

Lehrstuhl für Zierpflanzenbau  
der Technischen Universität München

# **UV-induzierte Veränderungen der Genexpression bei marinen Makroalgen**

Stephan Georg Kremb

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Wilfried Huber

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Gert Forkmann  
2. Univ.-Prof. Dr. Christian Wiencke

Die Dissertation wurde am 28.09.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.01.2007 angenommen.

## Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewicht pro Volumenprozent
°C	Grad Celsius
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
cfu	Kolonie-bildende Einheiten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
g	Gramm
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kb	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
m	Meter
M	molar
MA	Milliampere
mg	Milligramm
Min	Minuten
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidiert)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optische Dichte
PAR	Photosynthetisch aktive Strahlung

p.a.	pro analysi
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S	Sekunden
SSH	Subtraktive Suppressions-Hybridisierung
U	Unit
UV	Ultraviolet
V	Volt
W	Watt

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Marine Makroalgen und ihre Bedeutung</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Strahlungsverhältnisse im Meer und ihre Auswirkung für Makroalgen</b>	<b>2</b>
<b>1.3 UV-Strahlung und Makroalgen</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Auswirkungen der UV-Strahlung</b>	<b>7</b>
1.4.1 Allgemeiner Überblick	7
1.4.2 Ökologische Betrachtungen	8
1.4.3 Wachstum	9
1.4.4 Photosynthese	10
1.4.5 Entwicklungsstadium	14
1.4.6 UV-Schutzsubstanzen	14
1.4.7 ROS und oxidativer Stress	15
1.4.8 DNA-Schäden und Reparatur	17
1.4.9 Genexpression	18
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Chemikalien</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Puffer, Lösungen und Medien</b>	<b>23</b>
2.2.1 Extraktion von Nukleinsäuren	23
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	23
2.2.3 Bakterienkulturen	24
2.2.4 Makroarray-Analysen	24
2.2.5 Mikroarray-Analysen	25
2.2.6 HPLC-Analysen	25
<b>2.3 Molekularbiologische Reagenzien und Verbrauchsmittel</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Bakterien und Plasmide</b>	<b>26</b>
<b>2.5 Geräte und andere Hilfsmittel</b>	<b>28</b>
2.5.1 Laborgeräte	28
2.5.2 Geräte für Strahlungs-Exposition und Lichtmessung	28
<b>2.6 Durchführung der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>2.7 Das Untersuchungsgebiet</b>	<b>29</b>
<b>2.8 Verwendete Algen</b>	<b>31</b>
2.8.1 <i>Acrosiphonia</i> sp.	32
2.8.2 <i>Monostroma arcticum</i>	32
2.8.3 <i>Laminaria saccharina</i> , <i>L. digitata</i> und <i>L. solidungula</i>	33
<b>2.9 Bestrahlungsversuche</b>	<b>34</b>
2.9.1 Laborversuche mit künstlicher UV-Strahlung	34
2.9.1.1 Bestrahlungsversuche in Bremerhaven	34
2.9.1.2 Bestrahlungsversuche im Labor auf Spitzbergen (Ny-Ålesund)	34
2.9.2 Freilandversuche	35
<b>2.10 Lichtmessungen</b>	<b>37</b>
<b>2.11 Beobachtungen im Freiland</b>	<b>38</b>
<b>2.12 Isolierung von RNA</b>	<b>39</b>
2.12.1 Modifizierte Methode nach Chang et al. (1993) für Grünalgen	39
2.12.2 Modifizierte Methode nach Apt et al. (1995) für <i>Laminaria</i>	40
2.12.3 Isolierung von Poly(A) <sup>+</sup> -RNA	40

<b>2.13 Physikalische Analyse von Nukleinsäuren</b>	<b>41</b>
2.13.1 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	41
2.13.2 Agarose-Gelelektrophorese	41
<b>2.14 Suppressive Subtraktions-Hybridisierung (SSH)</b>	<b>42</b>
2.14.1 Herstellung von Tester und Driver	46
2.14.2 Subtraktive Hybridisierung	47
2.14.3 Suppressions-PCR	47
<b>2.15 Herstellung größen-selektionierter Genbibliotheken</b>	<b>48</b>
2.15.1 Amplifizierung des Ausgangsmaterials mittels <i>SMART</i> -Methode	49
2.15.2 Ligation und Transformation der cDNA	51
2.15.3 Vereinzeln und Vermehrung der cDNA-Moleküle	52
2.15.4 Herstellung einer Genbibliothek durch die <i>vertis Biotechnologie AG</i>	52
<b>2.16 Screening der Genbibliotheken mittels Array-Technologie</b>	<b>53</b>
2.16.1 Herstellung der Makroarray-Membranen	53
2.16.2 Radioaktive Markierung der cDNA-Sonden	56
2.16.3 Hybridisierung der Makroarray-Membranen	57
2.16.4 Analyse der Hybridisierungsergebnisse	57
2.16.5 Herstellung der Mikroarrays	58
2.16.6 cDNA-Synthese und Markierungsreaktion	58
2.16.7 Hybridisierung der Mikroarrays	60
<b>2.17 Sequenzierung und Sequenzanalysen</b>	<b>61</b>
<b>2.18 Überprüfung der Array-Ergebnisse mittels Real-Time-PCR</b>	<b>62</b>
2.18.1 cDNA-Synthese	63
2.18.2 Design und Überprüfung der Primer für die Real-Time-PCR	64
2.18.3 Durchführung der real-time RT-PCR (qRT-PCR)	65
<b>2.19 HPLC-Analysen</b>	<b>66</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>67</b>
3.1. <i>Acrosiphonia sp.</i>	67
3.2. <i>Monostroma arcticum</i>	90
3.3. <i>Laminaria spp.</i>	107
3.4 Beobachtungen im Freiland	117
<b>4. Diskussion</b>	<b>122</b>
4.1 Einführung und methodische Ansätze	122
4.2 Beobachtungen im Freiland	125
4.3 UV-Effekte auf die Genexpression bei <i>Acrosiphonia sp.</i>	126
4.3.1 Photosynthese	127
4.3.2 Stress- und Abwehr	129
4.3.3 Regulationsprozesse	131
4.3.4 Proteinabbau	132
4.3.5 Weitere Stoffwechselprozesse	133
4.4 UV-Effekte auf die Genexpression bei <i>Monostroma arcticum</i>	136
4.4.1 Photosynthese	137
4.4.2 Regulationsprozesse	138
4.4.3 Stress, Abwehr und Proteinabbau	139
4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse für <i>Acrosiphonia sp.</i> und <i>M. arcticum</i>	141
4.6 UV-Effekte auf die Genexpression bei <i>Laminaria spp.</i>	144
4.7 Schlußbetrachtung und Ausblick	147

<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>149</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>151</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Marine Makroalgen und ihre Bedeutung

Die Oberfläche der Erde ist zu gut zwei Dritteln von Ozeanen bedeckt, die – je nach Lichtdurchlässigkeit - bis in eine Wassertiefe von etwa 150 Metern von photosynthetisch aktiven Organismen besiedelt sind. Ein Großteil dieser Lebewesen wird unter dem Begriff „Algen“ zusammengefasst. Hierzu zählen sowohl freischwebende, als auch am Meeresgrund festgewachsene Vertreter, deren Größenspektrum von einigen Mikrometern bis zu vielen Metern reichen kann.

Während im offenen Ozean vor allem mikroskopisch kleine Algen, das sogenannte Phytoplankton, für die Hauptmasse der Primärproduktion verantwortlich sind, spielen in den Küstenökosystemen der gemäßigten und polaren Breiten festgewachsene Großalgen eine bedeutende Rolle. (Lüning 1985)

Die marinen Großalgen werden in drei Gruppen eingeteilt, die sich sowohl phylogenetisch als auch biochemisch deutlich voneinander unterscheiden. Eine sehr isolierte Gruppe innerhalb der Algen stellen die Rotalgen (*Rhodophyta*) dar. Ihre phylogenetische Einordnung ist umstritten, jedoch weisen diese Algen sehr deutliche Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen der Makroalgen auf. Besondere Merkmale dieser Gruppe sind das Vorkommen der akzessorischen Pigmente Phycoerythrin und Phycocyanin und die Nutzung von „Florideenstärke“ als Reservepolysaccharid. (van den Hoek 1993; Christensen 1994)

Die Braunalgen (*Phaeophyceae*) stellen eine weitere Gruppe der Makroalgen dar. Unter ihnen findet man die größten Algen überhaupt, einzelne Exemplare von *Macrocystis pyrifera* vor der Küste Kaliforniens können Größen von über 50 Metern erreichen. Die Braunalgen werden der Abteilung *Heterokontophyta* zugeordnet, der unter anderen auch die große Gruppe der Kieselalgen (*Bacillariophyta*) angehört. Die Braunalgen bilden an den Küsten der gemäßigten und polaren Breiten häufig sehr dichte Bestände wobei hier besonders die ausgedehnten *Laminaria*-Wälder genannt werden sollen, die unter der Niedrigwasserlinie den felsigen Meeresboden der nordatlantischen und nordpazifischen Küsten bedecken. Ihre braune Färbung erhalten die *Phaeophyceen* durch das akzessorische Pigment Fucoxanthin, daneben kommen auch noch weitere Xanthophylle wie Violaxanthin oder Neoxanthin vor, wohingegen Chlorophyll b bei diesen Algen immer fehlt. (Lüning 1985; van den Hoek 1993)

Die dritte Gruppe der Makroalgen, die Grünalgen (*Chlorophyta*), gelten gemeinhin als Bindeglied zu den Moosen und Gefäßpflanzen. Den *Chlorophyta* werden auch einige bekannte ein- und wenigzellige Vertreter wie *Chlamydomonas*, *Euglena* oder *Volvox* zugerechnet. Das grüne Chlorophyll wird bei diesen Algen nicht durch akzessorische Pigmente maskiert, weiterhin kommt bei dieser Gruppe – im Gegensatz zu den beiden Vorgenannten – neben Chlorophyll a auch Chlorophyll b vor. Die Vertreter der *Chlorophyta* besiedeln häufig den obersten Teil der Gezeitenzone felsiger Küsten und kommen hier in zum Teil sehr hohen Abundanzen vor. (Lüning 1985; van den Hoek 1993)

Den Makroalgen kommt vor allem in den Küstenökosystemen der polaren und kaltgemäßigten Breiten eine bedeutende Rolle zu. Neben der schon erwähnten hohen Primärproduktion, die Lebensgrundlage für viele andere Organismen ist, tragen diese Pflanzen häufig zu einer Stabilisierung von Sedimenten bei, puffern Veränderungen von Nährstoffkonzentration in der Wassersäule ab und dienen darüber hinaus vielen Tierarten als Nahrung, Lebensraum und Kinderstube. Auch der Mensch nutzt Algen bereits seit langer Zeit als Nahrungsquelle, als Dünger und zur Produktion verschiedenster Produkte. (Lüning 1985)

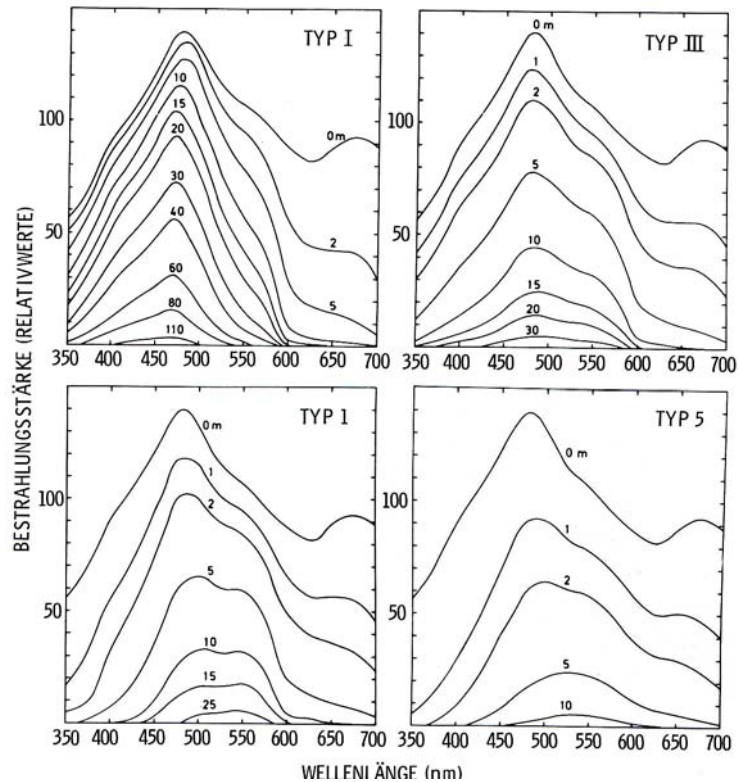
So wurden vor allem in Ostasien Meeresalgen schon früh als Nahrungsmittel verwendet, zu nennen sind hier etwa die Braunalgen *Laminaria* und *Undaria* sowie die Rotalge *Porphyra* (japanisch: Nori). Letztere besitzt einen vergleichsweise hohen Proteingehalt, während die Braunalgen für ihren hohen Jodgehalt bekannt sind und schon früh als Mittel gegen Kropfbildung verwendet wurden. Weiterhin werden Makroalgen zur Gewinnung von Phykokolloiden wie Agar, Carrageenan oder Alginaten genutzt, die vielfältig eingesetzt werden können. In letzter Zeit werden Algen auch immer mehr als Quelle neuer pharmazeutisch wirksamer Substanzen entdeckt.

## **1.2 Strahlungsverhältnisse im Meer und ihre Auswirkung für Makroalgen**

Algen benötigen – wie alle photoautotrophen Organismen - zur Aufrechterhaltung der Photosynthese elektromagnetische Strahlung bestimmter Wellenlängen. Beim Auftreffen und Eindringen des Lichtes in den Wasserkörper erfährt dieses deutliche Veränderungen in der Stärke und des Wellenlängenspektrums. Beim Auftreffen auf die Wasseroberfläche wird ein Teil der Strahlung reflektiert und die Intensität des in den Wasserkörper eindringenden Anteils wird dort durch Absorption und Streuung verringert.



Durch die Absorption werden die verschiedenen Spektralbereiche in unterschiedlichem Ausmaß geschwächt. In klarem Meerwasser liegt das Minimum der Absorption bei 465 nm im Blaubereich, zum kurzwelligeren wie zum langwelligeren Spektralbereich nimmt die Absorption zu. (Dietrich 1975)



**Abbildung 1.1:** Spektrale Bestrahlungsstärke des in die Tiefe eindringenden Tageslichts im Meer bei vier verschiedenen Wassertypen (I+III = ozeanische Wassertypen; 1+5 = Küstentypen; nach Jerlov 1964)

Wird Licht an kleinen Partikeln ( $< 1 \mu\text{m}$ ) gestreut, wirkt sich dies selektiv auf das Blau- und UV-Spektrum aus, da das Ausmaß der Streuung in diesem Fall zum kurzwelligeren Bereich hin zunimmt. Weiterhin kann es in küstennahen Gewässern durch „Gelbstoffe“ (im Wasser gelöste, organische, huminartige Substanzen, die von Flüssen in das Meer eingetragen werden) zu einer starken selektiven Absorption des Blau- und UV-Bereiches kommen.

Alle Algengruppen besitzen Chlorophyll a, welches sie damit gleichermaßen dazu befähigt, bei klarem Wasser das blaue Tiefenlicht zu absorbieren. Das Aktionsspektrum von Chlorophyll a zeigt jedoch eine sogenannte „Grünlucke“, d.h. grünes Licht wird von diesem Pigment nicht effizient absorbiert. Die charakteristischen Farbunterschiede der verschiedenen Algengruppen beruhen auf weiteren akzessorischen Pigmenten, die auch Grünlicht

absorbieren. Braunalgen besitzen zu diesem Zweck das Carotinoid Fucoxanthin, Rotalgen nutzen hingegen die rötlichen oder bläulichen Phycobiliproteide. Bei Rotalgen induziert Grünlicht die höchsten Photosyntheseraten, weil es hier von Phycobilinen der Antennen von Photosystem II absorbiert und effizient zu den photosynthetischen Reaktionszentren geleitet wird. (Lüning 1985; Hanelt et al. 2003)

### **1.3 UV-Strahlung und Makroalgen**

Seit etlichen Jahren kann durch moderne Methoden der Atmosphärenforschung eine je nach Jahreszeit und geographischer Lage stark schwankende Ausdünnung der stratosphärischen Ozonschicht beobachtet werden. Obwohl immer noch Unsicherheiten über die genauen Hintergründe und Ursachen des zunehmenden Ozonabbaus bestehen, mehren sich die Beweise dafür, dass der anthropogene Ausstoß von Fluorchlorkohlenwasserstoffen eine der Hauptursachen für dieses Phänomen ist. Daneben ist hier aber auch die biogene Entstehung von Organohalogenverbindungen in Algen (z.B. Braunalgen) zu nennen. Diese langlebigen Substanzen tragen in der Stratosphäre zu einem katalytischen Abbau des Ozons bei, der durch die natürliche photochemische Bildung des Ozons aus molekularem Sauerstoff nicht mehr kompensiert werden kann (Kerr und McElroy 1993; Madronich et al. 1995; Giese et al. 1999) Aufgrund des hohen molaren Absorptionskoeffizienten von Ozon im Bereich der kurzwelligeren UV-B-Strahlung (UVBR; 280 – 320 nm) stellt die stratosphärische Ozonschicht jedoch einen wirksamen Filter für diese hochenergetische und damit für viele Organismen schädliche Strahlung dar. Somit kommt es also durch eine Ausdünnung der Ozonschicht zu einem erhöhten Anteil der UV-B-Strahlung an der Erdoberfläche und infolgedessen zu einer Verschiebung des Spektrums zu kürzeren Wellenlängen. Im Gegensatz zur UV-B-Strahlung sind die photosynthetisch aktive Strahlung (PAR; 400 – 700 nm) und die UV-A-Strahlung (UVAR; 320 – 400 nm) von Veränderungen des Ozongehaltes in der Stratosphäre weniger stark betroffen. (Mackerness und Jordan 1999)

Vor allem in den Polargebieten kann es durch ein Zusammentreffen verschiedener Faktoren zu einer starken Ausdünnung der Ozonschicht kommen. So wird vor allem über der Antarktis immer wieder eine so starke Ausdünnung beobachtet, so dass man hier von einem Ozonloch spricht (Holm-Hansen et al. 1993). Hier wird jedes Jahr vor allem im Frühjahr mit einer über 50 %igen Reduktion des Ozongehaltes gerechnet (Karentz 1994). Aber auch über der Arktis und Nordeuropa kann es zeitweilig zu einem starken Verlust des stratosphärischen Ozons

kommen, was auch hier zu einer drastischen Zunahme des Anteils der UV-B-Strahlung am Sonnenspektrum führt. So wurde im Winter und Frühling 1994/1995 und 1995/1996 ein starker Verlust von stratosphärischem Ozon über Spitzbergen gemessen (Müller et al. 1997; Rex et al. 1997; Langer 1999).

Gerade in der Arktis sind Meersorganismen und im Besonderen die festgewachsenen Algen im Flachwasserbereich einer speziellen Situation hinsichtlich der Zunahme der UV-Strahlung ausgesetzt. So steht diesen Pflanzen während eines langen Zeitraums im Winter, der Polarnacht, überhaupt kein Licht zur Verfügung und auch im Frühjahr sind diese Algen häufig noch von einer teilweise meterdicken Eisdecke abgedunkelt und somit an Schwachlichtbedingungen angepasst. Kommt es nun zu einem Aufbrechen der Eisdecke, was mitunter innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums von nur wenigen Stunden passieren kann, werden diese Pflanzen dem vollen Sonnenlicht ausgesetzt. Hinzu kommt, dass gerade in dieser Zeit, im späten Frühjahr oder Frühsommer, der Wasserkörper aufgrund der noch nicht einsetzenden Gletscherschmelze noch sehr klar ist und die Sonnenstrahlung somit besonders tief eindringen kann. (Brey, Bischof & Wiencke, Publikation in Vorbereitung) Gerade im Frühjahr ist aber über der Arktis häufig ein Maximum des Ozonabbaus zu beobachten und so können die sessilen Algen des Flachwasserbereichs durch ein Zusammentreffen verschiedener Faktoren zu dieser Zeit einer deutlich erhöhten UV-B-Belastung ausgesetzt sein.

Weiterhin ist bekannt, dass viele Makroalgen im Frühjahr besonders hohe Wachstumsraten zeigen und auch die Reproduktion teilweise zu diesem Zeitpunkt stattfindet (Dunton und Schell 1986). Somit können auch die besonders empfindlichen, teilweise einzelligen Fortpflanzungsstadien der Makroalgen von einer zunehmenden Strahlungsbelastung betroffen sein.

Besonders gründlich wurden und werden die Zunahme der UV-Strahlung und die damit einhergehenden Auswirkungen auf marine Ökosysteme der Arktis im Kongsfjord im nordwestlichen Teil der arktischen Inselgruppe Spitzbergen untersucht. Seit vielen Jahren wird hier in der ehemaligen Kohlebergbau-Siedlung Ny-Ålesund (78°55'N, 11°56'E) von verschiedenen Nationen intensiv Atmosphärenforschung betrieben, die in ein globales Netzwerk für die Untersuchung von Veränderungen der Stratosphäre mit eingebunden ist (NDSC, Network for the Detection of Stratospheric Changes).

Daneben werden hier auch Messungen der in den Wasserkörper eindringenden Sonnenstrahlung durchgeführt und mit den Strahlungsdaten der Atmosphäre korreliert, wodurch bereits ein detailliertes Bild des Unterwasser-Lichtklimas vorhanden ist und eine

breite Datenbasis für weitergehende biologische Untersuchungen darstellt. (Hanelt et al. 2001)

Das Unterwasser-Strahlungsklima im Kongsfjord ist hochvariabel, was zum einen mit der geographischen Lage und zum anderen mit speziellen Faktoren wie Eisbedeckung und Trübstoffeintrag zusammenhängt. Die Polarnacht dauert auf dieser geographischen Breite vom 25. Oktober bis zum 17. Februar, der Polartag vom 18. April bis zum 23. August.

Maximale Strahlungswerte in der Atmosphäre werden hier im Juni und Juli gemessen, wobei hier an sonnigen Tagen Maximalwerte von  $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR (bzw.  $170 \text{ W m}^{-2}$ ) und  $16,8 \text{ W m}^{-2}$  UV-Strahlung (300 – 370 nm) gemessen wurden. Kontinuierliche Messungen der UV-B-Strahlung während der Sommersaison 1998 bis 2000 ergaben eine maximale tägliche Dosis von  $52,6 \text{ kJ m}^{-2}$ , was einer durchschnittlichen täglichen Bestrahlung von  $0,61 \text{ W m}^{-2}$  entspricht. Als Maximalwert wurden hier  $19 \text{ W m}^{-2}$  im UVA-Bereich (320 – 400 nm) und  $1,2 \text{ W m}^{-2}$  UVB-Bereich ermittelt (Bischof et al. 1998; Bischof et al. 1999; Hanelt et al. 2001).

Die Abschwächung der in den Wasserkörper eingedrungenen UV-Strahlung ist ebenfalls von verschiedenen Faktoren abhängig und wird als vertikaler Attenuationskoeffizient  $K_d$  angegeben. Minimale  $K_d$ -Werte von etwa  $0,15 \text{ m}^{-1}$  werden im Kongsfjord in klarem Wasser im Frühjahr erreicht (Hanelt et al. 2001), wobei UV-B-Strahlung bis zu einer 1%-Tiefe von 13 Metern eindringen kann. Mit zunehmenden Temperaturen kommt es durch das Abschmelzen der Schneedecke und von Gletschereis zu einem starken Eintrag von Süßwasser und Trübstoffen, wobei sich zunächst eine etwa 1 Meter dicke Süßwasserschicht über dem darunter liegenden Salzwasser ausbildet. Hierbei erreichen die  $K_d$ -Werte Maxima von etwa  $0,8 \text{ m}^{-1}$ , was die Intensität des in den Wasserkörper eindringen Lichtes stark verringert.

Im Frühjahr können noch große Bereiche des Fjordes von einer teilweise 1 bis 1,5 Meter mächtigen Meereis-Schicht bedeckt sein. Eine Eisdecke von 1 Meter Dicke und einer Auflage von 30 Zentimetern Schnee verringert die einfallende Sonnenstrahlung auf etwa 2,4 %, hier werden maximale PAR-Fluenzraten von etwa  $6,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  an einem sonnigen Tag um die Mittagszeit gemessen. Die maximal erreichten Werte für die UV-A-Strahlung lagen bei etwa  $0,42 \text{ W m}^{-2}$ , wohingegen die UV-B-Werte so gering waren, dass sie unter Eis nicht mehr messbar waren (Hanelt et al. 2001).

## 1.4 Auswirkungen der UV-Strahlung

### 1.4.1 Allgemeiner Überblick

Die UV-Strahlung und hier insbesondere der kurzwelligere UV-B-Anteil des Spektrums stellt eine sehr hochenergetische Strahlungsart dar, die durch Interaktion mit verschiedenen Biomolekülen zur Schädigung von lebenden Organismen führen kann. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die UV-Strahlung ein bedeutender Faktor sein kann, der das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen beeinflusst. (Teramura et al. 1994; Deckmyn und Impens 1997) Bisher wurden mehr als 300 Spezies auf ihre UV-Sensitivität hin untersucht, wobei etwa zwei Drittel empfindlich auf UV-Strahlung reagieren. Die Untersuchungen zeigen deutlich, dass die Art der Reaktion von der untersuchten Spezies, der Qualität der UV-Behandlung, der Interaktion mit anderen Umweltfaktoren und dem Entwicklungszustand des untersuchten Organismus abhängig ist. (Caldwell et al. 1989)

Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Standort, an dem die jeweilige Pflanze gewachsen ist. Allgemein gesehen sind Vertreter aus höheren Lagen oder äquatorialen Breiten weniger empfindlich gegen UV-Strahlung. Das bedeutet, dass viele Pflanzen das Potential haben, auch bei einer erhöhten UV-Belastung wachsen zu können. Somit ist also nicht nur die absolute Zunahme des UV-Anteils am Sonnenspektrum wichtig, sondern auch der relative Zuwachs. (Barnes et al. 1987; Caldwell et al. 1989; Jansen et al. 1998)

In Tabelle 1.1 sind einige Effekte einer erhöhten UV-Strahlung auf Pflanzen zusammengefasst.

