 10 ml bidest. Wasser

Zusammensetzung der Vitaminmischung:

1 ml der Stocklösung a)

1 ml der Stocklösung b)

20 mg Thiamin-HCL

Die Vitamin-Mischung wurde bei -20°C gelagert.

Zusammensetzung des F/2-Mediums:

Zu 1000 ml antarktischem Seewasser wurden folgende Komponenten zugegeben:

- 1 ml NaNO_3 -Stocklösung
- 1 ml Na_2HPO_4 -Stocklösung
- 1 ml Na_2SiO_3 -Stocklösung
- 1 ml Metal-Mischung
- 1 ml Vitamin-Mischung

Nach dem Durchmischen wurde mit HCL der pH auf 7,5 – 7,8 eingestellt.

TEN Puffer:

10mM Tris-HCL, pH 7,5

0,1 mM EDTA

25 mM NaCl

50 x TAE (Elektrophoresepuffer)

242 g Tris-Base

57,1 ml Essigsäure

100 ml 0,5 mM EDTA, pH 8,0

mit H_2O auf 1000 ml auffüllen

1 x TAE

20 ml 50 x TAE

980 ml H_2O

Herstellung des LB (Luria-Bertani) Mediums:

Angaben pro Liter:

- 10 g Trypton
- 5 g Hefe
- 10 g Natriumchlorid
- 15 g Agar (nur für die Agarplatten)
- 100 mg Ampicillin bzw. 50 mg Kanamycin

Das Ampicillin oder Kanamycin wird erst zu der Mischung dazugegeben, wenn die Mischung autoklaviert wurde und auf ca. 50°C abgekühlt ist.

Rohdaten der Wachstumsmessungen:

Tab. 8.1: Zellzahlen der Vorkulturen mit einer Anfangszellzahl von 50 Zellen pro ml.

Tage	Kultur 1 [Zellen pro ml]	Kultur 2 [Zellen pro ml]	Kultur 3 [Zellen pro ml]
1	50	50	50
6	5.167	6.013	5.825
7	13.463	16.309	16.479
8	35.969	44.377	49.198
9	95.576	120.700	140.200
10	243.700	329.800	385.300
11	590.200	819.300	965.500
12	1.264.000	1.624.000	1.831.000
13	2.199.000	2.630.000	2.826.000
14	2.884.000	3.030.000	3.215.000
15	3.237.000	3.171.000	3.333.000
16	3.334.000	3.263.000	3.343.000
17	3.416.000	3.229.000	3.368.000
20	3.355.000	3.148.000	3.283.000

Tab. 8.2: Zellzahlen der Vorkulturen mit einer Anfangszellzahl von 5.000 Zellen pro ml.

Tage	Kultur 1 [Zellen pro ml]	Kultur 2 [Zellen pro ml]	Kultur 3 [Zellen pro ml]
1	5.000	5.000	5.000
2	10.626	10.263	9.963
3	30.942	30.635	30.093
4	94.333	93.504	91.460
5	284.200	284.300	280.700
6	755.000	719.000	720.600
7	1.640.000	1.612.000	1.615.000
8	2.670.000	2.589.000	2.823.000
9	3.310.000	3.055.000	3.282.000
10	3.543.000	3.291.000	3.422.000
11	3.812.000	3.506.000	3.580.000
12	3.815.000	3.587.000	3.603.000
13	3.787.000	3.588.000	3.609.000
14	3.741.000	3.511.000	3.645.000
15	3.793.000	3.628.000	3.619.000
16	3.743.000	3.611.000	3.723.000
17	3.556.000	3.720.000	3.647.000
20	3.163.000	3.214.000	3.150.000

Tab. 8.3: Zellzahlen der Vorkulturen mit einer Anfangszellzahl von 50.000 Zellen pro ml.