**Tabelle 1.1:** Zusammenfassung wichtiger Effekte der UV-Strahlung auf verschiedenen Ebenen (Jordan 1996; Bischof et al. 2006)

<b>Prozess / Ziel</b>	<b>Effekt</b>
<b>Ökosystem, Pflanzengemeinschaften</b>	Vertikale Zonierungen, Reduktion der Produktivität
<b>Wachstum</b>	Reduktion des Wachstums und der Biomasse-Zunahme
<b>DNA</b>	Schädigungen der DNA durch Bildung von Cyclobutan-pyrimidin-Dimeren (CPDs)
<b>Photosynthese</b>	Schädigung von Komponenten der Photosysteme, Reduktion der Aktivität wichtiger Enzyme (s.u.), Photoinhibition der Photosynthese
<b>Membranen</b>	Peroxidation von Lipiden
<b>Sekundärmetabolismus</b>	Aktivierung best. Stoffwechselwege zur Biosynthese von UV-Schutzsubstanzen und weiterer Abwehrmechanismen
<b>Antioxidatives System</b>	Aktivierung von Systemen zur Beseitigung und Vermeidung oxidativer Schäden

#### 1.4.2 Ökologische Betrachtungen

Während mittlerweile gute Einblick in die Prozesse bestehen, welche die Ozonkonzentrationen in der Stratosphäre beeinflussen, sind die Effekte eines veränderten Sonnenspektrums auf terrestrische und insbesondere aquatische Ökosysteme weit weniger klar. Eine Verringerung der Produktivität, der Reproduktion und der Entwicklung sowie eine Erhöhung der Mutationsrate konnten für verschiedenste Organismengruppen gezeigt werden. Eine Abnahme der Biomasseproduktion durch eine erhöhte UV-Strahlung betrifft die gesamte Nahrungskette und kann zu Veränderungen der Artenzusammensetzung und der Ökosystem-Integrität führen. Eine der Folgen könnte eine reduzierte Nahrungsproduktion für den Menschen sein, so erwarten Acevedo und Nolan (1993) bei einem 16%igen Verlust an Ozon einen Verlust von 7 Millionen Tonnen Fisch. Weiterhin könnte es zu einer Verschärfung des Treibhaus-Effektes kommen, wenn sich die Aufnahmekapazität der Phytoplankton-

getriebenen ozeanischen CO<sub>2</sub>-Pumpe verringert (United Nations Environmental Program, 1994; Worrest und Häder 1997).

Dennoch ist es sehr schwierig, quantitative Aussagen über UV-Effekte in natürlichen aquatischen Ökosystemen zu treffen. Viele Organismen reagieren sehr unterschiedlich auf eine Veränderung des Sonnenspektrums und die Interaktion mit weiteren Stress-Faktoren erhöht die Komplexität auf der Ökosystem-Ebene weiter. Dennoch ist klar, dass es mit der Zeit zu einer Veränderung von Populations-Strukturen und der Interaktion verschiedener Spezies kommen wird, was die Gemeinschaftsstruktur sowie trophische Interaktionen und somit letztlich auch biogeochemische Prozesse beeinflussen wird (Bischof et al. 2006).

Marine Makroalgen stellen aufgrund ihrer hohen Produktivität, des großen Artenspektrums sowie ihrer Funktion als Aufzuchtplatz für Fische, Puffer gegen größere Schwankungen der Nährstoffkonzentrationen in der Wassersäule und Verfestiger von Sedimenten eine bedeutende Komponente in Küstenökosystemen dar (Franklin und Forster 1997).

Durch eine erhöhte UV-Einstrahlung könnte es nun zu einer Veränderung solcher Küstenökosysteme kommen. So haben ökophysiologische Studien eine generelle Korrelation zwischen Stresstoleranz und vertikaler Verbreitung von Makroalgen gezeigt (Bischof et al. 1998). Eine spezifische UV-Sensitivität bestimmter Arten und Entwicklungsstadien kann ein wichtiger Faktor sein, welcher die obere Verbreitungsgrenze dieser Arten bestimmt. In diesem Zusammenhang scheint vor allem die UV-Empfindlichkeit der Photosynthese eine wichtige Rolle zu spielen. (Bischof et al. 1998; Larkum und Wood 1993; Maegawa et al. 1993; Coelho 2001; Bischof et al. 2006)

### **1.4.3 Wachstum**

Das Wachstum einer Pflanze gilt als wichtiger Parameter, der Stress-Effekte auf verschiedenen physiologischen Ebenen in der Pflanze integriert. Während die Erfassung einzelner biochemischer oder physiologischer Prozesse nur einen Ausschnitt der Wirkung von Stress auf eine Pflanze erfassen kann, zeigt die Veränderung des Wachstums den Effekt eines Stressors auf den Gesamtorganismus und ist somit ein wichtiges Hilfsmittel, um zum Beispiel mögliche Änderungen der Produktivität oder Langzeit-Effekte auf einzelne Spezies oder ganze Algen-Gemeinschaften abschätzen zu können.

Verschiedene Studien zeigen, dass eine Erhöhung der UV-Strahlung deutliche Effekte auf das Wachstum bzw. die Zunahme an Biomasse bei Makroalgen haben kann (Han 1996). So

konnte in Laborversuchen eine deutliche Reduktion des Wachstums unterschiedlicher Entwicklungsstadien bei verschiedenen *Laminaria*-Arten gezeigt werden, wobei hier in erster Linie die wenigzelligen Gametophyten und junge Sporophyten betroffen waren (Dring et al. 1996; Roleda et al. 2005a, 2006a, 2006b, 2006c). Aber auch bei verschiedenen anderen kaltgemäßigten und polaren Arten ist bei einer länger andauernden UV-Exposition eine Reduktion des Wachstums zu verzeichnen. Bei den untersuchten polaren Arten konnte eine klare Korrelation der natürlichen vertikalen Zonierung und der jeweiligen Sensitivität gegenüber der UV-Strahlung festgestellt werden. Weiterhin wurde deutlich, dass die Veränderung der Wachstumsrate nicht in jedem Fall mit einer Veränderung in der Photosyntheseaktivität konsistent ist. Das bedeutet, dass physiologische Prozesse, die zu einer Reduktion der Wachstumsrate führen, unabhängig von der Photosynthese wirken können (Michler et al. 2002; Roleda et al. 2006b)

Aguilera et al. (1999) konnten in Freiland-Versuchen in der Arktis zeigen, dass bei einer Transplantation von Algen aus tieferem in flacheres Wasser ein deutlicher inhibierender Effekt der UV-Strahlung auf das Wachstum der meisten Makroalgen-Arten festzustellen ist. Weitere Unterwasser-Experimente zeigten eine lineare Beziehung zwischen der Tiefenverteilung der jeweiligen Alge und der entsprechenden Wachstumsrate.

Hochauflösende Wachstumsmessungen an jungen Sporophyten von *Laminaria* zeigten, dass die Wachstumsraten bei allen untersuchten Arten durch die UV-Strahlung signifikant reduziert wurden. Sporophyten, die ohne UV-Bestrahlung gehalten wurden, zeigten bei Beginn der Belichtung zunächst eine Zunahme der Wachstumsrate, die einen Gipfel in der Mitte der Belichtungsphase erreichte, zum Ende hin wieder abnahm und in der Dunkelphase ein Minimum erreichte. Bei UV-Bestrahlung waren speziesabhängig andere Wachstumsmuster zu beobachten, so etwa eine Wachstumskompensation in der Nacht bei *L. digitata*, eine verzögerte Erholung des Wachstums bei *L. saccharina* und ein minimales aber kontinuierliches Wachstum bei *L. solidungula*. Wachstum als ein integrativer Parameter für alle physiologischen Prozesse zeigt, dass der Effekt der UV-Strahlung bei diesen Arten von der Tiefenverbreitung der jeweiligen Art abhängig ist (Roleda et al. 2005a).

#### **1.4.4 Photosynthese**

Die Photosynthese ist für alle photoautotrophen Pflanzen der wichtigste Prozess zur Energiegewinnung und stellt aufgrund seiner Lichtabhängigkeit ein besonders wichtiges Ziel



für UV-Strahlung dar. Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass die Photosynthese durch realistisch erhöhte UV-Dosen in verschiedenen Pflanzen inhibiert wird. Die intensive Untersuchung der verschiedenen Komponenten und Einzelreaktionen des komplexen Photosynthese-Apparates hat die verschiedenen Angriffsziele der UV-Strahlung deutlich gemacht. In Tabelle 1.2 sind die wichtigsten dieser Ziele zusammengefasst.

**Tabelle 1.2:** Zusammenfassung wichtiger Ziele der UV-Strahlung im Photosyntheseapparat von Pflanzen (Franklin und Foster 1997; Jansen et al. 1998; Bischof et al. 2006)

Inaktivierung von Photosystem II (PSII)
Degradierung der D1 und D2-Proteine von PSII
Abnahme der Integrität der Thylakoid-Membranen
Abnahme der Aktivität von Rubisco und anderen Enzymen
Verringerte Konzentrationen von Chlorophyllen und Carotenoiden
Abwärts-Regulation photosynthetischer Gene
Veränderungen der Ultrastruktur des Chloroplasten

Als besonders empfindlich gegenüber erhöhter UV-Strahlung hat sich das Photosystem II des Photosynthese-Apparates herausgestellt. Dieser multifunktionelle Komplex aus Proteinen und Pigmenten besteht aus Wasser-spaltenden Komponenten, Lichtsammelkomplexen und dem Reaktionszentrum, dessen Kern aus aus D1- und D2-Proteinen aufgebaut ist. Diese fungieren als Apoproteine für die Intermediate des Elektronentransportes Plastoquinon  $Q_A$  und  $Q_B$ . Das D1-Protein ist eines der Hauptziele der UV-Strahlung, wobei bei der Degradierung dieses Proteins das Plastoquinon eine bedeutende Rolle spielt. Im Gegensatz zum Photosystem II wird das Photosystem I durch UV-Strahlung relativ wenig inhibiert. (Jordan 1996)

Ein weiteres Ziel einer erhöhten UV-Bestrahlung ist der qualitative und quantitative Chlorophyll-Gehalt in der Thylakoid-Membran. In verschiedenen Pflanzen kann eine starke UV-induzierte Abnahme des Chlorophyll-Gehaltes beobachtet werden, wobei der Biosynthese-Apparat für Chlorophyll relativ stabil bleibt. Dies deutet darauf hin, dass hier in erster Linie die Degradierung des Chlorophylls durch UV eine Rolle spielt. (Bischof et al. 1998b und 2000)

Das primäre Enzym der  $CO_2$ -Fixierung in Pflanzen, die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (RubisCO), ist ebenfalls ein wichtiges Angriffsziel der UV-Strahlung. Die Inaktivierung und Degradierung dieses Enzyms ist möglicherweise ein direktes Ergebnis der

Absorption der UV-Strahlung durch aromatische Aminosäuren, was zu Ringöffnungen oder Entstehung freier Radikale führen kann. Alternativ wird aber auch eine Schädigung durch freie Radikale diskutiert, die im Chloroplasten durch die Einwirkung der UV-Strahlung entstehen. (Jordan 1996; Aguilera et al. 2002)

Weitere UV-empfindliche Prozesse, die im Chloroplasten ablaufen, sind die Photophosphorylierung und der Stickstoff-Metabolismus. Im Falle der Photophosphorylierung kommt es zu einem Aktivitätsverlust und Degradierung der ATPase durch UV-Strahlung, was die Effizienz der ATP-Synthese im Chloroplasten beeinträchtigen kann. Dies wiederum kann zu einer Reduktion des Stickstoff-Metabolismus führen, da einige ATP-abhängige Enzyme dieses Stoffwechselweges, wie etwa die Glutamin-Synthetase oder die Glutamat-Synthase, im Chloroplasten lokalisiert sind. (Jordan 1996)

Schließlich kann auch die Lipid-Zusammensetzung der Chloroplasten-Membranen durch UV-Strahlung verändert werden. Dabei kann es durch oxidative Schäden zu einer Abnahme des Anteils an ungesättigten Fettsäuren kommen, was einen deutlichen Einfluss auf verschiedene Prozesse der Photosynthese haben kann. So kann etwa die Lipidumgebung der Photosynthese-Apparate oder die Permeabilität der Membranen verändert werden. Eine erhöhte Sättigung der Chloroplasten-Membranen kann zu einer Induktion von Desaturase-Genen führen. (Jordan 1996)

Durch Starklicht oder erhöhte UV-Strahlung kann es zu einer Inhibition der Photosynthese kommen. Dabei unterscheidet man 2 Arten der Photoinhibition. Bei der dynamischen Photoinhibition wird überschüssige Energie im Antennen-Komplex des Photosynthese-Apparates als Wärme abgegeben, wodurch es zu einer Reduktion der Photosynthese-Leistung kommt. Die dynamische Photoinhibition steht häufig unter Kontrolle des Xanthophyll-Zyklus und ist innerhalb kurzer Zeit vollständig reversibel. Bei der chronischen Photoinhibition kommt es zu einer Schädigung des D1-Proteins im Reaktionszentrum. Die Erholung dauert in diesem Falle länger und ist von der de novo Synthese von D1-Protein abhängig. Beide Arten der Photoinhibition können auch als Schutzmechanismen vor erhöhter Strahlungseinwirkung gesehen werden. Dabei findet man ähnliche Effekte von Starklicht (Hoch-PAR) und erhöhter UV-Strahlung, oftmals dauert aber die Erholung von einer UV-induzierten Photoinhibition länger als bei einer Starklicht-induzierten Photoinhibition. Darüber hinaus scheint die Photoinhibition oftmals durch Starklicht induziert zu werden, wohingegen die UV-Strahlung zu einer Verlangsamung des Erholungsprozesses führt (Hanelt et al. 1997, 2003b)

Labor- und Feldexperimente mit Makroalgen zeigen, dass die Empfindlichkeit der Photosynthese gegenüber erhöhter UV-Strahlung von der natürlichen vertikalen Verbreitung der jeweiligen Art abhängig ist. Während Flachwasser-Arten wie die Braunalge *Fucus distichus* oder die Rotalge *Palmaria palmata* relativ wenig sensitiv auf eine Erhöhung der UV-Strahlung reagieren, kommt es bei Tiefwasser-Arten wie der Rotalge *Phycodrys rubens* zu einer starken Inhibition der Photosynthese und zu einem teilweisen Ausbleichen des Thallus. (Hanelt 1998; Bischof et al. 1998; Karsten et al. 2001)

Viele Makroalgen scheinen sich gut an eine erhöhte UV-Bestrahlung akklimatisieren zu können. So konnte bei verschiedenen Braunalgen innerhalb weniger Tage eine Anpassung der Photosynthese an die veränderten Strahlungsbedingungen beobachtet werden. Dabei ist die Kinetik der Akklimatisierung Spezies-abhängig und korreliert mit der natürlichen Tiefenverteilung der jeweiligen Alge. Bei Flachwasserarten war eine schnellere Erholung festzustellen als bei Algen aus größeren Wassertiefen (Bischof et al. 1998, 1999).

Ein weiterer Faktor, der das Akklimatisierungspotential einer Alge beeinflusst, ist der Entwicklungszustand. Bei *Laminaria saccharina* wurde festgestellt, dass Gametophyten und ältere Sporophyten ihre Photosynthese-Aktivität schneller an eine erhöhte UV-Bestrahlung anpassen können als junge Sporophyten. Dabei scheint hier eine schnelle Inhibierung aber auch eine schnellere Erholung der Photosynthese eine Rolle stattzufinden (Roleda 2005a; Roleda et al. 2006a, 2006b).

Freiland-Experimente mit der Grünalge *Ulva lactuca* bei Helgoland haben ergeben, dass ein Ausschluß der UV-Strahlung zu einer Erhöhung der zellulären Rubisco- und Lutein-Konzentration führt. Daneben konnte hier eine relative Zunahme des Zeaxanthin-Gehaltes am Gesamt-Xanthophyll-Gehalt festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die momentan bestehende UV-Einstrahlung unter Feldbedingungen einen deutlichen Einfluß auf die Physiologie von Makroalgen hat (Bischof et al. 2002a).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Photosynthese von Makroalgen aus der Gezeitenzone ziemlich resistent gegenüber natürlich UV-Strahlung ist. Spezies aus dem Sublittoral können ihre Photosynthese sehr schnell an sich verändernde Strahlungsbedingungen anpassen, wohingegen Tiefwasserarten sehr empfindlich auf einen erhöhten UV-Anteil reagieren. (Bischof et al. 2002a)

### 1.4.5 Entwicklungsstadium

Viele Makroalgen durchlaufen während ihrer Entwicklung komplexe Lebenszyklen, die in der Regel einzellige Fortpflanzungs- und Verbreitungsstadien sowie haploide Zwischenstadien mit einschließen. Diverse Untersuchungen haben gezeigt, dass gerade diese frühen Entwicklungsstadien empfindlicher auf UV-Strahlung reagieren als adulte Stadien. (Coelho et al. 2001)

So kann eine gesteigerte UV-Bestrahlung eine Erhöhung der Mortalität, eine vermehrte Photoinhibition der Photosynthese und einen Anstieg von DNA-Schäden bei Sporen der *Laminariales* und *Gigartinales* zur Folge haben (Wiencke et al. 2000, 2004; Roleda et al. 2004, 2005b).

Zum Schutz gegen UV-Strahlung wurden in den Sporen von Braunalgen Phlorotannin-haltige Physoden gefunden. Darüberhinaus wurde auch beobachtet, dass Braunalgen Phlorotannin-Exudate entlassen, die als UV-Refugien für Zoosporen in der Wassersäule dienen können. (Wiencke et al. 2004; Swanson und Druehl 2002; Roleda et al. 2005b)

### 1.4.6 UV-Schutzsubstanzen

Ein wichtiger Schritt bei der Anpassung von Organismen an eine Zunahme der UV-Strahlung ist die Ausbildung einer physikalischen Barriere um empfindliche zelluläre Komponenten zu schützen. In vielen Pflanzengruppen dienen Produkte des Phenylpropanoid-Stoffwechselweges als UV-Schutzsubstanzen, wobei in diesem Zusammenhang bei höheren Pflanzen in erster Linie Flavonoide und Sinapinester zu nennen sind. Diese beiden Substanzgruppen fehlen in Algen fast völlig, hier dienen andere Substanzen als UV-Filter. Dabei bilden die unterschiedlichen Algengruppen sehr verschiedene UV-Schirmpigmente.

Weit verbreitet in marinen Organismen, darunter in Bakterien, Cyanobakterien, Pilzen und etlichen eukaryotischen Algen, sind Mycosporin-ähnliche Aminosäuren (MAAs). Diese wasserlöslichen Substanzen sind charakterisiert durch Cyclohexenon- oder Cycloheximin-Chromophore, die mit N-Substituenten von Aminosäuren oder Imino-Alkoholen konjugiert sind. Das Absorptionsmaximum dieser MAAs liegt im Bereich von 310 – 360 nm, die Biosynthese erfolgt über den Shikimat-Weg. Bei den Makroalgen findet man diese Substanzen in erster Linie bei Rotalgen aus dem Eulittoral, wohingegen sie bei Braun- und Grünalgen und Tiefenrotalgen zumeist völlig fehlen.

Braunalgen bilden eine spezielle Klasse von phenolischen Substanzen, die Phlorotannine. Diese sind Polymere des Phloroglucinols und kommen in einem großen Spektrum von Molekulargewichten vor, wobei höhere Molekulargewichte häufiger sind (Ragan und Glombitza 1986). Die Biosynthese dieser Substanzen verläuft, zumindest in den ersten Schritten, aller Wahrscheinlichkeit nach über den Acetat-Malonat-Weg. In der Zelle findet man die Phlorotannine dicht gepackt in eigenen, membrangebundenen Kompartimenten, den Physoden. Neben dem UV-Schutz scheinen diese Kompartimente eine wichtige Rolle bei der Zellwandbildung, der Schwermetallresistenz und auch als Fraßschutz gegenüber Herbivoren zu spielen. Phlorotannine können bei Braunalgen bis zu 10 % des Trockengewichtes ausmachen. (Ragan und Glombitza 1986; Schoewaelder und Clayton 1999, 2000)

Auch Makroalgen aus der Gruppe der Grünalgen können phenolische Substanzen enthalten, die auch hier eventuell als UV-Schutz angesehen werden können. So konnten in den Thalli der mediterranen Grünalge *Dasycladus vermicularis* hohe Konzentrationen von 3,6,7-Trihydroxycoumarin nachgewiesen werden. Diese wurden v.a. in solchen Teilen des Thallus gefunden, die am stärksten UV-exponiert sind, was auf eine mögliche photoprotektive Rolle dieser Substanzen hindeutet. (Perez-Rodriguez et al. 2001, 2003)

#### 1.4.7 ROS und oxidativer Stress

Ein gemeinsames Merkmal der Reaktion vieler Pflanzen auf verschiedene negative Umwelteinflüsse ist oxidativer Stress. Darunter versteht man ein Ungleichgewicht zwischen der Erzeugung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Zu den ROS zählen der Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), das Superoxid-Radikal ( $^{\bullet}\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und andere Peroxide ( $\text{ROOH}$ ) sowie das extrem reaktive Hydroxyl-Radikal ( $^{\bullet}\text{OH}$ ). Diese sehr reaktionsfreudigen Sauerstoff-Derivate entstehen als Nebenprodukte auch im normalen Zellstoffwechsel, werden aber bei Einwirken schädlicher Umwelteinflüsse in verstärktem Maß gebildet oder mit verringerter Effizienz beseitigt (Salin et al. 1991; Asada und Takahashi 1987; Alscher et al. 1997).

Auch eine erhöhte UV-Bestrahlung kann zur verstärkten Bildung von ROS führen. Wird die Photosynthese, z.B. durch eine Schädigung des D1-Proteins oder von Enzymen des Calvin-Zyklus, inhibiert, kann weniger des in der Lichtreaktion entstehenden NADPH oxidiert werden, womit folglich weniger  $\text{NADP}^+$  für die Elektronenübertragung vom Ferredoxin zur Verfügung steht. In der sog. Mehler-Reaktion (pseudozyklischer Elektronentransport) können

dann Elektronen vom reduzierten Ferredoxin (Fd) direkt auf Sauerstoff übertragen werden, wobei das sehr reaktive Superoxid-Radikal entstehen kann. (Aguilera et al. 2002)

Zudem können auch durch pigmentvermittelten Energietransfer ROS entstehen. Dies tritt vor allem auf, wenn eine adäquate Nutzung der durch die photosynthetisch aktiven Pigmente absorbierten Energie reduziert ist. Das unkontrollierte Auftreten von ROS hat die Peroxidation von Lipiden und daraus resultierende Membranschäden, die Denaturierung von Proteinen sowie Strangbrüche von DNA und Polysacchariden zur Folge und muß deshalb möglichst verhindert werden. (Fridovich 1986; Asada und Takahashi 1987)

Dazu haben Pflanzen als Anpassung an aerobe Lebensbedingungen verschiedene Schutzsysteme entwickelt. Ein wichtiger Mechanismus besteht im ungefährlichen Abführen der in Form von Triplett-Zuständen der Pigmente angestauten Energie. Xanthophylle als Vertreter der Carotinoide sind aufgrund ihrer Molekülstruktur zu strahlungsloser Energiedissipation in Form von Wärme fähig. Dieser Prozess wird als „Quenching“ der angeregten Zustände bezeichnet. (Schäfer et al. 1994; Bischof et al. 2002)

Neben verschiedenen antioxidativen Schutzenzymen wie den Superoxid-Dismutasen (SOD), Catalasen und Glutathion-Peroxidase, spielt in pflanzlichen Geweben vor allem der sog. Ascorbat-Glutathion-Zyklus eine wichtige Rolle. (Mittler 2002)

Marine Makroalgen können in der oberen Gezeitenzonen manigfaltigen Stress-Szenarien, wie etwa hohen Strahlungsintensitäten, Austrocknung, extremer mechanischer Belastung und niedrigen Temperaturen bzw. Frost ausgesetzt sein. (Davison und Pearson 1996; Collen und Davison 1999)

Verschiedene Arbeiten belegen, dass auch bei Makroalgen der ROS-Metabolismus eine wichtige Rolle bei der Stress-Toleranz spielt. Die vertikale Zonierung korreliert dabei deutlich mit der biochemischen Anpassung der Alge an oxidativen Stress. Spezies aus dem Eulittoral und dem oberen Sublittoral, wie etwa die Grünalgen *Acrosiphonia flagellata* oder *Monostroma arcticum*, weisen in der Regel deutliche höhere Aktivitäten von antioxidativen Enzymen auf als Vertreter aus dem unteren Sublittoral (Aguilera et al. 2002).

Ein ähnlicher Befund liegt für verschiedene Arten der Braunalge *Fucus* vor. Dabei zeigte die am weitesten oben wachsende Art, *Fucus spiralis*, die am wenigsten ausgeprägte stress-induzierte Produktion von ROS und auch die geringsten oxidativen Schäden (Collen und Davison 1999).

Dass gerade auch UV-Strahlung die Bildung von ROS in Makroalgen induziert, zeigen Versuche an Grünalgen. So konnte in *Monostroma arcticum* durch künstliche UV-Strahlung eine Stimulierung der Glutathion-Reduktase-Aktivität beobachtet werden. Diese wurde noch

ausgeprägter, wenn die Alge anschließend in Dunkelheit gehalten wurde. Bei *Acrosiphonia penicilliformis* war bei einem Ausschluß von UV-Strahlung eine signifikante Reduktion der Aktivitäten von GR und SOD zu verzeichnen, was auf eine Reduktion des oxidativen Stress unter dieser Bedingung hindeutet. (Aguilera et al. 2002)

#### 1.4.8 DNA-Schäden und Reparatur

Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften sind Nukleinsäuren und insbesondere DNA dazu befähigt, UV-Strahlung zu absorbieren, was zu Schädigungen führen kann. In erster Linie kommt es dabei zur Bildung dimerer Photoprodukte, wobei hier Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD) und Pyrimidin (6-4) Pyrimidon Photoprodukte zu nennen sind. Diese können die Funktion von DNA- und RNA-Polymerasen inhibieren und führen so letztendlich zu einer Behinderung der Transkription. Weiterhin können auch in weniger häufigen Fällen monomere Photoprodukte, DNA-Strangbrüche und Quervernetzungen der DNA mit Proteinen entstehen, die ebenfalls negative Auswirkungen haben können. (Jordan 1996)

Um die Funktion der Zelle aufrecht zu erhalten, müssen DNA-Schäden repariert werden, wofür verschiedene Mechanismen benutzt werden. Bei der sogenannten Photoreaktivierung werden Pyrimidin-Dimere durch das Enzym Photolyase in einem lichtabhängigen Prozess in die beiden Monomere gespalten. (Michal 1999)

Bei der Excisions-Reparatur werden Einzelstrangbrüche oder Quervernetzungen aus der DNA geschnitten und die entstandene Lücke durch die Aktivität der DNA-Polymerase I wieder aufgefüllt. Eine Ligase katalysiert schließlich die kovalente Verknüpfung des neuen Stranges mit dem DNA-Strang. Sind beide Stränge beschädigt, können bei der Rekombinations-Reparatur die entsprechenden Abschnitte der DNA-Schwesterstränge durch Rekombination ausgetauscht werden. Dabei entsteht dann ein vollständiger und ein beschädigter Strang, der dann durch Excisions-Reparatur wieder hergestellt werden kann. (Michal 1999)

Bei adulten Thalli der marinen Braunalge *Laminaria saccharina* konnte bereits nach 45 Minuten UV-Bestrahlung eine starke Akkumulation von CPDs beobachtet werden, die aber nach einer 5-stündigen Inkubation der Algen in Schwachlicht effektiv beseitigt werden konnten (van de Poll 2002).

Bei jungen Thalli verschiedener *Laminaria*-Arten konnten Roleda et al. (2006a, 2006b, 2006c) ebenfalls einen Anstieg der Bildung von CPDs in Abhängigkeit von UV-Strahlung nachweisen. Dabei war bei am weitesten ins Flachwasser verbreiteten *L. digitata* die höchste

Akkumulation von CPDs zu beobachten, wobei hier aber auch eine effiziente Reparatur festzustellen war. Die beiden in tieferen Bereichen vorkommenden Spezies *L. saccharina* und *L. solidungula* wiesen hingegen deutlich geringere DNA-Schäden auf. Dies zeigt, dass die UV-Sensitivität der Sporophyten von *Laminaria* gegen DNA-Schäden nicht mit der vertikalen Zonierung korreliert. Hier spielen vielmehr die Dicke und optischen Eigenschaften des Thallus eine Rolle. Die Tiefwasserart *L. solidungula* erwies sich als am unempfindlichsten gegenüber DNA-Schäden, was auf eine effektive Reparatur und eine hohe Konzentration an UV-absorbierenden Substanzen in dieser Alge zurückzuführen ist. Allerdings ist bei dieser Art durch UV-Bestrahlung auch die stärkste Reduktion des Wachstums zu verzeichnen. Dies zeigt, dass der effektive UV-Schutz dieser Alge auf Kosten des Wachstums geht. (Roleda et al. 2005a, 2005b)

#### 1.4.9 Genexpression

Neben den Auswirkungen der UV-Strahlung auf physiologische und biochemische Prozesse wurden insbesondere bei höheren Pflanzen auch UV-Effekte auf die Genexpression untersucht. Am besten wurden dabei bisher solche Gene charakterisiert, die für Schlüsselproteine der Photosynthese und von Abwehrprozessen codieren. (Mackerness und Jordan 1999)

Die UV-induzierte Reduktion von Transkripten wichtiger Photosynthesegene kann, neben anderen Prozessen, zu einem nicht unerheblichen Teil zur Inhibition der Photosynthese beitragen (Mackerness und Jordan 1999). Das Ausmaß der Verringerung von Transkriptmengen ist bei der jeweiligen Art von verschiedenen Faktoren wie dem Entwicklungszustand, der Art des Gewebes und der Intensität und Qualität der UV- und PAR-Bestrahlung abhängig.

Sowohl nukleär (z.B. Lhcb, RbcS,  $\gamma$ -CF<sub>1</sub>-ATPase) als auch plastidär (rbcL, psbA, Cytochrom b) codierte Transkripte können durch UV-Strahlung reduziert werden. Das Ausmaß der Reduktion ist abhängig von der Intensität der UV-Bestrahlung, wobei die Menge Chloroplasten-codierter Transkripte in der Regel stabiler ist als diejenige von Kern-codierten Transkripten. Ein weiterer Unterschied besteht in der Art Regulation der jeweiligen Photosynthesegene. Während die Expression nukleärer Photosynthesegene v.a. auf der Ebene der Transkription reguliert wird, findet man bei plastidären Photosynthesegenen oftmals eine posttranslationelle Regulation. Die bisherigen Studien scheinen dies auch für die UV-



induzierte Inhibition von Photosyntheseegenen zu bestätigen. (Jordan 1996; Mackerness und Jordan 1999)

Zu den wichtigsten Abwehrmechanismen von Pflanzen gegen eine erhöhte UV-Bestrahlung gehören die Abschwächung der UV-Strahlung durch Pigmente, die Produktion antioxidativer Substanzen und die Reparatur von UV-induzierten Läsionen in Nukleinsäuren. Für all diese Prozesse ist die genaue Regulation verschiedener Gene notwendig, die für Biosynthese der jeweiligen Komponenten wichtig sind.

Die Bildung von UV-Schutzpigmenten ist bei höheren Pflanzen gut untersucht, hier spielen in erster Linie Substanzen aus der Gruppe der Flavonoide eine Rolle. Die UV-induzierte Bildung dieser Pigmente ist auf eine koordinierte Erhöhung der Expression und Aktivität von Enzymen des Phenylpropanoid-Weges zurückzuführen. Als Schlüsselenzyme sind hier die Chalkon-Synthase (CHS), die Phenylalanin Ammonium Layse (PAL) und die Chalkon-Isomerase (CHI) zu nennen, welche umfangreichen Regulationsmechanismen unterliegen. Bei *Arabidopsis thaliana* bewirkt eine erhöhte UV-Bestrahlung eine starke Induktion der Chs- und PAL-Expression, was in einer Erhöhung der Flavonoid-Gehalte resultiert. (Mackerness und Jordan 1999)

Eine übliche Reaktion von Pflanzen auf verschiedene Stress-Typen ist die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was zu intrazellulärem oxidativem Stress führen kann. Um diesem entgegen zu wirken, werden verschiedene antioxidative Abwehrsysteme induziert, die je nach untersuchter Art deutlich variieren können. Bei der Erbse findet man z.B. durch UV eine starke Erhöhung der Expression der cytosolischen Cu/Zn-SOD, der mitochondrialen Mn-SOD und von Transkripten des Ascorbat/Glutathion-Zyklus, wohingegen die Expression der plastidären Cu/Zn-SOD deutlich herunter gefahren wird. (Mackerness und Jordan 1999)

Neben der Intensität und dem Spektrum der UV-Strahlung beeinflussen auch verschiedene andere Faktoren die Genexpression. Hier ist z.B. der Entwicklungszustand des jeweiligen Gewebes zu nennen. Bei *Pisum* und *Arabidopsis* zeigen ältere Blätter deutlich stärkere UV-Effekte, was auch mit der Genexpression korreliert. In jungen Blättern war hier eine weniger stark ausgeprägte Reduktion der Transkripte von Photosyntheseegenen zu beobachten.

Weiterhin ist auch die Intensität des PAR-Anteils der Gesamtstrahlung von Bedeutung. Dabei können hohe Intensitäten von PAR die negativen Effekte der UV-Strahlung auf die Genexpression teilweise verbessern, wobei hier die Aktivität der Photosynthese wichtig zu sein scheint.

Bei der UV-abhängigen Signaltransduktion bestehen bei höheren Pflanzen deutliche Gemeinsamkeiten zu anderen Stress-Typen. So wurde etwa Salicylsäure (SA) als

Komponente verschiedener Signalwege identifiziert, die auch bei der UV-induzierten Regulation von PR-Genen wichtig ist. Ein weiterer UV-regulierter Signalweg, der von SA unabhängig ist aber an das Vorhandensein bestimmter ROS geknüpft ist, spielt bei der Regulation von Photosyntheseenen eine wichtige Rolle.

Zudem kann UV-Bestrahlung zur Akkumulation von Jasmonat und Ethylen führen, die normalerweise an der Regulation der Genexpression bei Verwundung und Seneszenz beteiligt sind. Daneben wurden noch etliche weitere regulatorische Komponenten identifiziert, die bei UV-induzierten Signalwegen wichtig sind. Hier sind v.a Calcium/Calmodulin, heterodimere G-Proteine, Phosphatidylinositol und Serin/Threonin-Kinasen zu nennen. (Jordan 1996; Mackerness und Jordan 1999)

Die Vielzahl an Komponenten und das Zusammenspiel verschiedener Wege verdeutlicht das komplizierte Netzwerk von Regulationsmechanismen der Genexpression, das auch bei höheren Pflanzen nur in Ansätzen verstanden ist. Inwieweit diese Signalwege auch bei Makroalgen eine Rolle spielen, ist bisher unbekannt.

Bei Algen wurden bisher nur wenige Untersuchungen zur Auswirkung von UV-Strahlung, Starklicht und anderen Stress-Faktoren auf die Genexpression durchgeführt. In erster Linie wurde hier die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* untersucht; hier konnte von Shapira et al. (1997) bei Starklichtstress in den ersten 6 Stunden eine starke Induktion des D1-Proteins von Photosystem II und eine dramatische Abnahme der großen Untereinheit von Rubisco innerhalb von 15 Minuten festgestellt werden. Im Falle des D1-Proteins war auch eine starke Zunahme des zugehörigen Transkriptes (psbA) festzustellen, wohingegen die Transkription des Gens für die große Untereinheit der Rubisco (rbcL) nicht mit der starken Reduktion des entsprechenden Genproduktes korrelierte.

Im und Grossman (2002) konnten in *Chlamydomonas* mehrere starklichtinduzierte Gene identifizieren, wobei hier v.a. ABC-Transporter, das low-CO<sub>2</sub>-inducible protein, Carboanhydrase, Nuklease und Serin Hydroxymethyltransferase zu nennen sind.

Schroda et al. (1999) konnten ebenfalls in *Chlamydomonas* eine protektive Funktion von HSP70 auf das Photosystem II bei Starklicht zeigen. Wurden Zellen von *Chlamydomonas* vor der Starklichtbehandlung zunächst in Schwachlicht gehalten, kam es hierbei zu einer Induktion der Expression von kerncodierten HSP70-Varianten, darunter auch der des im Chloroplasten lokalisierten HSP70B. Dadurch kam es im Vergleich zu Zellen, die direkt dem Starklicht ausgesetzt wurden, zu einem Schutz des Photosystems II und einer beschleunigten Reaktivierung nach Photoinhibition.

In einer größeren Untersuchung der Expression der Plastiden- und Mitochondriengenome von *Chlamydomonas* mit Hilfe von Gelblot- und Microarrayexperimenten, konnten Lilly et al. (2002) zeigen, dass es durch UV-Bestrahlung zu umfangreichen Veränderungen der Genexpression beider Genome kommt. Dabei fiel das Ausmaß der Veränderungen bei UV im Vergleich zu anderen Stressoren besonders stark aus.

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Im Rahmen einer Zusammenarbeit des Alfred-Wegener-Institutes für Polar- und Meeresforschung und des GSF-Forschungszentrums sollte untersucht werden, welche Veränderungen der Genexpression auf Transkriptionsebene bei marinen Makroalgen als Reaktion auf eine erhöhte UV-Belastung auftreten. Ziel der Arbeit war es, bei verschiedenen Grün- und Braunalgen solche Gene zu identifizieren, deren Expressionsstatus durch eine verstärkte UV-Bestrahlung verändert wird und somit einen besseren Einblick in die molekularen Strategien zur Anpassung an veränderte Strahlungsbedingungen bei marinen Makroalgen zu gewinnen. Neben dem Aspekt, eine Ausgangsbasis für weitergehende und detailliertere Untersuchungen auf Transkriptionsebene zu schaffen, stand hier auch die Etablierung molekularbiologischer Analysemethoden für marine Makroalgen im Vordergrund.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Agar	Difco
Agarose	Serva
Ameisensäure	Merck
Ammoniumformiat	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Fluka Chemica
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haen
DTT	Roche Diagnostics
EDTA	Sigma
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Hefeextrakt	Difco
Isoamylalkohol	Merck
Kaliumchlorid	Riedel-de Haen
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haen
Kalziumchlorid	Janssen Chimica
N-Lauroyl-Sarcosin	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Riedel-de Haen
Manganchlorid	Riedel-de Haen
Methanol	Merck
Monodesoxyribonukleosid-5'-triphosphate	Roche Diagnostics
Monoribonukleosid-5'-triphosphate	Roche Diagnostics
Natriumacetat	Merck
Natriumborhydrid	Sigma
Natriumchlorid	Janssen Chimica
Natriumcitrat	Riedel-de Haen
Natriumdodecylsulfat	Pharmacia Biotech
Natriumhydroxid	Fluka Chemica

Phenol	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma
Salzsäure	Merck
Tris	Sigma
Trypton	Difco
Tween-20	Serva

## 2.2 Puffer, Lösungen und Medien

### 2.2.1 Extraktion von Nukleinsäuren

RNA-Extraktionspuffer (nach Chang et al. 1993)	2,0 % (w/v) CTAB 2,0 % (w/v) PVP 100 mM Tris-HCl 2,0 M NaCl 0,5 g/l Spermidin 2 % $\beta$ -Mercaptoethanol	pH 8,0
RNA-Extraktionspuffer (nach Apt et al. 1995)	2,0 % (w/v) CTAB 100 mM Tris-HCl 20 mM EDTA 1,5 M NaCl 20 mM DTT	pH 8,0
Natriumacetat	3 M	pH 4,8
Ethanol	absolut (-20° C)	
Ethaonol	70 % (v/v -20° C)	

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer	45 mM Tris/HCl 45 mM Borsäure 1 mM EDTA	pH 8.0
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml in 20 mM Tris (pH 8,0)	
10x DNA-Ladepuffer	50 % (v/v) TE-Puffer 50 % (v/v) Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau	

**2.2.3 Bakterienkulturen**

Luria-Bertani (LB)-Medium	1,0 % (w/v) 0,5 % (w/v) 1,0 % (w/v) 1,5 % (w/v)	Bacto-Trypton Bacto-Hefeextrakt NaCl Agar	pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar		
LB-Glycerin-Medium	1,0 % (w/v) 0,5 % (w/v) 1 % (w/v) 36 mM 13,2 mM 0,4 mM 1,7 mM 6,8 mM 4,4 % (v/v)	Bacto-Trypton Bacto-Hefe-Extrakt NaCl K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> Natriumcitrat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Glycerin	
SOC-Medium	2,0 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,05 % (w/v) 2,5 mM 10 mM 10 mM 20 mM	Bacto-Trypton Bacto-Hefeextrakt NaCl KCl MgCl <sub>2</sub> MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O Glukose	pH 7,0
Ampicillin	50 µg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		

**2.2.4 Makroarray-Analysen**

10% SDS	10 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
20x SSC	0,3 M 3 M	Natriumcitrat/HCl NaCl	pH 7.0
50x Denhardt's Lösung (auf 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> )	1 g 5 g 5 g	Ficoll Polyvinylpyrrolidon Rinderserum Albumin	
Prähybridisierungslösung	5 x 5 x 0,5 % (v/v) 100 µg/ml	SSC Denhardt's Lösung SDS denaturierte Heringssperma-DNA	
Waschlösung 1	2 x 0,1 % (v/v)	SSC SDS	

Waschlösung 2	0,2 x 0,1 % (v/v)	SSC SDS
---------------	----------------------	------------

### 2.2.5 Mikroarray-Analysen

Betain-Spottingpuffer (1x)	3,0 x 1,5 M	SSC Betain	
PBS-Puffer (1x)	10 mM 130 mM	Natriumphosphat NaCl	pH 7,5
Prähybridisierungspuffer	5,0 x 0,1 % (w/v) 1,0 % (w/v)	SSC SDS Rinderserumalbumin	
Hybridisierungspuffer	50 % (v/v) 5,0 x 0,1 % (w/v)	Formamid SSC SDS	
Waschpuffer 1	1,0 x 0,1 % (w/v)	SSC SDS	
Waschpuffer 2	0,1 x 0,1 % (w/v)	SSC SDS	
Waschpuffer 3	0,1 x	SSC	

### 2.2.6 HPLC-Analysen

Lösung A	980 ml 20 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> Ammoniumformiat in Ameisensäure (5 %)
Lösung B	882 ml 96 ml 20 ml	Methanol H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> Ammoniumformiat in Ameisensäure (5 %)

## 2.3 Molekularbiologische Reagenzien und Verbrauchsmittel

$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]-dATP	Amersham Pharmacia
ABSOLUTE™ QPCR SYBR Green Mix	ABgene
Agarose Gel DNA-Extraktions-Kit	Qiagen
Aldehydbeschichtete Glasobjektträger	Genetix Deutschland
Antibiotika	Sigma-Aldrich, Fluka
Big Dye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems
cDNA-Synthese	
Superscript™ II	Invitrogen
Superscript™ III	Invitrogen
SMART™ Synthesis Kit	Clontech
DNA Taq-Polymerase	Promega, Agrobiogen
DNA-Längenstandard	MBI Fermentas
DNase I	Amersham Pharmacia
Heringsperma-DNA	Sigma
Fluoreszenz-Farbstoffe Cy3 und Cy5	Amersham Biosciences
Fuji BAS-III-S-Bildplatten	Fuji Photo Film
Hybond™-N <sup>+</sup> Membranen	Amersham Pharmacia
T4-DNA-Ligase	Promega
ThermoFast96 PCR-Platten für PCR und QPCR	ABgene
Micro-Spin™ S-400 HR Columns	Amersham Pharmacia
Multiscreen PCR96 Filter Plate	Millipore
96well Mikrotiterplatten	Nunc
Oligotex™ mRNA Kit	Qiagen
PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	Clontech
pGEM®-T Vector	Promega
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNase A	Promega
RNase H	MBI Fermentas
RNase Inhibitor	Invitrogen
RNase ZAP	Biohit

## 2.4 Bakterien und Plasmide

### Bakterien

*Escherichia coli* JM109, chemisch hochkompetent ( $>10^9$  cfu ml<sup>-1</sup>)

Genotyp:

*e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK- mK+) supE44 relA1 D(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15]*

*Escherichia coli* TransforMax™ EC100™ – T1<sup>R</sup> elektrokompent

Genotyp:

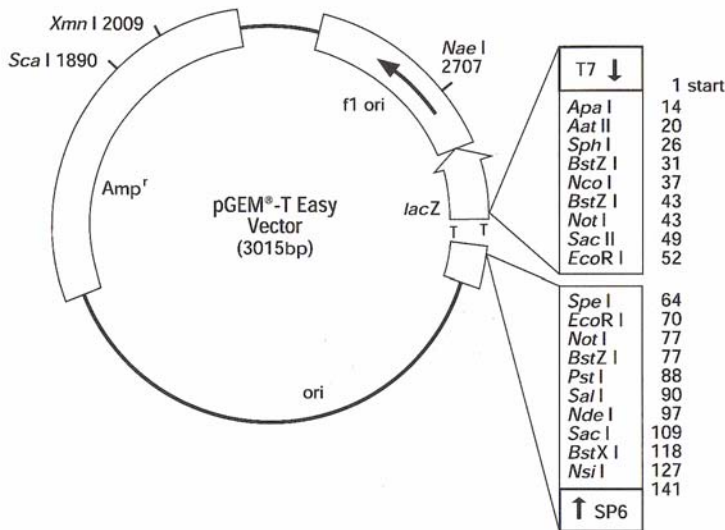
*mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ<sup>-</sup> rpsL nupG tonA*



**Plasmide**

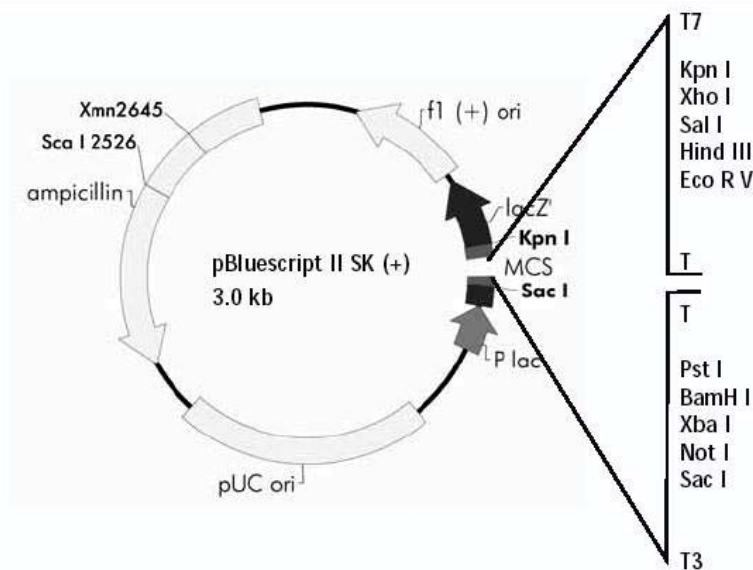
pGEM-T-Vektor (Promega)

Dieser Vektor weist in seiner linearisierten Form an den 3'-Enden einen T-Überhang auf, der die effiziente Ligation von PCR-Produkten erlaubt. Diese werden bei der Synthese durch thermostabile Polymerasen häufig am 3'-Ende mit einem Desoxadenosin versehen und können hierüber mit dem T-Überhang des Vektors hybridisieren.



pBluescript II SK+ (Stratagene)

Dieser Vektor wurde von der Firma *vertis Biotechnologie AG* (Freising) bei der Herstellung der gröbenselektionierten Genbibliothek für *Laminaria saccharina* verwendet. Dazu wurden die entsprechenden PCR-Produkte und der Vektor unter Verwendung von Restriktionsenzymen geschnitten und so für die anschließende Ligation vorbereitet.



## 2.5 Geräte und andere Hilfsmittel

### 2.5.1 Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius
Autoklav	H&P Labortechnik GmbH, Systec
Diodenarray-Detektor 168	Beckman
DNA-Spotter Microgrid II	Biorobotics
Elektrophorese-Apparatur	PeqLab
HPLC Gerät System Gold 7.11	Beckman
HPLC Säule Spherisorb ODS, Type NC, 5 µm mit Vorsäule	Bischoff
Hybridisierungssofen	UniEquip
Transilluminator Geldoc 2000	BioRad
Gene Pulser™	BioRad
IKA-Vibrax VXR	Janke & Kunkel
Inkubationsschrank	Memmert
Rotationsschüttler	New Brunswick Scientific
Mikrodismembrator S	Braun
Milli-Q Water System	Millipore
PCR-Geräte	
MJ Research PTC-200	MJ Research
PCR Express	Thermo Hybrid
pH-Meter	Knick
Phosphor Imaging System FLA-3000	Fuji Photo Film
Photometer Ultrospec 3100pro	Amersham Pharmacia
Photometer Nanodrop	Peqlab
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Real-Time-PCR-Gerät ABI 7500	Applied Biosystems
Sterilbank	Gelaire® Flow Laboratories
Szintillationszähler LS 1801	Beckman
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagen
Wasserbad	Bachhofer
Zentrifugen	Beckman, Hettich, Eppendorf

### 2.5.2 Geräte für Strahlungs-Exposition und Lichtmessung

Tageslicht-Leuchtstoffröhren Osram L58/W19	Osram
Tageslicht-Leuchtstoffröhren True-Lite 36/40 W	d-lite Lichttechnik Berlin
UV-Leuchtstoffröhren Q-Panel UVA-340	Pausch Messtechnik Haan
Li-Cor LI-1000 Datalogger	LiCor
LI-190-SB cosinus Sensor	LiCor
Solar Light-Radiometer PMA2100	Solar Light Co.
UVA-Detektor PMA2110	Solar Light Co.
UVB-Detektor PMA2106	Solar Light Co.

## 2.6 Durchführung der Arbeit

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden an verschiedenen Einrichtungen des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und Meeresforschung (AWI, Bremerhaven) und des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (München-Neuherberg) durchgeführt.

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden in den Laboratorien des Institutes für Biochemische Pflanzenpathologie (BIOP) und des Genom Analyse Zentrums (GAC) der GSF vorgenommen.

In der Sektion Makroalgen-Biologie des AWI in Bremerhaven wurden die Algen für einige der Laborversuche kultiviert und auch vor Ort in den dort vorhandenen Expositions- und Klimaräumen bestrahlt.

Alle Arbeiten mit Freilandmaterial fanden im Untersuchungsgebiet auf Spitzbergen statt, das im Folgenden näher beschrieben werden soll.