Tage	Kultur 1 [Zellen pro ml]	Kultur 2 [Zellen pro ml]	Kultur 3 [Zellen pro ml]
1	50.000	50.000	50.000
2	98.232	93.275	95288
3	331.000	305.600	279300
4	854.400	812.400	761500
5	1.737.000	1.689.000	1597000
6	2.713.000	2.676.000	2579000
7	3.166.000	3.172.000	3074000
8	3.370.000	3.427.000	3204000
9	3.354.000	3.492.000	3299000
10	3.515.000	3.568.000	3330000
11	3.599.000	3.668.000	3394000
12	3.552.000	3.693.000	3419000
13	3.500.000	3.590.000	3412000
14	3.453.000	3.572.000	3304000
15	3.446.000	3.400.000	3276000
16	3.396.000	3.425.000	3367000
17	3.327.000	3.275.000	3299000
20	2.917.000	1.842.000	2885000

Tab. 8.4: Zellzahlen des Hauptexperimentes mit einer Anfangszellzahl von 5.000 Zellen pro ml. Die Wachstumsmessung erfolgte mittel Coulter Counter und Durchflusscytometer (FACS).

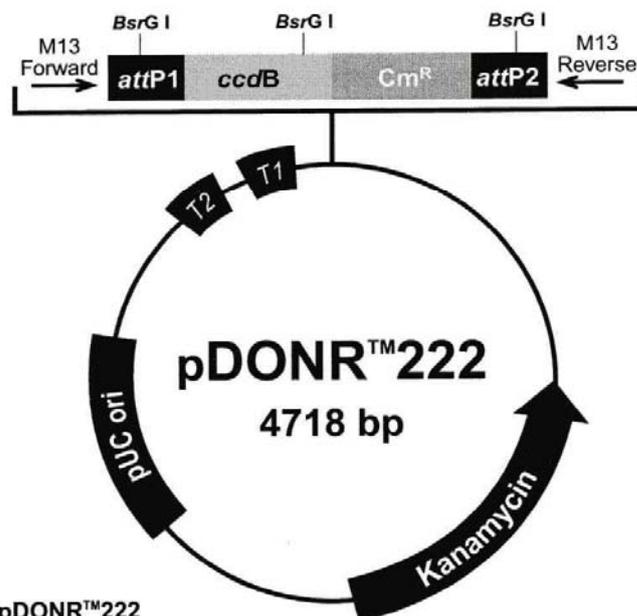
Tage	Kultur 1 [Zellen pro ml]		Kultur 2 [Zellen pro ml]	
	Coulter Counter	FACS	Coulter Counter	FACS
1	5.000	5.000	5.000	5.000
2	15.250	9.231	10.340	15.390
3	34.655	7.769	23.043	22.270
4	62.745	20.343	61.300	56.616
5	196.000	132.628	162.500	141.723
6	472.600	266.175	441.500	374.074
7	1.084.000	904.069	1.017.000	864.314
8	2.037.000	1.335.174	1.966.000	1.526.385
9	2.995.000	2.185.611	2.875.000	2.198.502
10	3.237.000	1.983.900	3.155.000	2.058.729
11	3.316.000	1.662.736	3.232.000	2.036.379
12	3.289.000	708.152	3.249.000	177.576
13	2.805.000		3.308.000	
14	3.099.000		3.390.000	
15	2.939.000		3.354.000	
16	2.843.000		3.479.000	
17	2.952.000		3.354.000	
20	2.085.000		2.934.000	

Sequenzierungskarte des Klonierungsvektors pDONRTM 222 (<http://www.invitrogen.com>)

Map and Features of pDONRTM 222

pDONRTM 222 Map

The map below shows the elements of pDONRTM222. The complete sequence of pDONRTM222 is available from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 77).