## 2.7 Das Untersuchungsgebiet

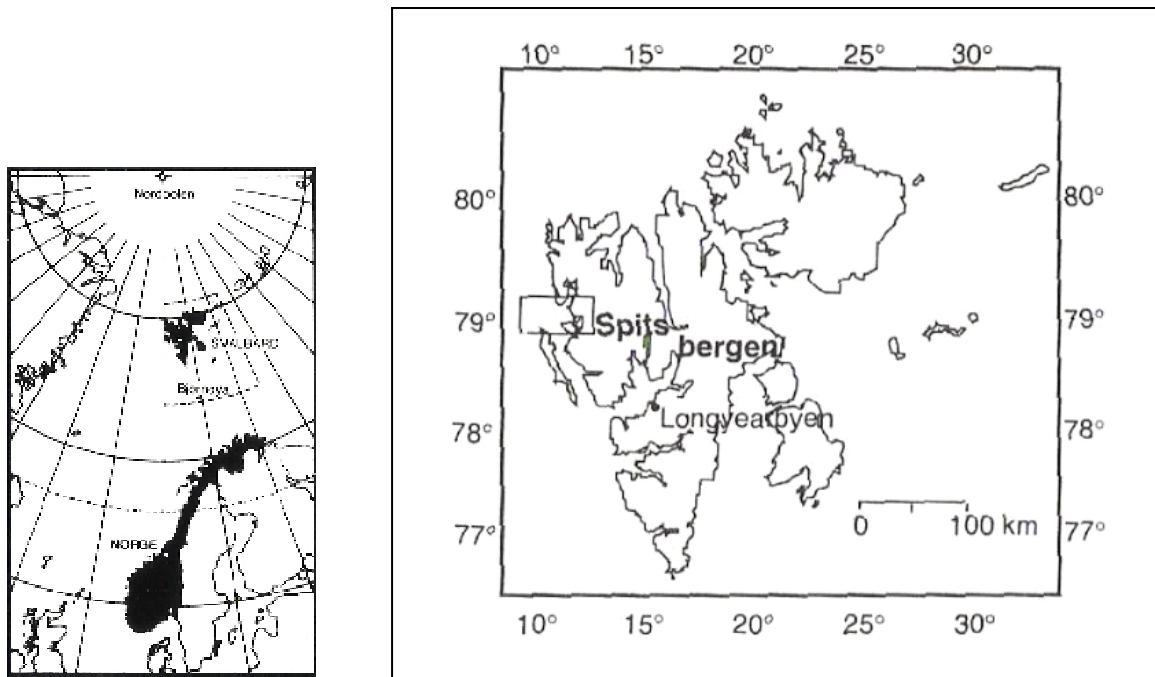
Alle der hier beschriebenen Bestrahlungsversuche mit Freilandmaterial, entsprechende Lichtmessungen und Beobachtungen im Freiland wurden von der deutschen Koldewey-Station des Alfred-Wegener-Institutes für Polar- und Meeresforschung in Ny-Ålesund (Spitzbergen) aus durchgeführt.

Ny-Ålesund ist eine ehemalige Kohlebergbau-Siedlung und liegt im nordwestlichen Teil der Inselgruppe Spitzbergen am Rande des Kongsfjordes.

Abbildung 2.7-1 gibt einen Überblick über die geographische Lage Spitzbergens und des Kongsfjords.

Das Pflanzenmaterial, das hier zur Verwendung kam, wurde von Forschungstauchern an verschiedenen Plätzen des Kongsfjords gesammelt und zur weiteren Bearbeitung ins Labor gebracht. Aus Abbildung 2.7-2 sind die Sammelstellen im Kongsfjord ersichtlich. Tabelle 2.7-1 gibt einen Überblick über die Lage und Beschaffenheit des jeweiligen Platzes und die dort gesammelten Algenarten.

Die Algen wurden von den Tauchern in Sammelnetzen zum Boot gebracht und dort in einer abgedunkelten, mit Meerwasser gefüllten Tonne ins Labor überführt. Hier erfolgte die Hälterung der Pflanzen in Kunststoffwannen unter ständigem Meerwasserdurchfluss bis zur weiteren Verwendung.



**Abbildung 2.7-1:** Überblick über die geographische Lage Spitzbergens und des Kongsfjordes (eingerahmt).



**Abbildung 2.7-2:** Sammelstellen für Makroalgen im Kongsfjord (1: Ny-Ålesund; 2: Kolhamnlaguna; 3: Brandallaguna; 4: Prins-Heinrich-Øya; 5: Hansneset)

**Tabelle 2.7-1:** Sammelstellen für Makroalgen im Kongsfjord.

<b>Sammelstelle</b>	<b>Lage</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Gesammelte Arten</b>
<b>Ny-Ålesund</b>	Aussenseiten der Hafemolen	Senkrecht bis auf 10 Meter Tiefe abfallende Betonwände, anschließend flacher Grund mit feinem Sediment	Junge Exemplare von <i>Laminaria saccharina</i> in großer Zahl an den Betonwänden
	Alter Schiffsanleger	Zahlreiche Stahlträger, dazwischen Geröll und Betonteile; südlich daran anschließend Übergang in flachen Sedimentgrund	Junge Exemplare von <i>L. saccharina</i> und <i>L. digitata</i> an den Stahlträgern und auf den Geröllbrocken
<b>Kolhamnlaguna</b>	Nordwestlich an Ny-Ålesund angrenzende Bucht	Feiner Sedimentgrund in 3 bis 8 Metern Wassertiefe	Sedimentgrund mit vereinzelt stehenden Exemplaren von <i>M. arcticum</i>
<b>Brandallaguna</b>	Von Ny-Ålesund aus fjordauswärtsgelegener Teil des Kongsfjordes nordwestlich von Brandalpynten	Zunächst flacher Sedimentgrund in 8 bis 12 Metern Tiefe, in nördlicher Richtung rasch auf größere Tiefen abfallend	Sedimentgrund mit vereinzelt stehenden Exemplaren von <i>Monostroma arcticum</i> , festgewachsen auf kleinen Steinen
<b>Prins-Heinrich-Øya</b>	Gebiet nördlich der Insel Prins-Heinrich-Øya	Feiner Sedimentgrund, rasch auf Tiefen von mehr als 30 Metern abfallend	In Tiefen ab etwa 15 Metern vereinzelt Exemplare von <i>L. solidungula</i> , festgewachsen auf kleinen bis mittleren Steinen
	Gebiet östlich der Insel Prins-Heinrich-Øya	flacher Sedimentgrund in 3 bis 8 Metern Tiefe	Sedimentgrund mit dichter Algenvegetation, teilweise größere Flecken von <i>L. saccharina</i>
<b>Hansneset</b>	Gebiet nordwestlich der Insel Blomstrand-halvøya gelegen	Felsgebiet, rasch auf Tiefen von über 30 Metern abfallend; Höhle mit ca. 3 Metern Wassertiefe	In der Höhle und im flachen Felsbereich im Unterwuchs junge Exemplare von <i>L. saccharina</i>

## 2.8 Verwendete Algen

Für die Untersuchungen UV-induzierter Genexpression wurden verschiedene benthische Makroalgen verwendet, die in ihrer vertikalen Verbreitung bis in die Gezeitenzone vorkommen und dort biologisch relevanten UV-Strahlungswerten ausgesetzt sein können. Eine Ausnahme stellt die Braunalge *Laminaria solidungula* dar, die gewöhnlich in Tiefen von 10 bis 30 Metern verbreitet ist. Vereinzelt Exemplare dieser Alge wurden aber auch in flacherem Wasser gefunden, wo sie ebenfalls von UV-Strahlung betroffen sein können. Die untersuchten Algen sind von den kalt-gemäßigten bis in die arktischen Regionen verbreitet (Ausnahme ebenfalls *L. solidungula*: endemisch arktisch) und in ihren jeweiligen Ökosystemen häufig anzutreffende Arten, die teilweise auch bestandsbildend sein können. (Wiencke et al. 2004a) Tabelle 2.8-1 gibt einen Überblick über die verwendeten Algen-Spezies.

**Tabelle 2.8-1:** Überblick über die taxonomische Einordnung und Verbreitung der verwendeten Makroalgen-Arten (Lüning 1985; Wiencke et al. 2004a)

	<i>Acrosiphonia sp.</i>	<i>Monostroma arcticum</i>	<i>Laminaria saccharina</i>	<i>Laminaria digitata</i>	<i>Laminaria solidungula</i>
<b>Systematische Einordnung</b>	<i>Chlorophyta, Ulvophyceae</i>	<i>Chlorophyta, Ulvophyceae</i>	<i>Phaeophyta, Laminariales</i>	<i>Phaeophyta, Laminariales</i>	<i>Phaeophyta, Laminariales</i>
<b>Morphologie</b>	fädig	flächig	differenziert	differenziert	differenziert
<b>Südliche Verbreitungsgrenze</b>	Spanien (Atlantik)	Helgoland (Nordsee)	Nördliches Portugal	Nördliches Frankreich	Endemisch arktisch
<b>Nördliche Verbreitungsgrenze</b>	Spitzbergen, Grönland	Spitzbergen	Nördliche Arktis	Mittlere Arktis	
<b>Vertikale Verbreit.</b>	Sublitoral	Sublitoral	Sublitoral	Sublitoral	Sublitoral

### 2.8.1 *Acrosiphonia sp.*

Diese fädige Grünalge bildet auf sandigem oder felsigem Grund teilweise sehr ausgedehnte Polster, die bei entsprechenden Gezeitenständen auch trockenfallen können. Die Zellfäden legen sich dabei übereinander und schützen sich so vor Austrocknung und starker Sonneneinstrahlung.

Für die hier durchgeführten Versuche wurde ausschließlich Kulturmateriale verwendet, das aus Dauerkulturen (Kultur-Nr. 1121; Isolat von Grönland) vom Alfred-Wegener-Institut angezogen wurde. Die Pflanzen wurden in abgedeckten 2 Liter-Bechergläsern in gefiltertem Meerwasser, dem eine Nährlösung zugesetzt war (Provasoli Enriched Seawater, PES; Provasoli 1963) unter ständiger Belüftung mit gefilterter Luft (Sartorius Zellulosenitratfilter, 0,2 µm) kultiviert, was auch eine ständige Umwälzung der Algenhalli zur Folge hatte und eine gleichmäßige Belichtung aller Individuen gewährleistete. Die Anzucht erfolgte dabei in einer 5 °C-Klimakammer bei einer 18 h Lichtperiode und einer Lichtintensität von 8 bis 15 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Ein kompletter Wasserwechsel erfolgte alle 2 Wochen.

### 2.8.2. *Monostroma arcticum*

Die Sporophyten von *Monostroma arcticum* bilden flächige, nur eine Zellschicht dicke Thalli aus, die bis in die untere Gezeitenzone vorbereitet sind und dort auf felsigem Grund oder bei sandigem Grund auf kleinen Steinen festgewachsen sind.

Für die Versuche wurde Freilandmaterial verwendet, das von Tauchern im Untersuchungsgebiet in Wassertiefen von etwa 2 bis 7 Metern gesammelt wurde. Die Pflanzen wurden in Sammelnetzen zum Boot gebracht und dort für den weiteren Transport ins Labor sofort in wassergefüllte und abgedunkelte Behältnisse überführt.

Dort wurden die Pflanzen in Kunststoffwannen unter ständigem Meerwasserdurchfluss bis zur weiteren Verwendung gehältert.

### **2.8.3 *Laminaria saccharina*, *L. digitata* und *L. solidungula***

Die Sporophyten dieser Braunalgen bilden flächige Thalli, die eine Länge von mehreren Metern erreichen können und in ein blattartiges Phylloid, einen Stiel (Cauloid) und ein Haftorgan (Rhizoid) differenziert sind. Das Phylloid von *L. digitata* ist bei älteren Individuen fingerförmig gespalten während die Phylloide der beiden anderen Arten ungespalten sind und eine länglich gestreckte Morphologie aufweisen.

Für die hier durchgeführten Versuche wurden entweder junge Thalli (ca. 4 bis 20 cm Länge) oder im Falle von *L. saccharina* auch Sporen verwendet, die aus den Sori reifer Individuen gewonnen wurden. Von *L. saccharina* wurde sowohl Kultur- als auch Freilandmaterial eingesetzt, während von *L. digitata* und *L. solidungula* nur Freilandmaterial zur Verwendung kam.

Die Kultur junger Sporophyten von *L. saccharina* erfolgte in den Kulturräumen der Abteilung für Meeresbotanik des Alfred-Wegener-Institutes in Bremerhaven. Dazu wurden junge Pflanzen in 5 Liter-Kulturflaschen bei 5 °C und einer Lichtintensität von 8 bis 15  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  in mit PES angereichertem Meerwasser angezogen. Ein kompletter Wasserwechsel wurde alle 2 Wochen durchgeführt.

Freilandmaterial wurde von Tauchern im Untersuchungsgebiet in Wassertiefen von 2 bis 18 Metern gesammelt und in Sammelnetzen zum Boot gebracht. Dort wurden diese zum weitem Transport ins Labor in abgedunkelte und wassergefüllte Gefäße überführt.

## 2.9 Bestrahlungsversuche

### 2.9.1 Laborversuche mit künstlicher UV-Strahlung

#### 2.9.1.1 Bestrahlungsversuche in Bremerhaven

Die UV-Exposition von *A. arcta* und junger Sporophyten von *L. saccharina* erfolgte in einem Temperaturkonstanzraum (5 °C) des Alfred-Wegener-Institutes in Bremerhaven.

Das verwendete Strahlungsklima wurde durch Verwendung von je 3 Leuchtstoffröhren der Typen True-Lite (36/40 W, d-lite Lichttechnik Berlin; PAR) und Q-Panel (Typ UV-A 340, Cleveland, Ohio, USA; UV-Bereich) erzeugt. Zum Ausschluss der UV-Strahlung in den Kontrollansätzen wurden die Leuchtstoff-Röhren mit nur für UV-Strahlung undurchlässiger Kunststoff-Folie beklebt (cut-off Wellenlänge < 395 nm; Folex, Dreieich, Deutschland). Die dabei erreichten Bestrahlungsstärken wurde mit Hilfe eines Li-Cor LI-1000 Datalogger + LI-190-SB cosinus Sensor und eines Solar-Light-Radiometers (PMA2100) mit den entsprechenden Sensoren für den UV-A- und UV-B-Bereich erfasst und waren wie folgt (jeweils gemittelt aus 10 Messwerten von verschiedenen Punkten der Expositionsplattform):

- UVB (280 – 315 nm): 0,43 W/m<sup>2</sup>
- UVA (315 – 400 nm): 8,38 W/m<sup>2</sup>
- PAR (400 – 750 nm) : 43,8 μmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

Die verwendeten Algen wurden von den Kulturgefäßen in flache Kunststoffwannen überführt und dort in mit PE angereichertem Meerwasser für Zeiträume von 4 bis 48 Stunden bestrahlt. Nach der Exposition wurden die entsprechenden Individuen kurz mit Süßwasser gespült, trockengetupft und nach Einwickeln in Aluminiumfolie in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei –80 °C.

#### 2.9.1.2 Bestrahlungsversuche im Labor auf Spitzbergen (Ny-Ålesund)

Zur Durchführung von Laborversuchen auf Spitzbergen mit dort gesammeltem Freilandmaterial diente ein abgedunkelter Raum des alten Kraftwerks in Ny-Ålesund, der dem sogenannten Nansen-Labor der Forschungsstation angegliedert ist. Dieser Raum eignet sich



insofern für Expositionsversuche, als hier ein großer Eisblock im Kellergeschoss auch im Sommer für immer gleichbleibend kühle Temperaturen von etwa 5 °C sorgt und kaum Tageslicht einfällt.

Auf Tischen wurden hier ähnliche Expositionsplätze eingerichtet, wie sie oben für die Bestrahlung im Labor in Bremerhaven beschrieben wurden. Dazu wurden je 3 Leuchtstoffröhren vom Typ TrueLite und Q-Panel kombiniert und zum UV-Ausschluss teilweise mit UV-undurchlässiger Filterfolie (vgl. 2.9.1.1) beklebt. Die Bestrahlungsstärken wurden wie unter 2.9.1.1 angegeben gemessen und waren wie folgt (jeweils gemittelt aus 6 Messwerten von verschiedenen Punkten der Expositionsplattform):

- UVB (280 – 315 nm): 0,47 W/m<sup>2</sup>
- UVA (315 – 400 nm): 8,70 W/m<sup>2</sup>
- PAR (400 – 750 nm) : 76,9 μmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

Die zur Bestrahlung vorgesehenen Algen wurden aus dem Hälterungsbecken in Kunststoffwannen mit frischem Meerwasser überführt und unter die Bestrahlungseinheit verbracht. Nach dem entsprechenden Bestrahlungszeitraum wurden die Pflanzen kurz in Süßwasser gespült, trockengetupft und nach Einwickeln in Aluminiumfolie in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bei –80 °C gelagert und auf Trockeneis zur Weiterverarbeitung in das Labor an die GSF (München) transportiert.

## 2.9.2 Freilandversuche

Um Algen auch unter natürlichen Strahlungsbedingungen in ihrem natürlichen Lebensraum im Meer exponieren zu können, wurde eine spezielle Konstruktion entwickelt, die es erlaubte, auch kleine und empfindliche Algenthalli ausreichend zu befestigen, diese in einer bestimmten Wassertiefe hält und zudem einen relativ unkomplizierten Zugang zum Versuch ermöglichte, ohne bei jeder Probennahme einen Bootseinsatz unternehmen zu müssen.

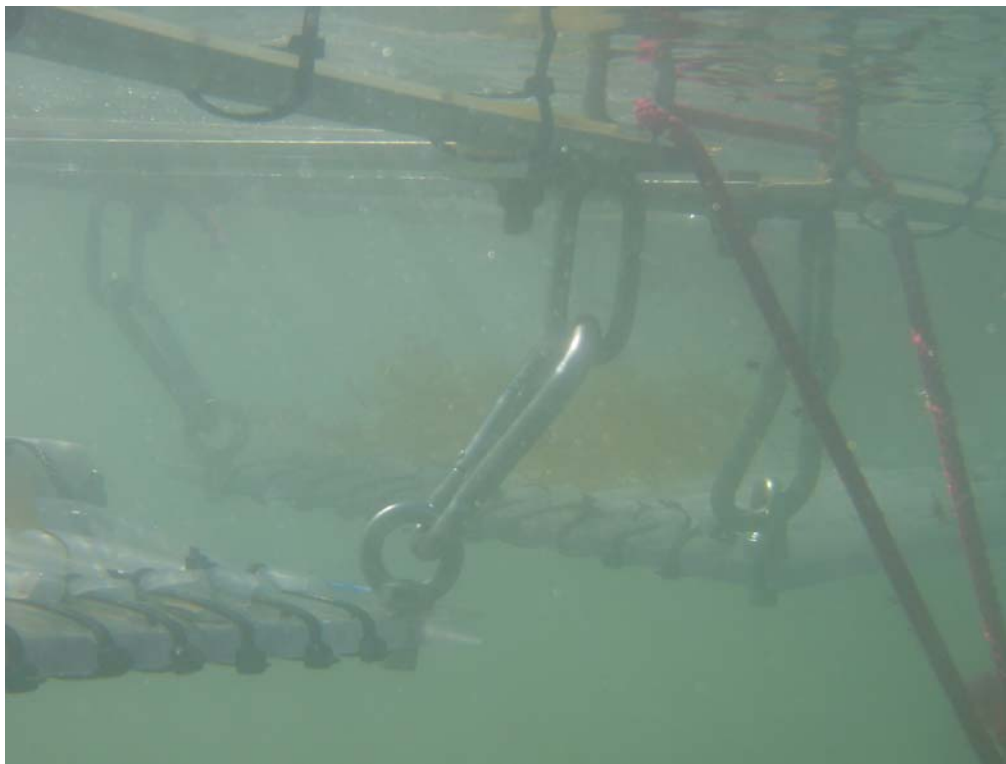
Die Algen wurden dazu mit ihren Cauloiden (bei *Laminaria saccharina*) bzw. den unteren Thallusteilen, an denen teilweise noch kleine Steinchen hafteten (bei *Monostroma arcticum*), in kleine Schlitze gesteckt, die in halbierte Silikonschläuche geschnitten wurden. Die halbierten Schläuche wurden ihrerseits mit Kabelbindern auf Plexiglasplattformen befestigt. Die fertig mit Algen bestückten Plattformen konnten nun über Karabiner und Ösen an einem Stahlrahmen eingehängt werden, der über Seile und Bojen in einer Wassertiefe von 0,5

Metern gehalten wurde und zum Erreichen bestimmter Expositionsbedingungen mit Filterfolie einer definierten Transparenzen für verschiedene Wellenlängen versehen werden konnte.

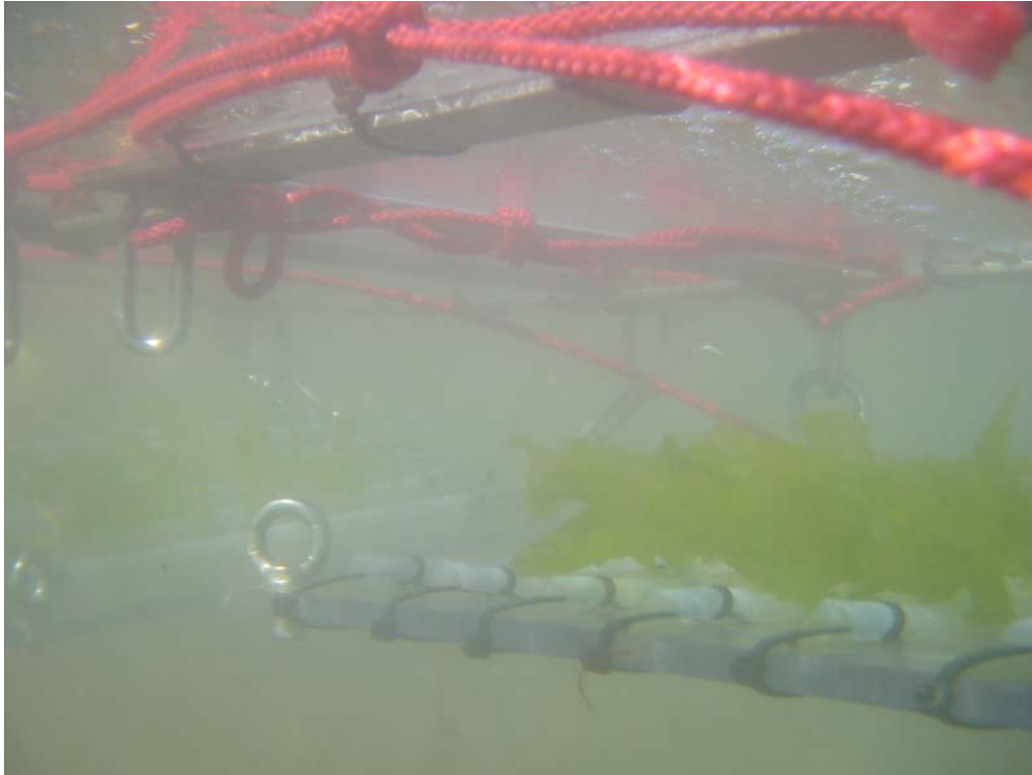
Der gesamte Rahmen konnte über eine Umlenkrolle, die in einer Wassertiefe von etwa 5 Metern befestigt war, und Seile zum Strand bzw. zum Expositionsort gezogen werden.

Zur Ermittlung der *in situ*-Strahlungsbedingungen war an der Konstruktion ein *ELUV14*-Dosimeter (ESYS GmbH, Berlin) befestigt.

Einen Überblick über die Konstruktion vermitteln die Abbildungen 2.9-1 und 2.9-2.



**Abbildung 2.9-1:** Konstruktion zur *in situ*-Exposition von Makroalgen. Zu erkennen sind die beiden Plexiglasplattformen, auf denen die Algenhalli mit Hilfe halbiertes Silikonschläuche befestigt sind. Darüber befinden sich jeweils in einem Metallrahmen die Filterfolien zur Erzeugung eines bestimmten Strahlungsklimas. In diesem Fall wurden junge Thalli von *L. saccharina* exponiert.



**Abbildung 2.9-2:** Konstruktion zur *in situ*-Exposition von Makroalgen. Zu erkennen sind wieder die Plexiglasplattformen und die darüberliegenden Metallrahmen mit Filterfolie. Hier sind Individuen von *M. arcticum* auf der Plexiglasplattform zu sehen.

Die Versuchspflanzen wurden für einen Zeitraum von 4 bis 48 Stunden auf den Plattformen exponiert, anschließend kurz mit Süßwasser gespült, trockengetupft und nach Einwickeln in Aluminiumfolie in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zum Abtransport bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2.10 Lichtmessungen

An der Koldewey-Station des Alfred-Wegener-Institutes in Ny-Ålesund werden routinemäßig täglich verschiedene Umweltparameter erfasst, darunter auch verschiedene Strahlungswerte, die dann Wissenschaftlern der verschiedensten Fachrichtungen zur Verfügung stehen und zu einer besseren Interpretation der jeweils gewonnenen Versuchsergebnisse beitragen können.

In diesem Fall wurde auf die Ergebnisse der Strahlungsmessungen der Spektroradiometer der Koldewey-Station auf dem Dach des NDSC-Gebäudes und des Unterwasser-

Spektroradiometers zurückgegriffen und zur besseren Charakterisierung der zum Zeitpunkt der Freilandversuche (siehe 2.9.2) vorherrschenden Strahlungsbedingungen genutzt.

## **2.11 Beobachtungen im Freiland**

Am Tauchplatz „Prins-Heinrich-Øya“ wurden nach Aufbruch des Meereises deutliche Veränderungen bei auffallend vielen Sporophyten von *Laminaria saccharina* beobachtet. Diese wurden fotografisch während eines Tauchganges in einer Wassertiefe von etwa 2 bis 4 Metern *in situ* dokumentiert. Zudem wurden einige Sporophyten ins Labor verbracht um sie dort unter geeigneteren Bedingungen zu fotografieren.

## 2.12 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der RNA aus dem Algenmaterial wurden zunächst verschiedene Methoden ausgetestet. Als am geeignetsten erwiesen sich dabei Methoden, bei denen eine selektive Fällung der RNA mittels Lithiumchlorid erfolgt. Aus den Grünalgen *M. arcticum* und *Acrosiphonia sp.* konnte unter Verwendung der Methode von Chang et al. (1993) genügend RNA extrahiert werden. Für die Braunalge *L. saccharina* konnte diese Methode nur mit mäßigem Erfolg eingesetzt werden, da diese Alge größere Mengen an Polysacchariden enthält, welche die Isolierung der RNA empfindlich stören. Hier konnte mit Erfolg die Methode von Apt et al. (1995) verwendet werden, bei der die störenden Polysaccharide mittels Zugabe von Ethanol ausgefällt werden.