Comments for pDONRTM222 4718 nucleotides

- rrnB* T2 transcription termination sequence: bases 58-85 (c)
- rrnB* T1 transcription termination sequence: bases 217-260 (c)
- M13 Forward (-20) priming site: bases 327-342
- attP1*: bases 360-591
- BsrG I* restriction sites: bases 442, 1232, 2689
- ccdB* gene: bases 987-1292 (c)
- Chloramphenicol resistance gene: bases 1612-2295 (c)
- attP2*: bases 2543-2774 (c)
- M13 Reverse priming site: bases 2816-2832
- Kanamycin resistance gene: bases 2899-3714 (c)
- pUC origin: bases 4045-4718
- (c) = complementary strand



Biotechnologie AG

Certificate of Analysis

Product name: Standard cDNA library from *E. kuxleyi* 6 h after virus infection

Storage: - 70°C

Shipping: Dry ice

Description: For a detailed description of synthesis, further processing and cloning of the cDNA as well as details about the performed quality checks see the product-specific documentation

Quality controls performed

Quality and integrity of RNA examined by

a. denaturing agarose gel analysis

no

b. spectrophotometry

no

Quality and integrity of cDNA examined by PCR

yes

Insert length distribution determined by mass colony PCR

yes

Library characteristics

Cloning vector

pBS II sk +

Bacterial strain used for transformation

TransforMax™ EC100™ -T1^R

cDNA fraction used for cloning

> 500 bp

Vector background (plasmids without inserts)

< 5 %

Titer of library

1400 cfu/μl

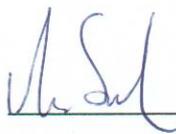
Aliquots delivered

8 x 370 μl

Total number of clones in library

4.100.000 cfu

FOR RESEARCH USE ONLY

APPROVED BY: 

DATE: 24. Februar 2005

vertis Biotechnologie AG
Lise-Meitner Straße 30
D-85354 Freising-Weißenstephan, Germany
Phone: xx49/ (0) 8161/141-1211 Fax: xx49/ (0) 8161/141-1212

Certificate of Analysis



Product name: Standard cDNA library from *E. kuxleyi* 12 h after virus infection

Storage: - 70°C

Shipping: Dry ice

Description: For a detailed description of synthesis, further processing and cloning of the cDNA as well as details about the performed quality checks see the product-specific documentation

Quality controls performed

Quality and integrity of RNA examined by

a. denaturing agarose gel analysis no

b. spectrophotometry no

Quality and integrity of cDNA examined by PCR yes

Insert length distribution determined by mass colony PCR yes

Library characteristics

Cloning vector pBS II sk +

Bacterial strain used for transformation TransforMax™ EC100™ -T1^R

cDNA fraction used for cloning > 500 bp

Vector background (plasmids without inserts) < 5 %

Titer of library 2200 cfu/μl

Aliquots delivered 8 x 370 μl

Total number of clones in library 6.500.000 cfu

FOR RESEARCH USE ONLY

APPROVED BY: 

DATE: 24. Februar 2005

vertis Biotechnologie AG
Lise-Meitner Straße 30
D-85354 Freising-Weihenstephan, Germany
Phone: xx49/ (0) 8161/141-1211 Fax: xx49/ (0) 8161/141-1212

Certificate of Analysis



Product name: Standard cDNA library from *E. kuxleyi* 24 h after virus infection

Storage: - 70°C
Shipping: Dry ice

Description: For a detailed description of synthesis, further processing and cloning of the cDNA as well as details about the performed quality checks see the product-specific documentation

Quality controls performed

Quality and integrity of RNA examined by	
a. denaturing agarose gel analysis	no
b. spectrophotometry	no
Quality and integrity of cDNA examined by PCR	yes
Insert length distribution determined by mass colony PCR	yes

Library characteristics

Cloning vector	pBS II sk +
Bacterial strain used for transformation	TransforMax™ EC100™-T1 ^R
cDNA fraction used for cloning	> 500 bp
Vector background (plasmids without inserts)	< 5 %
Titer of library	1600 cfu/μl
Aliquots delivered	8 x 370 μl
Total number of clones in library	4.700.000 cfu

FOR RESEARCH USE ONLY

APPROVED BY: 

DATE: 24. Februar 2005

vertis Biotechnologie AG
 Lise-Meitner Straße 30
 D-85354 Freising-Weißenstephan, Germany
 Phone: xx49/ (0) 8161/141-1211 Fax: xx49/ (0) 8161/141-1212