In jedem Fall wurde das Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser fein zermahlen und jeweils 100 bis 150 mg des Pulvers in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden entweder sofort weiterbehandelt oder bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.12.1 Modifizierte Methode nach Chang et al. (1993) für Grünalgen

Zu dem tiefgefrorenen Pflanzenmaterial wurde  $750\text{ }\mu\text{l}$  auf  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorerwärmten Extraktionspuffers gegeben und die Probe dann für 3 min bei  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 1800 rpm auf einem Schüttler gemischt und dann mit  $800\text{ }\mu\text{l}$  Chloroform versetzt und noch mal für 5 min bei 1800 rpm geschüttelt. Nach der Lyse wurden die Zellfragmente durch Zentrifugation (10 min, 16000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) abgetrennt und die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Zur selektiven Fällung der RNA wurde die die Probe mit  $\frac{1}{4}$  Volumenanteil 10 M LiCl versetzt, bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert und anschließend zum Pelletieren der Nukleinsäure zentrifugiert (30 min, 16000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und unter Erwärmen in  $500\text{ }\mu\text{l}$  sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Durch eine weitere Extraktion mit  $500\text{ }\mu\text{l}$  Chloroform wurden organische Verunreinigungen aus der Probe entfernt. Die dabei gewonnene wässrige Phase wurde mit 0,1 Volumenanteilen Natriumacetat (3 M, pH 4,8) und 2,5 Volumenanteilen absoluten Ethanol versetzt und für 1 Stunde bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Durch eine

anschließende Zentrifugation (30 min, 16000 g, 4 °C) wurde die RNA pelletiert und nach Waschen in 70 %igen Ethanol in 20 bis 40 µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.12.2 Modifizierte Methode nach Apt et al. (1995) für *Laminaria***

Das tiefgefrorene und pulverisierte Algenmaterial wurde im Verhältnis 1:10 (w/v) mit Extraktionspuffer versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur bei 1800 rpm auf einem Schüttler gemischt. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform und 5minütigem Schütteln (1800 rpm) wurden die Zellfragmente durch Zentrifugation (16000 g, 10 min, 4 °C) pelletiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um störende Polysaccharide aus der Lösung auszufällen, wurde durch langsames Zutropfen 0,33 Volumenanteil Ethanol (absolut) zugegeben und der Ansatz erneut einer Chloroform-Extraktion unterzogen.

Zur selektiven Fällung der RNA wurde die die Probe mit ¼ Volumenanteil 10 M LiCl versetzt, bei -20 °C über Nacht inkubiert und anschließend zum Pelletieren der Nukleinsäure zentrifugiert (30 min, 16000 g, 4 °C). Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und unter Erwärmen in 500 µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst. Durch eine weitere Extraktion mit 500 µl Chloroform wurden organische Verunreinigungen aus der Probe entfernt. Die dabei gewonnene wässrige Phase wurde mit 0,1 Volumenanteilen Natriumacetat (3 M, pH 4,8) und 2,5 Volumenanteilen absoluten Ethanols versetzt und für 1 Stunde bei -80 °C inkubiert. Durch eine anschließende Zentrifugation (30 min, 16000 g, 4 °C) wurde die RNA pelletiert und nach Waschen in 70 %igen Ethanol in 20 bis 40 µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.12.3 Isolierung von Poly(A)<sup>+</sup>-RNA**

Zur Anreicherung von mRNA aus den Gesamt-RNA-Präparationen wurde der Oligotex mRNA-Kit (Qiagen) verwendet. Die meisten mRNAs sind an ihrem 3'-Ende polyadenyliert wodurch die mRNA an die verwendete Oligotex-dT-Affinitätsmatrix (d(T)<sub>30</sub>-Oligonukleotide an Latexkügelchen gekoppelt) bindet und so von anderen Nukleinsäurespezies abgetrennt werden kann.

Die RNA-Probe wurde zunächst nach Herstellerangaben mit der Oligotex-dT-Suspension versetzt und zur Auflösung von Sekundärstrukturen der RNA für 5 min bei 70 °C inkubiert. Die Hybridierung der RNA mit den Oligonukleotiden erfolgte anschließend für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die gebundene Poly-(A)<sup>+</sup>-RNA über die im Kit enthaltenen Säulchen aufgereinigt, mehrmals gewaschen und mittels einer erwärmten Pufferlösung eluiert.

## **2.13 Physikalische Analyse von Nukleinsäuren**

### **2.13.1 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung wurde durch Messung ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Für doppelsträngige DNA entspricht 1 OD 50 µg/ml, für einzelsträngige DNA 33 µg/ml und für RNA 40 µg/ml.

Die Reinheit der Nukleinsäurepräparation konnte anhand des Verhältnisses der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm abgeleitet werden. Der Quotient  $A_{260} / A_{280}$  liegt bei einer reinen Nukleinsäurelösung zwischen 1,8 und 2,0.

Für die Bestimmung der optischen Dichte wurde ein NanoDrop-Spektrophotometer verwendet, das zur Messung nur eine sehr geringe Flüssigkeitsmenge (1 – 1,5 µl) benötigt.

### **2.13.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Identifizierung von Nukleinsäure-Fragmenten erfolgte durch Auftrennung derselben in horizontalen Agarosegelen und Vergleich der entstehenden Banden mit einem ebenfalls mitgeführten Längen-Standard. Je nach Länge der zu erwartenden Nukleinsäure-Fragmente wurden Gele mit Agarosekonzentrationen von 0,6 – 2,0 % durch Lösen der entsprechenden Menge Agarose in TBE-Puffer und anschließendem Aufkochen in der Mikrowelle hergestellt. Vor Erstarren des Gels wurden 0,6 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben, welches durch seine Fluoreszenz-Eigenschaften die Identifizierung der Banden unter UV-Licht ermöglichte. Vor dem

Auftragen der Proben wurden diese mit 0,1 – 0,2 Volumenanteilen DNA-Ladepuffer (10x) versetzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte durch Anlegen einer konstanten Spannung von 1 – 10 V/cm Elektrodenabstand für eine Dauer von 30 bis 60 Minuten. Die Gele wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators beurteilt und fotografiert.

## 2.14 Suppressive Subtraktions-Hybridisierung (*SSH*)

Um solche Gene identifizieren zu können, die spezifisch durch eine erhöhte UV-Bestrahlung induziert oder reprimiert werden, wurde die Methode der Subtraktiven Hybridisierung eingesetzt. Dieses Verfahren ist dazu geeignet, zwei verschiedene mRNA-Populationen miteinander zu vergleichen und diejenigen Gene zu klonieren, die spezifisch nur in einer der beiden Populationen exprimiert werden.

Neben der in dieser Arbeit verwendeten Suppressiven Subtraktions-Hybridisierung (*SSH*) existieren noch verschiedene andere Methoden, die auf dem Prinzip der Subtraktiven Hybridisierung beruhen (Duguid und Dinauer 1990). Zwischen diesen Verfahren bestehen besonders hinsichtlich zweier Aspekte Unterschiede:

- **Subtraktion:** wie werden die differentiell von den in beiden Populationen vorhandenen Transkripte abgetrennt und angereichert?
- **Normalisierung:** wie können seltene im Vergleich zu häufigen Transkripten angereichert werden?

Bei den meisten Verfahren werden beide mRNA-Populationen zunächst in cDNA umgeschrieben. Dabei wird das cDNA-Gemisch, welches die gesuchten differentiell exprimierten Transkripte enthält, als Tester bezeichnet. Die cDNA des Referenzzustandes wird Driver genannt.

Die beiden Populationen gemeinsamen Transkripte müssen nun entfernt werden. Dies wird durch eine Hybridisierung der beiden Populationen erreicht, nachdem zuvor durch Denaturieren Einzelstränge erzeugt wurden. Nachfolgend werden die neu geformten Doppelstränge abgetrennt



und die verbleibenden cDNA-Einzelstränge, die keinen Hybridisierungspartner gefunden haben, werden als testerspezifisch angesehen.

Bei der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (*SSH*, Diatchenko et al. 1996) werden Normalisierung und Subtraktion durch ein ausgeklügeltes System von Adaptoren und PCR-Amplifikationen erreicht. Die cDNA wird hierbei zunächst mit dem Restriktionsenzym *RsaI* geschnitten, da die Effizienz der Subtraktion auch von der Länge der Fragmente abhängig ist. Die Tester-cDNA wird nun in zwei Fraktionen aufgeteilt und mit jeweils unterschiedlichen Adaptoren ligiert, welche für die spätere PCR-Amplifikation wichtige Sequenzabschnitte enthalten. Die 5'-Region dieser Adaptoren ist identisch, während die 3'-Region variiert. Die Driver-cDNA wird nicht mit Adaptoren versehen.

**Adaptor 1** 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'

TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT

**Nested PCR-Primer 1**

**Adaptor 2R** 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT

**Nested PCR-Primer 2R**

CTAATACGACTCACTATAGGGC

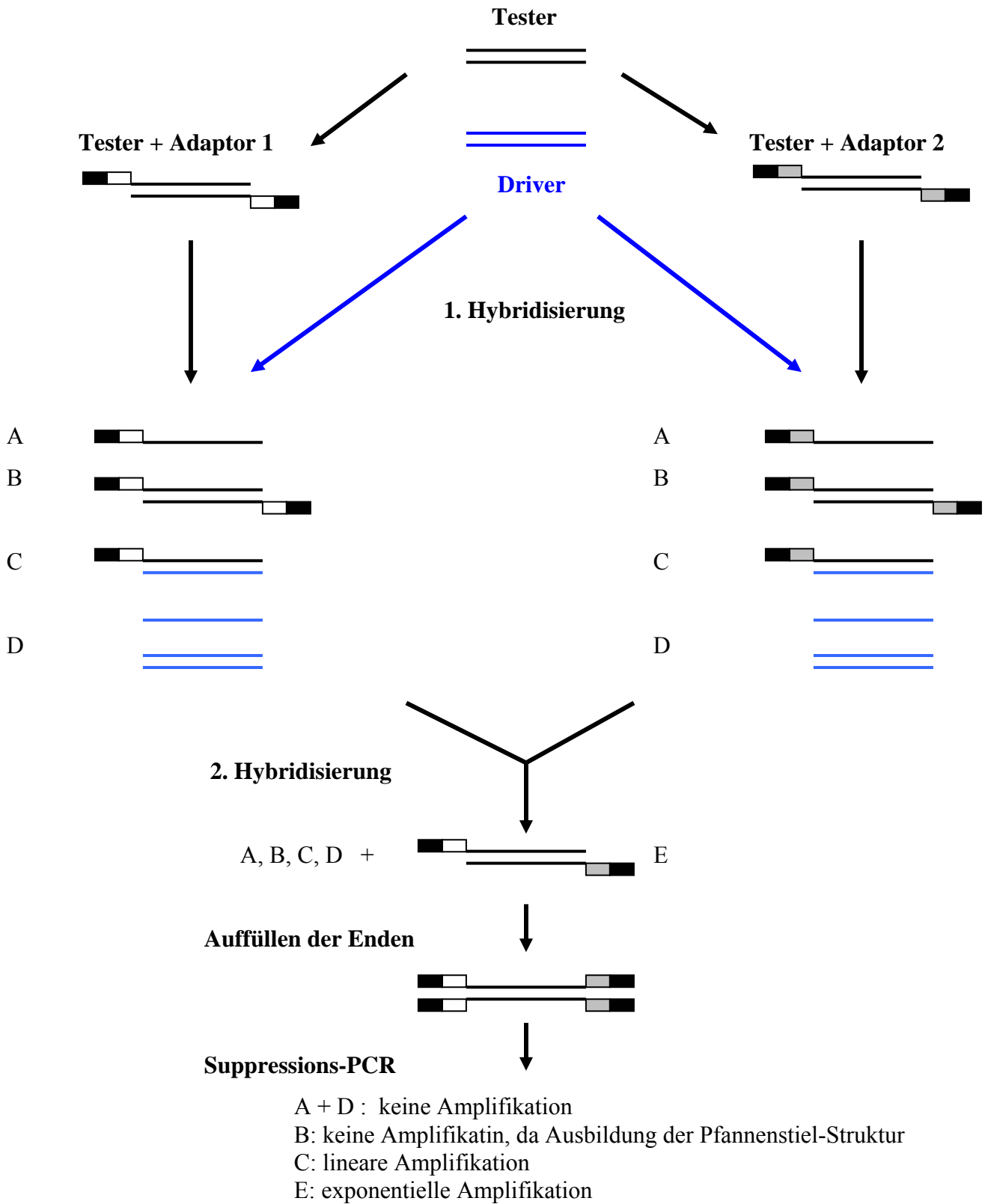
**PCR-Primer 1**

Im nächsten Schritt werden zwei Hybridisierungen durchgeführt, wobei jeweils der Driver im Überschuß dem Tester zugegeben wird.

Bei der 1. Hybridisierung reagieren in zwei getrennten Ansätzen die beiden Populationen von Tester-cDNA-Einzelsträngen mit der in hohem Überschuß zugegebenen Driver-cDNA, welche wegen der fehlenden Adaptoren keine Primer-Bindungsstellen besitzt. Die für die Tester-cDNA spezifischen und damit gesuchten Transkripte finden auch nach der anschließenden Vereinigung beider Ansätze keinen Hybridisierungspartner in der Driver-cDNA, bilden aber mit ihrer (den

jeweils anderen Adaptor tragenden) Entsprechung ein doppelsträngiges cDNA-Molekül mit zwei verschiedenen Primer-Bindungsstellen an den Enden.

Dieses kann in der nun folgenden PCR-Reaktion exponentiell vervielfältigt werden. Die Amplifikation von sehr häufigen tester-spezifischen Doppelsträngen, die sich schon im 1. Schritt vereinigt haben und an beiden Enden identische Adaptoren tragen, wird durch die Ausbildung einer sog. Pfannenstiel-Struktur („pan handle“) weitestgehend unterdrückt. Diesem Effekt, der für eine weitere Normalisierung, d.h. ein quantitatives Angleichen von seltenen und häufigen Transkripten in der Tester-cDNA sorgt, wird durch den Begriff „Suppression“ im Namen der Methode Rechnung getragen. In einem weiteren PCR-Schritt wird mit einem nach innen versetzten Primerpaar („nested PCR“) die Spezifität der Amplifikation noch einmal erhöht.



**Abbildung 2.14-1:** Grundprinzip der Subtraktiven Hybridisierung.

### 2.14.1 Herstellung von Tester und Driver

Als Ausgangsmaterial für die Durchführung der *SSH* wurden je 2 µg der aus den behandelten und unbehandelten Pflanzen extrahierten mRNA verwendet. Diese wurde zunächst einer cDNA-Einzelstrangsynthese unterworfen, indem der poly(A)<sup>+</sup>-RNA 1 µl Oligo-dT-Synthese Primer zugesetzt und dieser Ansatz für 5 min bei 70 °C denaturiert und danach für 2 Minuten auf Eis gegeben wurde.

Anschließend wurden 5 µl Erststrang-Puffer, 1 µl dNTP-Mix, 1 µl Wasser und 1 µl AMV Reverse Transkriptase zugegeben und der Ansatz für 2 Stunden bei 42 °C inkubiert. Zur Synthese des komplementären cDNA-Zweitstranges wurden dem Reaktionsansatz 48,4 µl Wasser, 16 µl Zweitstrang-Puffer, 1,6 µl dNTP-Mix und 4 µl Enzym-Cocktail (DNA-Polymerase I, RNase H und DNA-Ligase) hinzupipettiert. Die Reaktion verlief für 2 Stunden bei 16 °C – und nach Zugabe von 2 µl T4-DNA-Polymerase für weitere 30 min bei 16 °C. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 4 µl einer 20x EDTA/Glykogen-Mischung zugegeben und die Enzyme durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt.

Die so erhaltene cDNA wurde nun einem Restriktionsverdau mit *RsaI* unterworfen, wofür zu 43,5 µl cDNA 5 µl Restriktionspuffer und 25 Units *RsaI* zugegeben und das Gemisch bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert wurde. Nach Abstoppen der Reaktion mit EDTA/Glykogen, Aufreinigung und Fällung wurde die geschnittene cDNA in 5,5 µl Wasser gelöst. Aliquots der so erhaltenen Fragmente wurden nun mit Adaptoren ligiert und dienten dann im entsprechenden Versuch als Tester. Als Driver wurde cDNA verwendet, die nicht mit Adaptoren versehen war.

Zur Herstellung der Tester-cDNA wurde der entsprechenden Ansatz 1:6 mit Wasser verdünnt, in zwei gleiche Fraktionen aufgeteilt und mit Adapter 1 bzw. 2R zugesetzt. Die Ligation erfolgte nach Zugabe von Ligationspuffer und T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C.

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA/Glykogen gestoppt und die Ligase durch Hitzedenaturierung (72 °C, 5 min) inaktiviert.

### 2.14.2 Subtraktive Hybridisierung

Zur Hybridisierung des Testers (jeweils mit einem der Adaptoren ligierte cDNA) mit einem Überschuß an Driver (unligierte komplementäre cDNA) wurden die cDNA-Proben gemischt und mit Hybridisierungspuffer versetzt.

Die Ansätze wurden zunächst für 3 min bei 98 °C denaturiert woran sich die erste Hybridisierung für 8 Stunden bei 68 °C anschloss.

Um die zweite Hybridisierung zu starten, wurden die beiden Ansätze zusammengegeben und mit 1 µl eines Gemisches aus 1 µl frisch denaturierter Driver-cDNA, 2 µl Wasser und 1 µl Hybridisierungspuffer versetzt. Die Reaktion verlief über Nacht bei 68° C.

Anschließend wurde den Ansätzen 200 µl Verdünnungspuffer zugesetzt und die Proben für 7 min bei 68 °C inkubiert.

### 2.14.3 Suppressions-PCR

Die nun folgenden PCR-Schritte dienten dazu, differentiell exprimierte Transkripte stark anzureichern. Die gesuchten Moleküle tragen, wie oben beschrieben, unterschiedliche Adaptoren an den Enden und können nun unter Verwendung geeigneter Primer exponentiell amplifiziert werden.

Die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

2,5 µl	PCR-Reaktionspuffer (10x)
2,5 µl	MgCl <sub>2</sub> -Lösung (25 mM)
0,5 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
1,0 µl	PCR-Primer 1 (10 µM)
0,5 µl	Taq-Polymerase
1,0 µl	verdünnter Hybridisierungsansatz
17,0 µl	steriles H <sub>2</sub> O

Als Matritze für die 1. PCR wurde 1 µl des verdünnten Hybridisierungs-Ansatzes verwendet. Zunächst wurden die Reaktionen für 5 min bei 75 °C gehalten, um die fehlenden Enden der Adaptoren aufzufüllen und somit Bindungsstellen für die PCR-Primer zu schaffen. Anschließend erfolgte die eigentliche PCR mit folgendem zyklischen Programmablauf:

- |                   |       |         |
|-------------------|-------|---------|
| 1. Denaturierung: | 94 °C | 30 s    |
| 2. Annealing:     | 66 °C | 30 s    |
| 3. Extension:     | 72 °C | 1,5 min |

Die Anzahl der Zyklen wurde variiert und lag bei 25 bis 30. Die PCR-Ansätze wurden 1:10 mit wasser verdünnt und 1 µl davon als Matritze in die 2. PCR eingesetzt. Die Ansätze setzten sich wie oben für die 1. PCR beschrieben zusammen, anstelle des PCR-Primers 1 wurden hier aber die Nested PCR Primer 1 und 2R eingesetzt. Es wurde folgendes Temperatur/Zeit-Programm verwendet:

- |                   |       |         |
|-------------------|-------|---------|
| 1. Denaturierung: | 94 °C | 30 s    |
| 2. Annealing:     | 68 °C | 30 s    |
| 3. Extension:     | 72 °C | 1,5 min |

Auch hier wurde die Anzahl der verwendeten Zyklen variiert, um ein Optimum aus genügend PCR-Produkt und übermäßigem Hintergrund zu finden. Sie lag in allen Fällen zwischen 15 und 25 Zyklen.

Die als geeignet erachteten PCR-Produkte wurden vereinigt und zur Klonierung verwendet.

## **2.15 Herstellung größen-selektionierter Genbibliotheken**

Bei der Verwendung des Standard-Protokolls für die *SSH* und die anschließende Klonierung der PCR-Produkte war festzustellen, dass die Länge der so erhaltenen cDNA-Moleküle mit etwa 80 bis maximal 300 bp sehr kurz war. Dieser Befund ist zum einen durch den Restriktionsverdau mit

*RsaI* bei der *SSH*, zum anderen aber auch durch die bevorzugte Ligation kurzer cDNA-Moleküle in Plasmide zu erklären.

Dies erwies sich aber für die Identifizierung der entsprechenden Sequenzen als nachteilig, da diese ja vom Grad der Übereinstimmung mit bereits bekannten Sequenzen aus anderen Organismen abhängig ist. So kann bei längeren Sequenzen auch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine Übereinstimmung zu Vergleichssequenzen in der Datenbank gefunden werden.

Um nun nach der Klonierung längere Fragmente zu erhalten, wurden die PCR-Produkte der *SSH* in einem Agarose-Gel ihrer Länge nach aufgetrennt und anschließend größenspezifisch (500 bis 1500 bp) aus dem Gel eluiert.

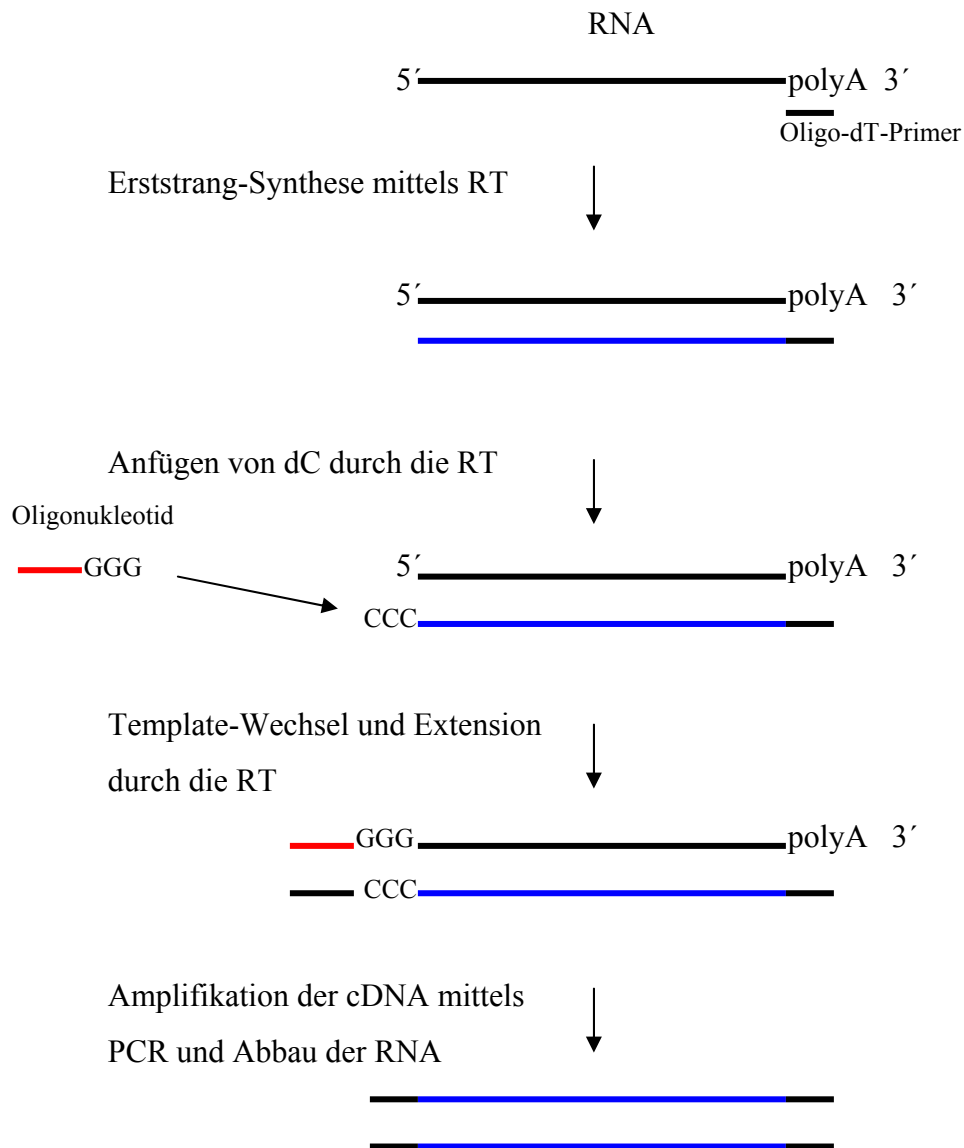
Weiterhin wurde mit Hilfe der *SMART*-Methode aus Gesamt-RNA unsubtrahierte cDNA hergestellt, die ebenfalls einer Größenauftrennung mittels Gelelektrophorese unterzogen wurde.

Die somit größenselektionierte und aufgereinigte cDNA konnte nun zur Klonierung verwendet werden.

### **2.15.1 Amplifizierung des Ausgangsmaterials mittels *SMART*-Methode**

Mit Hilfe dieser Methode kann aus sehr geringen Mengen von RNA (> 25 ng) eine zur Herstellung von Genbanken ausreichende Menge an cDNA hergestellt werden. Dabei wird unter Verwendung eines modifizierten Oligo(dT)-Primers zunächst eine Erststrang-Synthese durchgeführt, wobei die Terminale Transferase-Aktivität der Reversen Transkriptase nach Erreichen des 5'Endes der mRNA mehrere Desoxycytidin-Nukleotide an das 3'Ende der neu synthetisierten cDNA anfügt. Ein spezielles Oligonukleotid mit einer endständigen Oligo(G)-Sequenz hybridisiert mit dem 3'Ende der cDNA und nach einem Template-Wechsel verlängert die Reverse Transkriptase die cDNA um die Sequenz des hybridisierten Oligonukleotides, welche eine Primer-Bindungsstelle für die nachfolgende PCR-Amplifikation enthält. In den Fällen, in denen die Reverse Transkriptase schon vor Erreichen des 5'Endes der mRNA die Synthese abbricht, werden mit einer geringeren Effizienz Desoxycytidin-Moleküle angefügt, was schließlich zu einer Anreicherung von Voll-Länge-cDNAs führt, da nur diese bei der PCR-Amplifikation exponentiell vermehrt werden können.

Die Durchführung der Methode erfolgte nach den Angaben des Herstellers.



**Abbildung 2.15-1:** Grundprinzip der *SMART*-Methode

Die PCR-Ansätze wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und die Produkte des gewünschten Größenbereichs wie oben beschrieben wieder aus dem Gel extrahiert. Diese konnten dann zur Herstellung von Genbanken eingesetzt werden.



### 2.15.2 Ligation und Transformation der cDNA

Um die mittels *SSH* oder *SMART*-Synthese erhaltenen cDNA-Moleküle weiter analysieren zu können, mussten diese zunächst vereinzelt werden. Zu diesem Zweck wurden Genbanken hergestellt, wobei die entsprechenden Moleküle in Plasmid-Vektoren ligiert, in bakterielle Zellen transformiert und schließlich durch Ausplattieren separiert werden konnten. Nach gelelektrophoretischer Analyse und Auswahl geeigneter Bakterienklone wurden die entsprechenden Plasmid-Inserts reamplifiziert, aufgereinigt und zur Herstellung von Makro- und Mikroarrays verwendet.

Die zur Ligation vorgesehenen cDNA-Moleküle wurden über eine sog. T/A-Klonierung in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor integriert. Diese Methode macht sich zu nutze, dass die Taq-Polymerase im Zuge der PCR an die Enden der entstehenden Produkte überhängende Adenin-Nukleotide anfügt. Der linearisierte Vektor trägt hingegen überhängende Thymin-Nukleotide an den Enden, wodurch eine direkte Integration von PCR-Produkten in das Plasmid erleichtert wird. Ein Ligations-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5,0 µl	Ligations-Puffer
1,0 µl	pGEM <sup>®</sup> -T-Vektor
3,0 µl	PCR-Produkt
1,0 µl	T4-DNA-Ligase

Die Ligation erfolgt über Nacht bei 4 °C. Die so erhaltenen zirkulären Plasmid-Moleküle konnten nun in Bakterienzellen transformiert werden. Dazu wurden 2 – 5 µl des Ligationsansatzes zu 50 µl einer Suspension von hochkompetenten *E. coli*-Zellen (JM109 High Efficiency Competent Cells) gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation der Ansätze für 25 Minuten auf Eis erfolgte die eigentliche Transformation durch Applizieren eines Wärmeschocks von 42 °C für 45 bis 50 s. Anschließend wurde der Ansatz nochmals für 2 min auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 950 µl SOC-Medium für 60 bis 90 min bei 37 °C im Laborschüttler bebrütet.

### 2.15.3 Vereinzeln und Vermehrung der cDNA-Moleküle

Um die transformierten Bakterien vereinzeln zu können, wurden 50 bis 200  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Als Selektionsmarker wurde dem Agar Ampicillin (25  $\mu\text{M}$ ) beigemischt, was ein ungewünschtes Aufwachsen von Bakterien ohne Plasmid verhindern sollte.

Die so erhaltenen Bakterienkolonien wurden mit sterilen Zahnstochern in jeweils 100  $\mu\text{l}$  LB-Glycerin-Medium (mit 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Ampicillin als Selektionsmarker) in 96-well-Mikrotiterplatten überführt. Nach Bebrüten der Platten über Nacht bei 37 °C konnten diese bei -80 °C eingefroren und gelagert werden. Sie dienten als Dauerkulturen und Ausgangsmaterial für die weiteren Analysen.

### 2.15.4 Herstellung einer Genbibliothek durch die *vertis Biotechnologie AG*

Für die Braunalge *Laminaria saccharina* wurde von der Firma *vertis Biotechnologie AG* (Freising) eine Standard-cDNA-Genbibliothek hergestellt. Dazu wurde zunächst wie unter 2.12.2 beschrieben RNA aus Individuen von *L. saccharina* extrahiert, die für 3, 6, 12, 24 und 36 Stunden künstlicher UV-Strahlung ausgesetzt waren. Die genauen Bestrahlungsbedingungen sind unter 2.9.1.2 angegeben.

Die aus den verschiedenen Individuen extrahierte RNA wurde vereinigt und auf Trockeneis an die *vertis Biotechnologie AG* geliefert und dort zur Herstellung der Genbibliothek verwendet. Dort wurde aus der Gesamt-RNA zunächst poly(A)<sup>+</sup>-RNA isoliert und in einer Erststrang-Synthese mit einem Oligo(dT)-*NotI*-Primer eingesetzt. Die dabei entstehenden Produkte wurden in 16 Zyklen einer LA („Long & Accurate“-)PCR amplifiziert. Nach einer limitierten Exonuklease-Behandlung (zur Bildung von *EcoRI*-Überhängen an den 5'-Enden) und einem Restriktionsverdau mit *Not I* wurde die cDNA zur Größenselektionierung in einem 1,3 %igen Agarosegel aufgetrennt und der Größenbereich > 500 bp aus dem Gel eluiert. Anschließend erfolgte die Ligation der so erhaltenen Produkte in *EcoRI*- und *NotI*-verdauten pBS II sk+ -Vektor. Die Vektoren wurden dann in Phage T1 resistente TransforMax<sup>TM</sup> EC100<sup>TM</sup> (Epicentre)

elektrokompetente Zellen elektroporiert. Nach Zugabe von Glycerol zu einer Endkonzentration von 15% (v/v) konnten die so behandelten Zellen bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Zur Überprüfung der Größenverteilung der Vektor-Inserts der Genbibliothek wurden etwa 1000 Kolonien der Genbibliothek, welche über Nacht in einer Petrischale angezogen wurden, einer Massen-Kolonie-PCR unterzogen. Die so erhaltenen PCR-Produkte nach 22 Zyklen wurden in einem 1,3 %igen Agarosegel analysiert.

## **2.16 Screening der Genbibliotheken mittels Array-Technologie**

Um die Genbanken auf das Vorhandensein differentiell exprimierter Gene durchmustern zu können, wurde die Array-Technologie angewandt. Mit den dabei verwendeten Methoden können mit relativ geringem Aufwand mehrere hundert bis tausend Klone der Genbank überprüft werden.

Dabei unterscheidet man Makro- und Mikroarrays. Bei der Herstellung von Makroarrays werden die entsprechenden Genfragmente auf Nylonmembranen aufgebracht und anschließend mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert.

Im Falle der Mikroarrays werden die DNA-Moleküle auf die Glasoberfläche von speziellen Objektträgern aufgetragen und mit Sonden hybridisiert, die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden.

Aus der Intensität des Signals eines bestimmten Spots und nach Vergleich mit der entsprechenden Kontrolle lassen sich dann Rückschlüsse auf die Stärke der differentiellen Expression eines bestimmten Gens ziehen.

### **2.16.1 Herstellung der Makroarray-Membranen**

Um ausreichend Material zur Herstellung der Makroarrays zu erhalten, wurden die in Bakterien transformierten Plasmid-Inserts mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde 1  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension der Dauerkultur zu 99  $\mu\text{l}$  PCR-Mix in 96-well-PCR-Platten überführt. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10,0 $\mu$ l	PCR-Reaktionspuffer (10x)
8,0 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> -Lösung (25 mM)
2,0 $\mu$ l	dNTP-Mix (je 10 mM)
3,0 $\mu$ l	Primer M13 Forward (10 $\mu$ M)
3,0 $\mu$ l	Primer M13 Reverse (10 $\mu$ M)
1,0 $\mu$ l	Taq-Polymerase
73,0 $\mu$ l	steriles H <sub>2</sub> O

Es wurde nachstehendes PCR-Programm verwendet:

1. Denaturierung:	94 °C	30 s	} 35 Zyklen
2. Annealing:	68 °C	30 s	
3. Extension:	72 °C	1,5 min	

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel überprüft und solche Ansätze aussortiert, die Doppelbanden ergaben oder wo kein Produkt entstanden war.

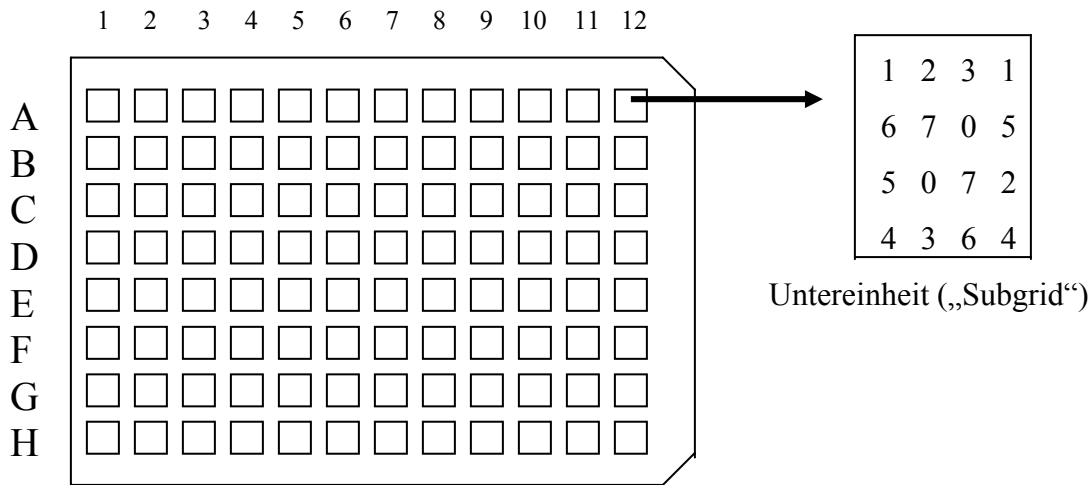
Aus den Ansätzen wurden nun über Millipore-Filterplatten überschüssige Primer und Enzyme entfernt. Dazu wurde die PCR-Ansätze in die Vertiefungen der Filterplatten gegeben, mit je 100  $\mu$ l Wasser versetzt und durch Anlegen eines Vakuums abgesaugt. Die zurückgehaltenen DNA-Fragmente wurden in 25  $\mu$ l Wasser gelöst und in 96-well-Mikrotiterplatten überführt.

Die so erhaltene DNA-Lösung konnte nun mit Hilfe eines Laborroboters (MicroGrid II, Biorobotics) auf Nylonmembranen aufgetragen werden. Dazu wurde ein 96-Nadel-Werkzeug verwendet, das ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen aus der Mikrotiterplatte an einer definierten Position der Membran aufbrachte.

Je nach Anwendung konnten so die Genfragmente aus 7 bis 15 Mikrotiterplatten (entsprechend 672 bis 1440 unterschiedlichen Genen) auf jeweils eine Membran übertragen werden.

In Abbildung 2.16-1 ist beispielhaft das Auftragsmuster für eine Makroarray-Membran bei Verwendung von 7 Quell-Mikrotiterplatten (entspricht 672 unterschiedlichen Genfragmenten) dargestellt. Das Werkzeug des Laborroboters erzeugte dabei auf den Membranen 96 Einheiten

(„Grids“), die jeweils den entsprechenden Positionen auf den Mikrotiterplatten entsprachen. Jede der 96 Einheiten war wiederum in 16 Untereinheiten („Subgrids“) aufgeteilt, diese entsprachen den einzelnen Mikrotiterplatten.



Makroarray-Membran mit 96 Einheiten („Grids“)

**Abbildung 2.16-1:** Beispielhafte Darstellung des Auftragsmusters der Makroarray-Membranen. Die Anordnung der 96 Einheiten entspricht dabei der Anordnung der Kavitäten auf den Quell-Mikrotiterplatten, wohingegen die Zahlen in der Untereinheit die Nummerierung der jeweiligen Mikrotiterplatte angibt.

Die Nadeln des Werkzeugs ( $\varnothing$  400  $\mu$ m) erlaubten einen Transfer von ca. 15 nl DNA-Lösung; der Vorgang wurde jeweils 10 Mal wiederholt.

Nach erfolgtem Transfer wurden die DNA-Moleküle mittels UV-Licht mit der Membran quervernetzt. Um die Membranen schließlich verwenden zu können, mussten die aufgebrauchten doppelsträngigen DNA-Moleküle zur Erzeugung von Einzelsträngen denaturiert und anschließend fixiert werden. Dies erfolgte durch eine jeweils 5-minütige Inkubation der Membranen in den folgenden Lösungen:

Lösung 1: NaCl (1,5 M) + NaOH (0,5M)

Lösung 2: NaCl (1,5 M) + Tris (0,5 M, pH 7,5)

Lösung 3: SSC (2x)

### 2.16.2 Radioaktive Markierung der cDNA-Sonden

Um bei der Hybridisierung der Makroarrays mit den entsprechenden Sonden ein detektierbares Signal zu erhalten, musste in die verwendeten cDNA-Moleküle das radioaktive Isotop  $\alpha^{33}\text{P}$  eingebaut werden. Zu diesem Zweck wurde das Random-Priming-System verwendet, wobei nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA hexamere Oligonukleotide an die Einzelstränge binden und als Ausgangspunkte für die Neubildung des komplementären Stranges dienen. Das Klenow-Fragment (ein Teil des DNA-Polymerase I-Komplexes ohne 5'→3' Exonuklease-Aktivität) synthetisiert dann unter Verwendung von  $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP den Gegenstrang. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

20,0 $\mu\text{l}$	cDNA-Lösung (hitzenaturiert bei 96 °C)
15,0 $\mu\text{l}$	Random-Primer-Puffer (3x)
5,0 $\mu\text{l}$	$\alpha^{33}\text{P}$ -dATP (10 mCi/ml)
2,0 $\mu\text{l}$	je dCTP, dGTP und dTTP
1,0 $\mu\text{l}$	Klenow-Fragment
2,0 $\mu\text{l}$	Aqua dest.

Die Reaktion verlief bei 25° C für 2 Stunden. Als Matrize dienten entweder die Produkte der Suppressions-PCR (siehe 2.14.3) oder cDNA, die direkt mittels Reverser Transkription von RNA gewonnen wurde (siehe 2.12).

Zur Entfernung nicht eingebauter radioaktiver Nukleotide wurde die cDNA auf MikroSpin-Säulchen überführt und bei 3500 rpm für 1 min zentrifugiert. Zu 1  $\mu\text{l}$  des Eluats wurden 10 ml Enhancer-Flüssigkeit gegeben und die Aktivität im Flüssigkeits-Szintillations-Zähler bestimmt. In der Regel lag diese zwischen  $1 \times 10^8$  und  $5 \times 10^8$  cpm.

### 2.16.3 Hybridisierung der Makroarray-Membranen

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurden die Makroarrays mit den radioaktiv-markierten PCR-Produkten aus den *SSH*-Experimenten (jeweils Vorwärts- und Rückwärtsexperimente, siehe 2.14) oder mit direkt aus RNA synthetisierter cDNA hybridisiert.

Um eine unspezifische Bindung der Sonden zu verhindern, mussten die Membranen zunächst prähybridisiert werden. Dazu wurden die Makroarrays in Hybridisierungs-Röhren überführt und mit 3 ml Prähybridisierungs-Lösung für ca. 4 Stunden bei 68 °C im Rotationsofen inkubiert.

Vor Zugabe der radioaktiv-markierten Sonden wurden diese zunächst für 5 min bei 95 °C denaturiert und dann der Prähybridisierungs-Lösung zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C im Rotationsofen.

Vor der Auswertung wurden die Membranen für je zweimal für mindestens 20 Minuten mit den Waschlösungen 1 und 2 bei 68 °C versetzt. Erst dann konnten die Makroarrays in Folie eingeschweißt werden und auf Imaging-Platten für eine Zeitdauer von 3 bis 48 Stunden exponiert werden. Nach Einlesen und Digitalisierung der Platten mit einem IP-Scanner wurden die entsprechenden Bilddateien mit Hilfe der Software Array Vision (Version 6.0) ausgewertet.

### 2.16.4 Analyse der Hybridisierungsergebnisse

Die Intensität des radioaktiven Signals eines bestimmten Spots spiegelt die Menge der im Probenmaterial vorhandenen cDNA wieder und lässt hierüber Rückschlüsse auf den Expressionsstatus des betreffenden Gens zu.

Die Auswertung der Signale erfolgte mit Hilfe der Software Array Vision 6.0. Dabei wurde zunächst ein Raster über das digitalisierte Bild der Membran gelegt und je nach Bedarf für jeden Spot genau ausgerichtet. Um jeden Spot wurde so ein definierter Bereich festgelegt und ein Hintergrundwert ermittelt, der mit der Signalintensität verrechnet wurde. Anschließend führte das Programm eine interne Normalisierung über alle Spots der Membran durch. Dies war notwendig, um geringe Unterschiede in der Menge der eingesetzten RNA und der Effizienz der radioaktiven Markierung auszugleichen. Von den so erhaltenen Intensitätswerten berechnete die Software das

Verhältnis der jeweils zu vergleichenden Spots. War bei drei unabhängigen Wiederholungen eine deutliche Induktions- oder Reprimierungstendenz festzustellen, wurde der betreffende Klon einer weiteren Analyse unterzogen.

### **2.16.5 Herstellung der Mikroarrays**

Die Herstellung des Ausgangsmaterials für die Produktion der Mikroarrays erfolgte wie bereits für die Makroarrays beschrieben (vgl. 2.16.1). Die mittels Millipore-Filterplatten aufgereinigten PCR-Produkte wurden aber hier nicht in Wasser, sondern in 25 µl Betain-Spotting-Puffer aufgenommen und anschließend in 384-well-Mikrotiterplatten überführt. Die so vorbereiteten DNA-Lösungen wurden mit Hilfe eines Laborroboters unter Verwendung eines 4-Nadel-Werkzeugs auf aldehydbeschichtete Glasobjektträger aufgetragen. Das dabei übertragene Flüssigkeits-Volumen betrug etwa 2 nl pro individuellem Punkt. Auf jeden Objektträger wurden 2 Wiederholungen aufgetragen.

Die so hergestellten Mikroarrays konnten nicht sofort weiterverwendet werden, sondern mussten nach einer Trocknungszeit von 2 bis 4 Tagen einer Blockierungsreaktion mit NaBH<sub>4</sub> sowie einem Denaturierungsschritt unterzogen werden. Dazu wurden die Objektträger zunächst zweimal für je 2 Minuten in einer 0,1 %igen SDS-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend zweimal ebenfalls unter Schütteln mit Wasser gespült. Um freie Aldehydgruppen auf dem Objektträger zu reduzieren, wurden die Mikroarrays für 5 Minuten in eine frisch bereitete NaBH<sub>4</sub>-Lösung (0,75 g NaBH<sub>4</sub> in 200 ml PBS und 75 ml Ethanol abs.) überführt und anschließend für 2 min in kochendes Wasser gegeben. Dieser Schritt diente dazu, die DNA zu denaturieren und somit besser für die Hybridisierung zugänglich zu machen.

### **2.16.6 cDNA-Synthese und Markierungsreaktion**

Als Ausgangsmaterial für die Hybridisierung der Mikroarrays diente RNA, die wie unter 2.12 beschrieben aus den Versuchspflanzen extrahiert wurde. Je nach Verfügbarkeit wurden 10 bis 20 µg gelöster RNA in einer Vakuum-Zentrifuge eingedampft und das Präzipitat in 14,5 µl



DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach Zugabe von 4 µl Oligo-dT-Primer wurden die Ansätze für 10 min bei 70 °C inkubiert und dann sofort auf Eis abgekühlt. Für die eigentliche cDNA-Synthese wurden dem Ansatz folgende Komponenten zugefügt:

6,0 µl	Erststrang-Sythesepuffer (10x)
3,0 µl	DTT (0,1 M)
0,6 µl	Aminoallyl-dNTP-Mix (50x)
2,0 µl	Reverse Transkriptase (SuperScript II, 200 U/µl)

Die Reaktion verlief über Nacht bei 42 °C. Zur Hydrolyse restlicher RNA wurden dem Ansatz schließlich 10 µl 1 M NaOH und 10 µl 0,5 M EDTA zugesetzt und für 15 min bei 65 °C inkubiert. Um den Reaktions-Ansatz zu neutralisieren, wurden anschließend 10 µl 1 M HCl zugegeben. Schließlich erfolgte die Aufreinigung des Ansatzes unter Verwendung des PCR Purification Kits (Qiagen). Dazu wurden dem Reaktions-Ansatz 300 µl Puffer PB zugegeben, gemischt und auf ein Zentrifugations-Säulchen gegeben. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 min wurden die Säulchen zweimal mit 750 µl Phosphat-Waschpuffer gespült, wobei der Durchlauf jeweils verworfen wurde. Um die DNA zu eluieren wurde zweimal 30 µl Phosphat-Elutionspuffer aufgetragen und nach einer Inkubation für 5 min jeweils 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde in einer Vakuum-Zentrifuge eingedampft und in 11,5 µl Phosphat-Elutionspuffer gelöst.

Zur Markierung der cDNA wurden die Fluoreszenz-Farbstoffe Cy3 und Cy5 verwendet. Zur Vorbereitung der Farbstoffe für die weitere Nutzung wurde ein vom Hersteller geliefertes Aliquot in 20 µl DMSO gelöst, davon je 2 µl auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und in der Vakuum-Zentrifuge eingedampft. Dem so vorbereiteten Farbstoff wurden die 11,5 µl cDNA-Lösung zugesetzt, gemischt und im Dunkeln für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Reinigung der cDNA von überschüssigem, nicht-eingebautem Farbstoff wurde wiederum der PCR Purification Kit verwendet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß dem mitgelieferten Protokoll. Die cDNA wurde schließlich mit zweimal 30 µl EB-Puffer von der Säule eluiert.

Die Eluate der beiden zu vergleichenden Proben wurden zusammengegeben, in der abgedunkelten Vakuum-Zentrifuge eingedampft und schließlich in 55 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen.

### 2.16.7 Hybridisierung der Mikroarrays

Die wie unter 2.16.5 beschrieben hergestellten Mikroarrays mussten vor der eigentlichen Hybridisierung zunächst prähybridisiert werden. Dazu wurden 55 µl Prähybridisierungs-Puffer auf den Objektträger aufgebracht und die Mikroarrays für 45 min in Hybridisierungs-Kammern bei 42 °C im Hybridisierungs-Ofen inkubiert.

Anschließend wurden die Objektträger in destilliertem Wasser gewaschen, wobei die Deckgläser und überschüssiger Prähybridisierungs-Puffer entfernt wurde. Schließlich konnten die Mikroarrays kurz in Isopropanol getaucht und bei Raumtemperatur luftgetrocknet werden. Die für die Hybridisierung vorgesehene cDNA –Lösung musste zunächst für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert werden, bevor sie auf die Objektträger aufgebracht werden konnte. Nach Auflegen von Deckgläsern wurden die Mikroarrays in abgedunkelten Hybridisierungs-Kammern über Nacht bei 42 °C im Hybridisierungs-Ofen belassen.

Bevor die Mikroarrays analysiert werden konnten, mussten diese zunächst zur Entfernung ungebundener DNA gewaschen werden. Dazu wurden die Objektträger mit vorgewärmtem (42 °C) Waschpuffer 1, dann zweimal mit Waschpuffer 2 für jeweils 2 min kräftig geschüttelt. Nach zweimaligem leichtem Schütteln mit Waschpuffer 3 wurden die Objektträger zum Trocknen bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.

Zur Auswertung wurden die Mikroarrays unter Verwendung eines FLA8000 Laser-Scanners (Fuji) eingelesen und digitalisiert. Die Analyse der Bilddateien erfolgte mittels der Software GenePix Pro 6,0 (Molecular Devices). Das Programm vergleicht dabei die Fluoreszenzintensitäten eines bestimmten Spots des Mikroarrays (entsprechend einem zu untersuchenden Genfragment) bei Anregung mit Laserlicht der Wellenlängen 635 nm und 532 nm. Der so errechnete Quotient wurde als Zahlenwert dargestellt, wobei positive Werte eine Induktion und negative Werte eine Repression des jeweiligen Gens bedeuten.

## 2.17 Sequenzierung und Sequenzanalysen

Ein Teil der Sequenzierarbeiten wurde von der Firma Medigenomix (Martinsried) durchgeführt. Dafür wurden die betreffenden Klone von den Ausgangsplatten in LB-Kulturmedium (mit 100 µg/ml Ampicillin) in Deep-Well-Platten überimpft und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Amplifizierung der Vektor-Inserts erfolgte hier mittels Standard-M13-Primer, für die Sequenzierungsreaktion wurde der T7-Primer verwendet.

Sämtliche Sequenzanalysen für die von der Vertis Biotechnologie AG hergestellten Genbibliothek für *Laminaria saccharina* wurden von der Sequenzierabteilung des Max-Planck-Institutes für Genetik (Berlin) durchgeführt. Die dafür benötigten Glycerinkulturen der transformierten Bakterien wurden dazu in frisches LB-Glycerin-Medium in 384-deep-wll-Platten überimpft, über Nacht bei 37 °C bebrütet und anschließend auf Trockeneins verschickt.

Die restlichen Sequenzierungen wurden nach dem Protokoll des Genom-Analyse-Zentrums (GAC) der GSF durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst eine Amplifizierung der zu untersuchenden Vektor-Inserts mittels PCR. Eine Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

5,0 µl	PCR-Reaktionspuffer (10x)
4,0 µl	MgCl <sub>2</sub> -Lösung (25 mM)
1,0 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
1,5 µl	Primer M13 Forward (10 µM)
1,5 µl	Primer M13 Reverse (10 µM)
0,5 µl	Taq-Polymerase
36,5 µl	steriles H <sub>2</sub> O

Die Produkte wurden über Multiscreen-Filterplatten (Millipore) aufgereinigt, in 20 µl Aqua dest. gelöst und 2 µl davon zu 3 µl der Sequenzierlösung gegeben (1 µl BigDye-Terminator-Mix, 1 µl BigDye-Reaktionspuffer (5x), 1 µl T7-Primer (10 mM)). Die Sequenzierungsreaktion wurde nach folgendem Protokoll in einem PCR-Thermocycler durchgeführt:

1. Denaturierung:	95 °C	5 s	} 35 Zyklen
2. Annealing:	50 °C	10 s	
3. Extension:	60 °C	4 min	

Den Produkten dieser Reaktion wurden anschließend 25 µl Ethanol (abs.) zugegeben, für 15 min bei Raumtemperatur im Dunklen belassen und anschließend für 30 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 125 µl Ethanol (70 %ig) und eine weitere Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C für 15 min. Nach erneutem Abgießen des Überstandes und Trocknen des Pellets wurde dieses in 25 µl hochreinem Wasser (Licrosolv) gelöst.

Die so vorbereiteten Proben wurden in spezielle Sequenzier-Mikrotiterplatten überführt und vom Personal des GAC in das Sequenziergerät gegeben. Die entsprechenden Sequenzdaten konnten dann auf der Intranetseite des GAC abgerufen werden.

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der im Internet frei zugänglichen Programme blastn und blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## 2.18 Überprüfung der Array-Ergebnisse mittels Real-Time-PCR

Um die Ergebnisse der *SSH* und der anschließenden Hybridisierungsversuche zu überprüfen, wurde für einige ausgewählte Gene eine quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Dieses Verfahren zur Nukleinsäurequantifizierung basiert nicht auf dem Prinzip der Hybridisierung sondern bedient sich der spezifischen Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Moleküls mittels PCR. Dabei lagert sich ein interkalierender Farbstoff (z.B. SYBR-Green) in die neu entstehenden DNA-Doppelstränge ein, welcher durch Anregung mit einem Laser ein Fluoreszenz-Signal erzeugt. Dieses verhält sich proportional zur Zunahme des PCR-Produktes und erlaubt so ein Verfolgen des Reaktionsverlaufs in der logarithmischen Phase der PCR, was eine Quantifizierung ermöglicht. Als endogene Kontrolle wurde jeweils das Gen für die 18S-rRNA mit amplifiziert. Die Expression dieses „housekeeping“-Gens wird nach Literaturangaben durch Stress nicht verändert und wird üblicherweise zur Standardisierung bei der qRT-PCR auch bei anderen Organismen eingesetzt.

### 2.18.1 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA als Ausgangsmaterial für die qRT-PCR wurde RNA verwendet, die wie unter 2.12 beschrieben aus dem entsprechenden Algenmaterial extrahiert worden war. Von dieser wurden 2 bis 5 µg (je nach Verfügbarkeit von RNA) mit 1 µl Oligo-dT-Primer versetzt und das Reaktionsvolumen mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde im Thermocycler für 10 min auf 70 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen und sie so besser für die im nächsten Schritt zugesetzte DNA-Polymerase zugänglich zu machen. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden dem Reaktionsansatz 4 µl RT-Reaktionspuffer (10x), 1 µl dNTP-Mix, 2 µl DTT, 0,5 µl RNase-Inhibitor und 2 bis 2,5 µl Reverse Transkriptase (Superscript II bzw. III, Invitrogen) zugegeben. Nach kurzem mischen und abzentrifugieren wurde der Ansatz für 60 min bei 42° C inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur für 15 min auf 70 °C erhöht, der Reaktionsansatz kurz auf Eis gekühlt und schließlich 1 µl RNaseH und 5 µl RNaseA zugegeben. Eine anschließende 20 minütige Inkubation bei 37 °C diente dazu, restliche RNA im Reaktionsansatz abzubauen.

### 2.18.2 Design und Überprüfung der Primer für die Real-Time-PCR

Zur Durchführung der Real-Time-PCR müssen für jedes zu untersuchende Gen spezifische Primer hergestellt werden, die bestimmten Anforderungskriterien entsprechen müssen.

Um die Eignung der so generierten Primer für die Real-Time-PCR zu überprüfen, wurde zunächst eine klassische PCR mit cDNA durchgeführt. Dazu wurde folgendes Reaktionsgemisch hergestellt und im Thermocycler für 30 bis 35 Zyklen dem unten angegebenen Temperaturprogramm unterworfen.

2,5 µl	PCR-Reaktionspuffer (10x)
2,0 µl	MgCl <sub>2</sub> -Lösung (25 mM)
0,5 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
1,0 µl	sequenzspezif. Primer Forward (10 µM)
1,0 µl	sequenzspezif. Primer Reverse (10 µM)
0,2 µl	Taq-Polymerase
17,8 µl	steriles H <sub>2</sub> O

#### Temperaturprogramm:

1. Denaturierung:	94 °C	30 s
2. Annealing:	60 °C	30 s
3. Extension:	72 °C	1,5 min

Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Da bei der Real-Time-PCR auch Fehlamplifikate mit in die Quantifizierung eingehen und so das Ergebnis verfälschen, wurden ausschließlich solche Primerpaare weiter verwendet, bei denen im Gel nur eine einzelne distinkte Nukleinsäure-Bande auszumachen war.

### 2.18.3 Durchführung der real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Zur Durchführung der qRT-PCR wurde das real-time-PCR-Gerät ABI7500 (Applied Biosystems) verwendet. Dazu wurde zunächst wie unter 2.18.1 beschrieben cDNA von UV-exponierten Pflanzen und den entsprechenden Kontrollpflanzen synthetisiert. Von dieser wurde je 1 µl zu 20 µl des fertigen Reaktionsmixes (SYBR-Green, Abgene) in die Kavität der Mikrotiter-Detektionsplatte gegeben. Anschließend wurde zu jeder cDNA 2 µl des Primerpaares für das zu quantifizierende Gen bzw. 2 µl des Primerpaares für das 18S-rRNA-Kontrollgen gegeben. Jede Kombination aus cDNA (aus UV-Behandlung und jeweiliger Kontrolle) und Primerpaar (für das zu detektierende Gen und das 18S-rRNA-Kontrollgen) wurde in dreifacher Ausführung auf die Detektionsplatte aufgetragen. Zudem wurden bei jedem Lauf Ansätze mit Reaktionsmix und Primer ohne cDNA als NTC (negativ template control) mitgeführt.

Die Detektionsplatten wurden mit einer transparenten Verschlussfolie beklebt, vorsichtig gemischt, kurz anzentrifugiert und dann in das Real-Time-PCR-Gerät überführt. Es wurde folgendes Temperaturprogramm ausgeführt:

1. Initiationschritt:	50 °C	2 min	
2. Denaturierung:	95 °C	10 min	
3. Denaturierung:	95 °C	15 s	} 40 Zyklen
4. Annealing:	60 °C	45 s	
5. Extension:	72 °C	90 s	

Die Erfassung der Fluoreszenz eines jeden Ansatzes der Detektionsplatte erfolgte bei jedem Zyklus während des Extensionsschrittes bei 72 °C statt. Die Entwicklung der Fluoreszenzintensität konnte schon während des Laufs für jede aufgetragene Probe online verfolgt werden und wurde nach Beendigung der Reaktion von der verwendeten Software analysiert. Dabei wurden für alle Ansätze die Ct-Werte berechnet. Dieser Wert ist als der Zyklus definiert, bei dem zum ersten Mal ein erhöhtes Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte.

Für die relative Quantifizierung wurde das von Pfaffl et al. (2002) erstellte mathematische Modell verwendet und nach folgender Formel der relative Expressionsquotient berechnet:

$$\text{Expressionsquotient} = \frac{E_P^{\Delta C_t_P} (\text{MittelwertKontrolle} - \text{MittelwertBehandlung})}{E_R^{\Delta C_t_R} (\text{MittelwertKontrolle} - \text{MittelwertBehandlung})}$$

$E_P$  = Effizienz Probe  
 $E_R$  = Effizienz Referenz  
 $\Delta C_t_P$  = Differenz Ct-Werte Probe  
 $\Delta C_t_R$  = Differenz Ct-Werte Referenz

## 2.19 HPLC-Analysen

Um die Bildung von Flavonoiden in den untersuchten Grünalgen zu untersuchen, wurden ausgewählte Algenproben einer HPLC-Analyse mit Diodenarray-Aufzeichnung unterworfen, wobei eine von Turunen et al. (1999) beschriebene Methode zur Anwendung kam. Dazu wurde zunächst 200 mg tiefgefrorenes Pflanzenmaterial im Dismembrator für 1 min bei 2500 rpm zerkleinert, anschließend je 50 mg Homogenat in ein 2 ml-Reaktionsgefäß eingewogen und bis zur Extraktion in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Extraktion wurde jede Probe mit 500 µl Methanol versetzt, am Vortex gut gemischt und über Nacht im Kühlschrank belassen. Nach Erwärmen und nochmaligem Mischen wurden die Proben für 10 min bei 9000 g zentrifugiert und die klaren Überstände in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Zur Vorbereitung für die HPLC-Analyse wurden je 75 µl Methanolextrakt mit 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> versetzt, für 10 min bei 11000 rpm zentrifugiert und die klaren Überstände in HPLC-Mikroinsätze pipettiert. Zur Messung wurde ein Beckman System Gold 7.11-HPLC-Gerät mit einer Spherisorb ODS-Säule (Type NC, 5 µm mit Vorsäule) und einem Diodenarray-Detektor 168 (Beckman) verwendet. Es wurde ein Injektionsvolumen von 10 µl eingesetzt, die Säulentemperatur betrug 20° C. Für die Diodenarray-Messung wurden Spektren von 250 bis 450 nm aufgezeichnet.

Es kam folgender Gradient zum Einsatz:

- 5 min isokratisch auf Lösung A
- in 40 min linear auf 100 % Lösung B
- 5 min isokratisch auf 100 % Lösung B
- in 5 min zurück auf Lösung A



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. *Acrosiphonia sp.*

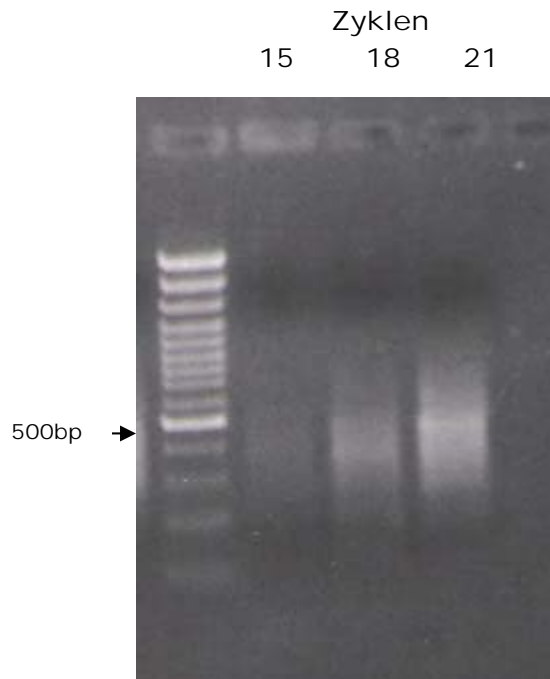
Zur Identifizierung von Genen, deren Expressionsstatus durch UV-Strahlung veränderlich ist, wurden für diese Alge verschiedene Genbibliotheken hergestellt, die dann mit Hilfe der Array-Technologie auf das Vorhandensein spezifisch UV-regulierter Gene durchmustert wurden.

Dazu wurde zunächst unter Verwendung der *Suppressiven Subtraktions-Hybridisierung* (SSH, Clontech) eine für differentiell exprimierte Transkripte angereicherte Genbibliothek hergestellt. Die dafür nötige RNA wurde aus in Kultur angezogenen Individuen von *Acrosiphonia sp.* extrahiert, die für 12 Stunden mit künstlicher UV-Strahlung bzw. im Kontrollansatz nur mit PAR bestrahlt worden waren. Die RNA-Ausbeuten unter Verwendung der Methode von Chang et al. (1993) lagen dabei zwischen 90 und 300 µg Gesamt-RNA pro g Frischgewicht.

Nach dem Umschreiben der eingesetzten mRNA in cDNA, einem Restriktionsverdau mit *RsaI* und mehreren Hybridisierungsschritten konnten die so erhaltenen cDNA-Spezies mittels zweier nacheinander geschalteter PCR-Reaktionen vervielfältigt werden, was genügend Ausgangsmaterial für die anschließende Klonierung lieferte.

Dabei musste die Anzahl der Zyklen bei der 1. und 2. PCR genau ausgetestet werden, da die Menge der gebildeten PCR-Produkte entscheidend für die Qualität der Genbibliothek ist. Werden zu wenige Zyklen durchgeführt, ist nicht genügend Material zur Ligation in die entsprechenden Vektoren vorhanden, während es bei zu vielen Zyklen zu einer Anreicherung nicht-differentiell exprimierter Transkripte und zum Auftreten eines übermäßigen Hintergrundes kommt.

Abbildung 3.1-1 zeigt die Produkte der 2. PCR nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,5 %igen Agarosegel, wie sie für die Klonierung verwendet wurden. Man erkennt eine deutlich Zunahme der Bandenintensität mit ansteigender Zyklenzahl (15, 18 und 21 Zyklen) der PCR. Für die Ligation wurde der im Bild mittlere Ansatz verwendet.



**Abbildung 3.1-1:** Produkte der 2. PCR der *SSH* nach 15, 18 und 21 Zyklen und elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,5 %igen Agarosegel.

Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden über eine T/A-Klonierung in geeignete Plasmide (pGEM-T-Vektor, Promega) ligiert und in hochkompetente *E. coli*-Bakterien (Stamm JM109) transformiert. Nach Ausplattieren der Bakterien auf Agarplatten, die als Selektionsmarker Ampicillin enthielten, wurden nach einer etwa 16-stündigen Inkubation bei 37 °C Bakterienkolonien in Glycerin-Kulturmedium auf Mikrotiterplatten überführt und über Nacht weiter kultiviert. Diese Übernachtskulturen mussten anschließend mittels PCR auf das Vorhandensein der gewünschten cDNAs in den transformierten Vektoren überprüft werden. In Abbildung 3.1-2 ist das Ergebnis der PCR für eine Mikrotiterplatte zu sehen. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.



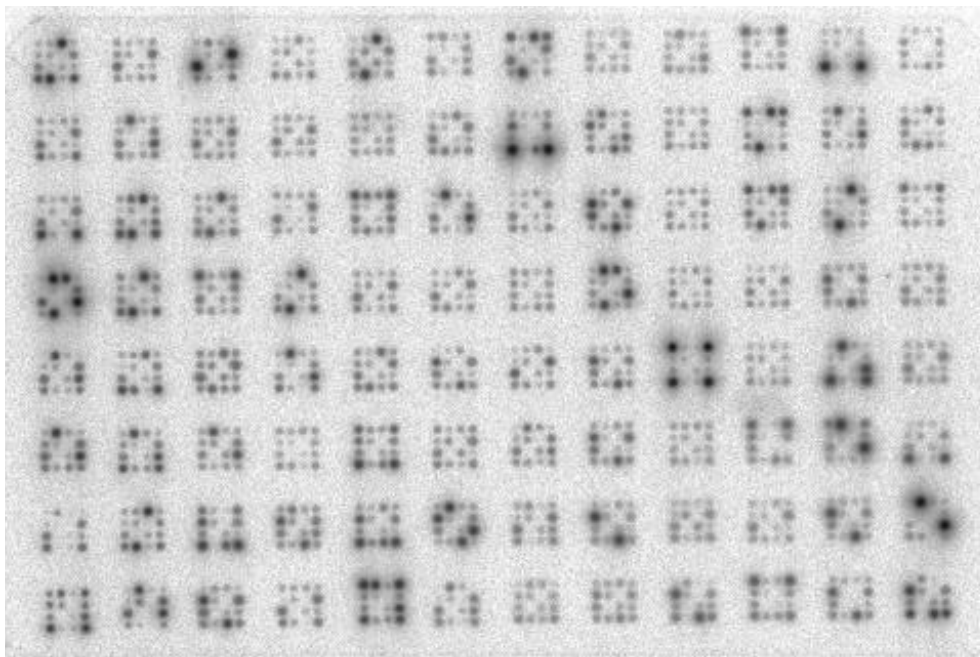
**Abbildung 3.1-2:** Plasmid-Inserts von *Acrosiphonia sp.* nach Amplifikation mittels PCR und elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,5 %igen Agarosegel.

Die amplifizierten cDNA-Moleküle wurden anschließend über Filterplatten aufgereinigt und unter Verwendung eines Spotters auf Nylonmembranen aufgebracht, mit UV-Licht fixiert und für die anschließende Hybridisierung vorbereitet.

Zur Hybridisierung dieser Makroarrays wurden PCR-Produkte der 2. PCR der *SSH* aus Vorwärts- und Rückwärtssubtraktion durch *random priming* mit dem radioaktiven Phosphor-Isotop  $\alpha^{33}\text{P}$  markiert, aufgereinigt und nach Bestimmung der Aktivität zum Hybridisierungspuffer gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C. Nach mehrmaligem Waschen der Membranen mit verschiedenen Puffern konnten die fertigen Makroarrays autoradiographisch ausgewertet werden.

Die Hybridisierung wurde für jede verwendete Sonde (aus Vorwärts- und Rückwärtssubtraktion der *SSH*) in drei unabhängigen Versuchen wiederholt, so dass sich zusammen mit der Wiederholung auf dem Makroarray für jeden Klon sechs Werte ergaben.

Abbildung 3.1-3 zeigt das Autoradiogramm eines mit radioaktiv markierter cDNA hybridisierten Makroarrays.



**Abbildung 3.1-3:** Beispielhafte Darstellung des Autoradiogramms einer Makroarray-Membran, das zur Analyse der subtrahierten Genbibliothek von *Acrosiphonia sp.* verwendet wurde. Die hier abgebildete Membran wurde mit cDNA hybridisiert, die mittels Rückwärtssubtraktion bei der *SSH* hergestellt und anschließend mit  $\alpha^{33}\text{P}$  markiert wurde.

Die Autoradiogramme wurden mittels Software (Array Vision 6.0) gegeneinander abgeglichen, um solche Spots identifizieren zu können, die auf einem der beiden zu vergleichenden Makroarrays stärker oder schwächer ausgeprägt sind und somit auf das Vorhandensein differentiell exprimierter Transkripte schließen lassen.

Teilweise waren die Unterschiede der Spot-Intensitäten bereits per Auge sichtbar. Obwohl aber die Auswertung der Makroarrays per Auge schon einen Hinweis auf das Vorhandensein von Unterschieden in der Intensität der zu vergleichenden Spots lieferte, kann nur die Software-Auswertung wirklich verlässliche Daten liefern, da hier eine Normalisierung der Spot-Intensitäten erfolgt und auch der Hintergrund in der Umgebung des jeweiligen Spots mit einberechnet wird.

Beim weiteren Vorgehen wurden nur solche Klone berücksichtigt, bei denen das Verhältnis der Intensitätsunterschiede der Spots zwischen Vorwärts- und Rückwärtssubtraktion im Mittel nach der Berechnung durch die Auswertungssoftware mindestens 1,5 oder weniger als 0,6 betrug.

Von den insgesamt 672 untersuchten Klonen erfüllten 104 dieses Kriterium. Die entsprechenden cDNA-Inserts dieser Klone wurden sequenziert und die erhaltenen Sequenzdaten mittels einer *BLAST*-Analyse auf Proteinebene (*blastx*) mit der Sequenzdatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) verglichen.

Dabei wurden für jede Sequenz die wahrscheinlichste Identität, der jeweilige Organismus und die zugehörigen e- und Score-Werte ermittelt. Die Ergebnisse dieser Analyse sowie die Länge der untersuchten Sequenzen und die mittels Makroarray-Analyse ermittelten Expressionswerte sind in Tabelle 3.1-1 zusammengefasst.

**Tabelle 3.1-1:** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der *BLAST*-Analyse (blastx) für die sequenzierten cDNA-Inserts der *SSH*-Genbibliothek für *Acrosiphonia sp.*. Angegeben sind die ermittelten wahrscheinlichsten Treffer mit den entsprechenden e- und Score-Werten sowie dem jeweiligen Organismus und der zugehörigen *NCBI*-Akkzessionsnummer. Ebenfalls mit aufgeführt sind die mittels Makroarray-Analyse bestimmten Expressionswerte (Mittelwerte aus 6 Einzelwerten von 3 unabhängigen Experimenten) und die jeweiligen Standardabweichungen. (SD = Standardabweichung; \*) = Anzahl der Klone pro Gen)

Gen	*)	Ind.-Faktor	SD	e-Wert	Organismus	Score-Wert	Klon-Länge (bp)	Akkzessions-Nummer (NCBI)
Chlorophyll-a/b-binding protein CP26	3	0,38	0,07	9e-10	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	65,1	150	BAB20613
Malate dehydrogenase, glyoxysomal precursor, putative	1	1,53	0,17	8e-52	<i>Oryza sativa</i>	206	643	ABA99938
Transketolase 1 (putative)	1	0,54	0,18	6e-04	<i>Oryza sativa</i>	45,8	122	XP_550612
UPL6; ubiquitin-protein ligase	1	2,06	0,20	4e-09	<i>Arabidopsis thaliana</i>	63,2	222	NP_188346
Eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit (putative)	1	1,57	0,17	7e-23	<i>Oryza sativa</i>	108	231	ABA99260
ribosomal protein S25	1	0,16	0,01	6e-04	<i>Lycopersicon esculentum</i>	45,8	223	CAA54132
ribosomal protein S18	1	0,25	0,06	3e-08	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	60,1	171	CAA58668

Auffällig ist die geringe Anzahl von Sequenzen, denen eine mögliche Genfunktion zugeordnet werden konnte. Nur 9 der 104 Sequenzen konnten mittels *BLAST*-Analyse identifiziert werden.

Da die Wahrscheinlichkeit der erfolgreichen Identifizierung einer Sequenz mit zunehmender Länge steigt, wurde eine weitere, gröbenselektionierte Genbibliothek für *Acrosiphonia sp.* hergestellt. Dies sollte eine Anreicherung größerer Transkripte und damit zu einer besseren Identifizierung der erhaltenen Sequenzen führen.

Ein wesentlicher Grund für die geringe Länge der mittels *SSH* erhaltenen cDNAs ist der Restriktionsverdau mit *RsaI*, der bei dieser Methode zur Erzeugung glatter Enden bei den für die Ligation verschiedener Adaptoren vorgesehenen cDNA-Moleküle angewendet wurde.

Um dieses Problem zu umgehen, musste also eine andere Methode zur Herstellung einer Genbibliothek angewendet werden.

Da aus den verwendeten Algen in der Regel nur relativ geringe Mengen an RNA gewonnen werden können, bot sich die Verwendung der *SMART*-Methode (Clontech) an, bei der die aus

einer geringen Menge an RNA generierte cDNA mittels PCR angereichert werden kann und somit genügend Material für die anschließende Klonierung liefert. Ein Nachteil ist allerdings, dass hierbei keine Anreicherung differentiell exprimierter Transkripte stattfindet. Zur Herstellung und Amplifikation von cDNA wurde RNA aus Algen eingesetzt, die für 12 Stunden künstlicher UV-Strahlung ausgesetzt war.

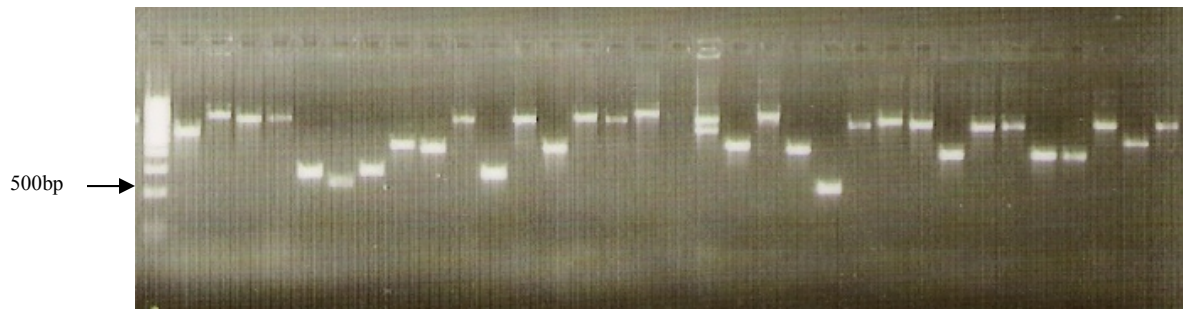
Die so hergestellte cDNA wurde vor der Ligation in Vektor-Moleküle einer Größenselektion unterzogen. Dazu wurde die cDNA elektrophoretische in einem Agarosegel aufgetrennt, der gewünschte Größenbereich (500 – 1500 bp) aus dem Gel ausgeschnitten und die cDNA schließlich von der Gelmatrix abgetrennt.

In Abbildung 3.1-4 ist das Ergebnis dieser Größenselektion zu sehen.



**Abbildung 3.1-4:** Gelelektrophoretische Analyse (1,5 % Agarose) der größenselektionierten cDNA-Fragmente von *Acrosiphonia sp.*, die zuvor mittels *SMART*-Methode amplifiziert wurden. In Spur 1 ist der Größenbereich von etwa 600 bis 1000 bp, in Spur 2 der Bereich von 1000 bis 1500 bp zu erkennen.

Die cDNA wurde wie oben beschrieben kloniert, vermehrt und anschließend mittels PCR analysiert. Die PCR-Produkte einer Mikrotiterplatte sind in Abbildung 3.1-5 gezeigt. Man erkennt, dass ein Großteil der hier gezeigten cDNA-Fragmente deutlich länger als 500 bp ist.



**Abbildung 3.1-5:** Plasmid-Inserts der gröÙenselektionierten Genbibliothek von *Acrosiphonia sp.* nach Amplifikation mittels PCR und elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,5 %igen Agarosegel.

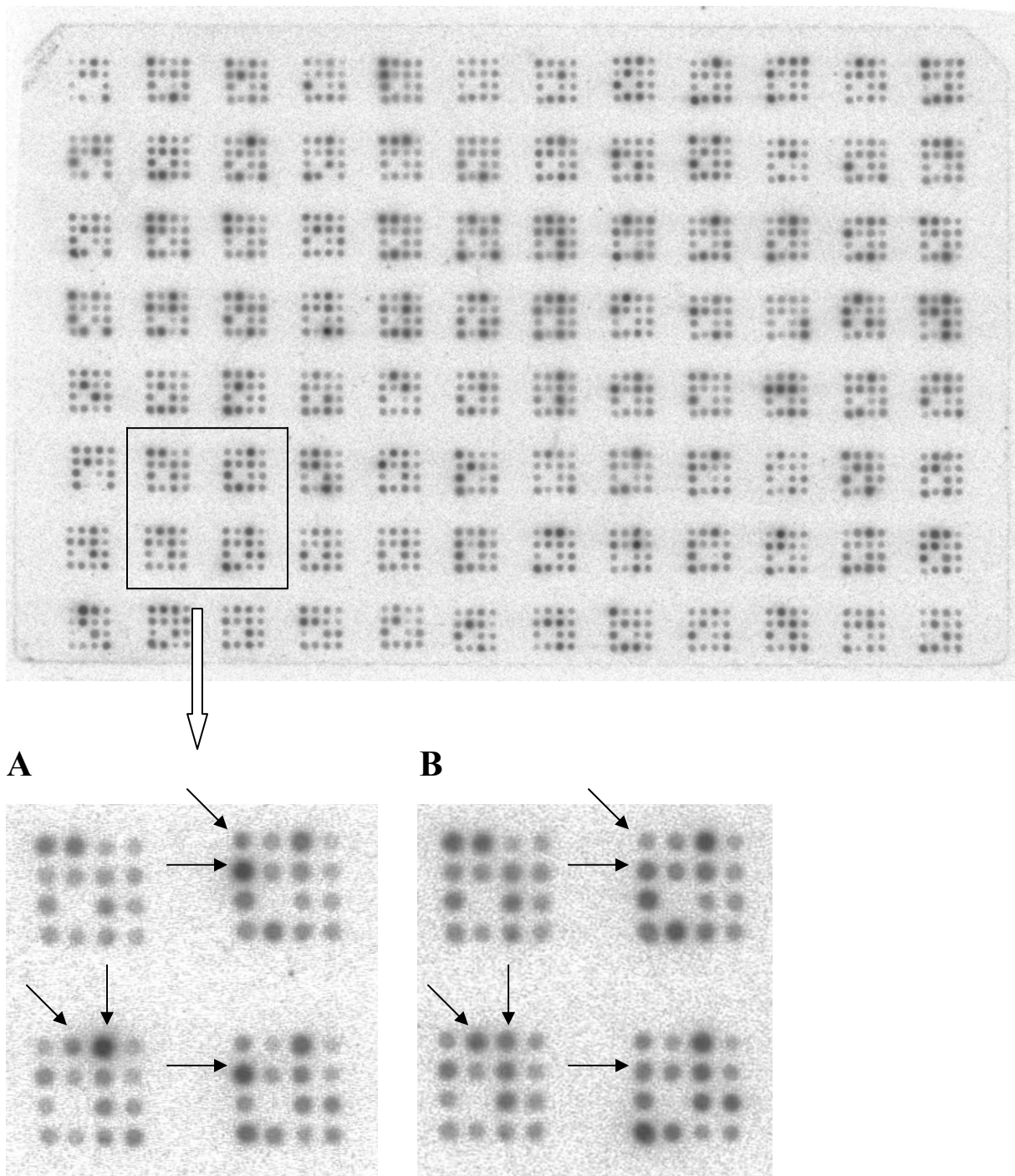
Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie oben für die *SSH* beschrieben. Von der gröÙenselektionierten Genbank wurden 1440 Bakterienklone ausgewählt und zur Herstellung von Makroarray-Membranen verwendet.

Diese wurden mit cDNA hybridisiert, die direkt aus der RNA von unterschiedlich lange UV-exponierten (4, 12 und 24 Stunden) Versuchspflanzen synthetisiert wurde.

Zudem wurden die Makroarray-Membranen mit den bereits beschriebenen vorwärts- und rückwärtssubtrahierten Sonden aus der *SSH* hybridisiert.

Die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse erfolgte wie oben für die *SSH*-Analyse angegeben. Für jede Bestrahlungsbedingung und je vorwärts- oder rückwärtssubtrahiertes Sondenmaterial der *SSH* wurden drei unabhängige Hybridisierungsversuche durchgeführt. Die zur Verwendung kommende RNA bzw. cDNA stammte dabei jeweils aus unabhängigen Extraktionen oder PCR-Ansätzen und setzte sich in allen Fällen aus mehreren Parallelansätzen zusammen, die vor der cDNA-Synthese bzw. nach der PCR-Reaktion vereinigt wurden.

Abbildung 3.1-6 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Hybridisierung einer Makroarray-Membran mit cDNA, die aus der RNA von 12 Stunden bestrahlten Individuen extrahiert wurde. Der vergrößert dargestellte Bereich der Makroarray-Membran zeigt zudem vergleichend die Hybridisierung mit cDNA von bestrahlten Algen und den entsprechenden unbestrahlten Kontrollpflanzen.



**Abbildung 3.1-6:** Beispielhafte Darstellung des Autoradiogramms einer Makroarray-Membran, das zur Analyse der gröÙenselektionierten Genbibliothek von *Acrosiphonia sp.* verwendet wurde. Die hier abgebildete Membran wurde mit cDNA hybridisiert, die zuvor aus der RNA von 12 Stunden UV-exponierten Algen synthetisiert und anschließend mit dem  $\alpha^{33}\text{P}$  wurde markiert wurde. Zur Veranschaulichung unterschiedlicher Spot-Intensitäten ist ein Ausschnitt der Membran vergrößert dargestellt (A) und demselben Ausschnitt einer Membran gegenübergestellt, die zuvor mit cDNA von Kontrollpflanzen hybridisiert wurde (B).



Von den insgesamt 1440 Klonen, die bei der Herstellung der Makroarrays zur Verwendung kamen, wurden 288 Klone ausgewählt, deren korrespondierende Spots auf den Makroarray-Membranen Intensitätsunterschiede aufwiesen.

Die Plasmid-Inserts dieser Bakterienklone wurden sequenziert und anschließend einer *BLAST*-Analyse unterzogen. Auf diese Weise konnten 114 der klonierten Genfragmente eine Identität zugeordnet werden. Diese sind in Tabelle 3.1-2 zusammengefasst. Die entsprechenden mittels Makroarray-Analyse ermittelten Expressionswerte sind, sofern sie statistisch relevant sind, weiter unten in gesonderten Tabellen aufgeführt.

**Tabelle 3.1-2:** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der *BLAST*-Analyse (blastx) für die sequenzierten cDNA-Inserts der gröbenselektionierten Genbibliothek für *Acrosiphonia sp.*. Angegeben sind die ermittelten wahrscheinlichsten Treffer mit den entsprechenden e- und Score-Werten sowie dem jeweiligen Organismus (mit grün sind Vertreter der *Chlorophyta* gekennzeichnet) und der zugehörigen *NCBI*-Akkzessionsnummer.

PHOTOSYNTHESE							
Gen	Anzahl Klone pro Gen	e-Wert	Organismus	Score-Wert	Klon-Länge (bp)	Akkzessions-Nummer (NCBI)	Klon-Nr.
chlorophyll a/b binding protein	6	4e-87	<i>Tetraselmis sp.</i>	323	763	AAB70556	A2385-G07
chlorophyll a/b binding protein	5	1e-90	<i>Acetabularia acetabulum</i>	335	902	AAC79711	A-E09
chlorophyll a/b binding protein	1	6e-87	<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	323	821	CAA74179	A-D08
light-harvesting chlorophyll-a/b binding protein LhcII-1.3	2	1e-49	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	197	561	BAB64416.1	A2385-C12
chloroplast light harvesting complex I protein	1	1e-29	<i>Chlamydomonas. incerta</i>	132	720	ABA01130	A2587-B04
major light-harvesting complex II protein m1	1	7e-57	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	221	564	AAM18057	A2385-B10
major light-harvesting complex II protein m10	1	1e-78	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	273	693	AAL88456	A-A05
photosystem I subunit XI	1	2e-07	<i>Nicotiana attenuata</i>	57	426	AAO85557	A-F08
Photosystem I reaction center subunit X, chloroplast precursor (PSI-K)	1	7e-25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	110	545	gi:21555328	A2385-H05
core subunit of photosystem II precursor (psbW)	1	4e-11	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	69,3	496	gi:5739404	A2385-D04
early light-inducible protein ELIP	1	0,1	<i>Zea mays</i>	40	826	AAK52823	A-H02
chloroplast putative 16 kDa membrane protein	1	8e-35	<i>Chlamydomonas. incerta</i>	148	425	ABA01097	A2587-B01
chloroplast w6 desaturase	1	5e-18	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	92	364	BAA23881	A-F03
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	3e-17	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	89,4	406	gi:1181548	A-C03

STRESS & ABWEHR							
Gen	Anzahl Klone pro Gen	e-Wert	Organismus	Score-Wert	Klon-Länge (bp)	Akkzessions-Nummer (NCBI)	Klon-Nr.
HSP17.7-a protein	1	1e-12	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	74,7	512	CAB93512	A2588-A01
small heat shock protein	1	2e-04	<i>Prunus persica</i>	48,9	889	AAR99375	A-C07
Glutathione S-transferase, N-terminal	1	4e-15	<i>Rhodofera ferrireducens</i>	84,7	828	ZP_00691142	A-C10
glutaredoxin	1	2e-19	<i>Tilia platyphyllos</i>	96,7	368	AAL04507	A-F04
Cyclophilin	1	3e-29	<i>Vaucheria litorea</i>	129	325	AAK21908	A2587-H09
endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 (ERO1) family protein	1	1e-24	<i>Arabidopsis thaliana</i>	114	535	gi:42571127	A2385-B03
putative flavonol 3-O-glucosyltransferase	1	8e-32	<i>Arabidopsis thaliana</i>	137	417	AAO63909	A-B12
S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	1	1e-55	<i>Arabidopsis thaliana</i>	219	710	NP_181920	A2588-C05
putative methyltransferase	1	2e-24	<i>Streptomyces coelicolor</i>	155	871	gi:6491814	A2385-C07
REGULATION & PROTEINABBAU							
Gen	Anzahl Klone pro Gen	e-Wert	Organismus	Score-Wert	Klon-Länge (bp)	Akkzessions-Nummer (NCBI)	Klon-Nr.
eukaryotic initiation factor 5A (2)	3	8e-44	<i>Nicotiana glauca</i>	179	775	CAA45104	A2587-A11
eukaryotic initiation factor 5A	1	2e-35	<i>Aspergillus fumigatus</i>	111	665	XP_750156	A2587-A10
initiation factor 5A-3 (eIF-5A 3)	1	9e-46	<i>Arabidopsis thaliana</i>	186	800	AAM64601	A-C06
transcription factor homolog BTF3-like protein	1	2e-26	<i>Arabidopsis thaliana</i>	122	752	CAE45592	A2587-E09
Ser/Thr protein kinase isolog	2	7e-68	<i>Arabidopsis thaliana</i>	258	633	BAD94000	A-H12
putative protein has homology to G protein beta subunit	1	2e-78	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	294	683	CAA37638	A2587-E07
DEAD box RNA helicase	1	1e-35	<i>Pisum sativum</i>	150	423	AAN74636	A-B04
Bax inhibitor-1 like protein	1	4e-24	<i>Arabidopsis thaliana</i>	112	543	AAM65074	A-D12
Gbp1p protein	2	2e-37	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	159	920	gi:1076208	A2385-H10
AR781, similar to yeast pheromone receptor	1	4e-27	<i>Arabidopsis thaliana</i>	123	697	AAM64840	A-F12
ASN1 (DARK INDUCIBLE 6)	2	7e-52	<i>Arabidopsis thaliana</i>	206	705	NP_190318	A2588-F09
DIN2 (DARK INDUCIBLE 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosy compounds	1	2e-26	<i>Arabidopsis thaliana</i>	120	463	NP_191573	A2588-D05
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 3	1	1e-04	<i>Oryza sativa</i>	47,0	407	AAP55198	A-F03
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	2	1e-42	<i>Guillardia theta</i>	175	667	NP_113273	A2587-G07
OTU-like cysteine protease-like	1	5e-18	<i>Oryza sativa</i>	94,4	778	BAD45450	A2587-C02
ubiquitinating enzyme	1	2e-33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	145	842	AAV44872	A-B08

20S proteasome subunit C8 (PAG1/PRC8_ARATH)	1	7e-56	<i>Arabidopsis thaliana</i>	219	867	AAM66932	A-C06
20S proteasome subunit alpha 3	1	4e-52	<i>Lolium perenne</i>	207	679	AAK53380	A2588-D03
putative 26S proteasome regulatory subunit	1	1e-34	<i>Arabidopsis thaliana</i>	149	726	AAM13367	A2587-B10
STOFFWECHSEL & WEITERE ZELLULÄRE PROZESSE							
Gen	Anzahl Klone pro Gen	e-Wert	Organismus	Score-Wert	Klon-Länge (bp)	Akkzessions-Nummer (NCBI)	Klon-Nr.
NADH-ubiquinone oxidoreductase 12 kDa subunit, putative	1	8e-06	<i>Aspergillus fumigatus</i>	53,1	720	EAL93785	A-D05
NADH-ubiquinone oxidoreductase 30.4 kDa subunit, putative	1	2e-28	<i>Cryptococcus neoformans</i>	127	411	AAW44102	A2588-F11
vacuolar membrane ATPase subunit G (AVMA10)	1	1e-12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	75,1	560	AAF24609	A-A09
high-affinity K <sup>+</sup> transporter	1	8e-24	<i>Capsicum annuum</i>	111	424	AAT58045	A-H11
high affinity nitrate transporter	1	8e-13	<i>Dunaliella salina</i>	74,4		AAU87579	
oxoglutarate/malate translocator-like protein	1	2e-32	<i>Arabidopsis thaliana</i>	141	800	AAM63113	A-F02
putative amino acid transport protein	1	4e-21	<i>Arabidopsis thaliana</i>	102	397	AAM65327	A2588-A07
putative 16kDa membrane protein	1	4e-20	<i>Nicotiana tabacum</i>	100	619	gi:6996562	A2385-F04
Fructose-bisphosphate aldolase class-I	1	5-102	<i>Oryza sativa</i>	372	922	gi:62732953	A2385-D11
phosphoglycerate dehydrogenase, putative	1	3-26	<i>Arabidopsis thaliana</i>	72,8	640	AAG51802	A2587-C03
N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	1	6e-69	<i>Arabidopsis thaliana</i>	233	758	NP_849993	A2587-E01
aldose 1-epimerase-like protein	1	1e-09	<i>Arabidopsis thaliana</i>	63,9		BAB02717	A-H12
ATP sulfurylase	1	3e-80	<i>Brassica juncea</i>	300	800	CAA11416	A-G12
gamma-glutamylcysteine synthetase	1	3e-25	<i>Oryza sativa</i>	117	630	gi:50936911	A2385-F08
stearoyl-acyl carrier protein desaturase	1	2e-44	<i>Sesamum indicum</i>	181	744	BAA07681	A-D01
40S ribosomal protein S2	4	6e-96	<i>Arabidopsis thaliana</i>	353	842	AAM62944	A2385-E08
40S ribosomal protein S3	1	6e-17	<i>Chlamydomonas incerta</i>	89,0	356	ABA01099	A2587-H06
40S ribosomal protein S3a	1	7e-73	<i>Catharanthus roseus</i>	276	735	P33444	A-H07
40S ribosomal protein S8	2	2e-63	<i>Oryza sativa</i>	244	723	P49199	A2385-G09
40S ribosomal protein S11	1	7e-54	<i>Euphorbia esula</i>	212	569	AAF34771	A-C09
40S ribosomal protein S15	1	3e-50	<i>Chlamydomonas incerta</i>	200	551	ABA01098	A2587-F05
40S ribosomal protein S23	1	3e-62	<i>Oryza sativa</i>	239	515	XP_470118	A-H02
40S ribosomal protein S30-like	3	4e-16	<i>Oryza sativa</i>	86,3	478	BAD72277	A2385-D05

putative 40S ribosomal protein S8	1	2e-46	<i>Oryza sativa</i>	172	534	XP_465742	A2587-A12
60S ribosomal protein L4	2	2e-56	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	221	727	BAA78600	A-E08
60S ribosomal protein L4-B (L1)	3	4e-48	<i>Arabidopsis thaliana</i>	194	723	AAM65510	A2588-E01
60S ribosomal protein L24 (L30)	1	5e-36	<i>Cryptococcus neoformans</i>	152	516	AAW44673	A-A12
60S acidic ribosomal protein P0	1	6e-48	<i>Zea mays</i>	193	850	CAA69256	A-H01
50S ribosomal protein L13, chloroplast precursor (CL13)	1	2e-43	<i>Spinacia oleracea</i>	177	598	P12629	A-A07
ribosomal protein S6 RPS6-1	5	1e-49	<i>Zea mays</i>	198	682	AAB51304	A-G04
putative ribosomal protein L13	2	5e-44	<i>Oryza sativa</i>	180	705	NP_916108	A2587-D10
ribosomal protein S15	3	2e-49	<i>Oryza sativa</i>	197	550	XP_477089	A2385-A08
ribosomal protein S16	1	4e-14	<i>Solanum tuberosum</i>	81,3	773	YP_635621	A2587-C10
ribosomal protein L27a	1	2e-50	<i>Petunia x hybrida</i>	201	658	AAD13388	A2385-B07
ribosomal protein L30	1	7e-36	<i>Lupinus luteus</i>	152	529	CAA11256	A2385-A03
ribosomal protein, putative	1	1e-55	<i>Arabidopsis thaliana</i>	218	627	AAM64753	A2588-F03
41 kDa ribosome-associated protein precursor	1	8e-23	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	108	534	AAO22241	A-H03
Unknown protein	1	5e-19	<i>Oryza sativa</i>	97,4	704	BAD37430	A2587-H05
unknown protein	1	1e-20	<i>Oryza sativa</i>	102	774	XP_482538	A2587-G11
hypothetical protein	1	7e-66	<i>Arabidopsis thaliana</i>	252	640	AAG50659	A2588-H11
hypothetical protein	1	9e-10	<i>Neurospora crassa</i>	65,9	582	XP_962513	A2385-B05
Hypothetical protein	1	1e-14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	82,8	756	CAB81420	A2587-F06

Im Folgenden soll auf die identifizierten Transkripte bzw. deren Proteinprodukte näher eingegangen werden. Diese lassen sich in mehrere funktionelle Gruppen einteilen, die auch getrennt besprochen werden. In der folgenden genaueren Beschreibung der Genprodukte werden die bei den Makroarray-Experimenten ermittelten Induktions- bzw. Reprimierungsfaktoren in tabellarischer Form mit angegeben. Dabei sind die Ergebnisse der Hybridisierung mit cDNA von unterschiedlich lange exponierten Versuchspflanzen (4, 12 und 24 Stunden) sowie mit den Sonden aus Vorwärts- und Rückwärtssubtraktion der *SSH* getrennt dargestellt. Die Werte wurden aus den Ergebnissen von jeweils drei unabhängigen

Makroarray-Experimenten berechnet, wobei in Klammern die entsprechende Standardabweichung mit angegeben ist.

### ***1. Photosynthese-Gene***

Die Photosynthese-Apparate von Pflanzen stellen als lichtabhängige Systeme zur Energiegewinnung ein besonders wichtiges Angriffsziel der UV-Strahlung dar. Bei *Acrosiphonia sp.* konnten einige mit der Photosynthese assoziierte Gene als UV-reguliert identifiziert werden. Die **Chlorophyll-a/b-Bindeproteine (cab)** sind wichtige Komponenten der Lichtsammelkomplexe (LHCs) und zusammen mit den gebundenen Chlorophyll-Molekülen für das Sammeln und Weiterleiten der Lichtenergie zu den Reaktionszentren der Photosyntheseapparate verantwortlich. Zur selben Genfamilie gehört das kleinere **CP26**, das aber geringere Konzentrationen an Pigment bindet und somit vermutlich keine Lichtsammelfunktion besitzt. Es spielt mutmaßlich eine Rolle bei der Energieverteilung und der Photoprotektion im Photosyntheseapparat. (Escoubas et al. 1995; Minagawa et al. 2001) Auch die **Early-Light-Inducible-Proteine (ELIPs)** werden der Gruppe der Chlorophyll-a/b-Bindeproteine zugerechnet. Diese nukleär codierten Proteine sind in der Thylakoid-Membran lokalisiert und stehen in Wechselwirkung mit Komponenten des PSII, v.a. mit dem D1-Protein. Sie sind vermutlich auch an der Entwicklung des Chloroplasten beteiligt. (Adamska et al. 1992; Montané et al. 1997) Die **Photosystem I Untereinheit XI** und das **Major light-harvesting complex II Protein m1** stellen weitere Komponenten der Photosyntheseapparate dar (Jensen et al. 2000)

Am Prozess der CO<sub>2</sub>-Fixierung über den Calvin-Zyklus in der Dunkelreaktion der Photosynthese ist die **Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)** beteiligt. Sie katalysiert die Bildung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat aus 1,3-Diphosphoglycerat (Michal 1999).

An der Veränderung der Fettsäure-Zusammensetzung von Membranen des Chloroplasten ist die **Chloroplast  $\omega$ -Desaturase** beteiligt. Sie führt Doppelbindungen in Fettsäuremoleküle ein (Rikin et al. 1993).

**Tabelle 3.1-3:** Zusammenfassende Darstellung der mittels Makroarray-Analyse ermittelten Expressionswerte für Photosynthese-assoziierte Gene von *Acrosiphonia sp.* unter Verwendung der cDNA von unterschiedlich lange exponierten Versuchspflanzen (4, 12 und 24 Stunden) bzw. den Sonden aus Vorwärts- und Rückwärtssubtraktion der *SSH*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sowie in Klammern die jeweiligen Standardabweichungen. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen den Expressionsstatus des jeweiligen Gens zum untersuchten Zeitpunkt (grün = reprimiert, gelb = keine Induktion oder Repression, rot = induziert; n.D. = kein(e) Messwert(e) vorhanden).

GEN	4h	12h	24h
Chlorophyll a/b binding protein	<b>0,51</b> (+/-0,15)	<b>0,98</b> (+/-0,25)	<b>14,38</b> (+/-0,52)
Chloroplast light harvesting complex I protein	<b>0,84</b> (+/-0,01)	<b>0,90</b> (+/-0,21)	<b>20,25</b> (+/-9,58)
Major light-harvesting complex II protein m1	<b>0,68</b> (+/-0,13)	<b>1,06</b> (+/-0,33)	<b>15,26</b> (+/-5,59)
Photosystem I subunit XI	<b>0,99</b> (+/-0,38)	<b>1,18</b> (+/-0,16)	<b>1,96</b> (+/-0,16)
Early-light-inducible-Protein (ELIP)	<b>0,56</b> (+/-0,23)	<b>0,55</b> (+/-0,36)	n.D.
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<b>1,08</b> (+/-0,14)	<b>1,73</b> (+/-0,34)	<b>2,59</b> (+/-1,08)
Chloroplast 16 kDa membrane protein (putative)	<b>0,91</b> (+/-0,13)	<b>1,26</b> (+/-0,24)	<b>2,22</b> (+/-0,34)

GEN	<i>SSH</i>
Chlorophyll a/b binding protein CP26	<b>0,38</b> (+/-0,07)
Chloroplast ω-desaturase	<b>5,14</b> (+/-0,39)

## 2. Stress, Abwehr und Entgiftung

Aus der Gruppe der **Hitzeschockproteine** konnten bei *Acrosiphonia sp.* zwei Vertreter als differentiell exprimiert identifiziert werden. In einer ATP-abhängigen Reaktion helfen diese Hitzeschockproteine anderen Proteinen, sich in ihre native Konformation zu falten. Die kleineren HSPs können diese Funktion vermutlich nicht direkt übernehmen, sondern halten die betroffenen Proteine solange in einer offenen Position, bis ein größeres HSP die korrekte Faltung übernimmt (Michal 1999; Schroda et al. 1999; Löw et al. 2000; Lewis et al. 2001). Auch das **Cyclophilin** ist über seine Peptidyl-Prolyl-Cis-Trans-Isomerase-Funktion unter anderem an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt (Somanchi und Moroney 1999).

Die **Glutathion-S-Transferase** übernimmt über die Konjugation verschiedener Zielmoleküle mit Glutathion verschiedene antioxidative und detoxifizierende Aufgaben in der Zelle. Weiterhin sind Glutathion-S-Transferasen auch an der Strukturbildung von Proteinen und Entwicklungs- bzw. Alterungsprozessen beteiligt (Hayes und Strange 1995; Wagner et al. 2002). Die **S-adenosylmethionin-abhängige Methyl-Transferase 1** ist über die Methylierung von Zielmolekülen ebenfalls an der Detoxifizierung in der Zelle beteiligt. Bei Gewebeschädigungen kann sie über die Methylierung von Glucosinolaten zur Bildung von Thiocyanaten oder organischen Thiolen beitragen, die als Frass-Schutz wirken können. (Attieh et al. 2002)

Das **Glutaredoxin** ist an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt. Unter anderem wirkt es vermutlich als Sensor des Redoxstatus bei oxidativem Stress und moduliert darüber hinaus verschiedene Enzymaktivitäten (Song et al. 2002).

Das Enzym **Stearoyl-acyl carrier protein Desaturase** spielt über das Einführen von Doppelbindungen eine Rolle bei der Entsättigung von Fettsäuremolekülen und kann so zu einer Veränderung der Fettsäurezusammensetzung in verschiedenen Membransystemen beitragen (Kachroo et al. 2005).

An der Biosynthese von Flavonoiden ist die **Flavonol-3-O-Glucosyltransferase** beteiligt. Sie katalysiert die Reaktion von Flavonolen mit UDP-Glucose zu Flavonol 3-O-D-glucosiden und ist somit am Flavonoid-Stoffwechsel beteiligt. (Ford et al. 1998)

**Tabelle 3.1-4:** Zusammenfassende Darstellung der mittels Makroarray-Analyse ermittelten Expressionswerte für Stress-assoziierte Gene von *Acrosiphonia sp.* unter Verwendung der cDNA von unterschiedlich lange exponierten Versuchspflanzen (4, 12 und 24 Stunden) bzw. den Sonden aus Vorwärts- und Rückwärtssubtraktion der *SSH*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sowie in Klammern die jeweiligen Standardabweichungen. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen den Expressionsstaus des jeweiligen Gens zum untersuchten Zeitpunkt (grün = reprimiert, gelb = keine Induktion oder Repression, rot = induziert; n.D. = kein(e) Messwert(e) vorhanden).

GEN	4h	12h	24h
HSP17.7-a protein	1,67 (+/-0,29)	0,57 (+/-0,23)	n.D.
Small heat shock protein	0,47 (+/-0,23)	0,41 (+/-0,14)	0,14 (+/-0,02)
Glutathione S-transferase, N-terminal	0,90 (+/-0,11)	0,52 (+/-0,22)	n.D.
S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	0,44 (+/-0,36)	0,77 (+/-0,52)	1,65 (+/-0,28)
Methyltransferase (putative)	1,08 (+/-0,07)	1,32 (+/-0,15)	0,87 (+/-0,10)
Glutaredoxin	0,93 (+/-0,22)	0,99 (+/-0,30)	0,66 (+/-0,19)
Stearoyl-acyl carrier protein desaturase	1,22 (+/-0,27)	1,24 (+/-0,09)	0,87 (+/-0,19)
Flavonol 3-O-glucosyltransferase (putative)	0,92 (+/-0,51)	0,70 (+/-0,12)	2,28 (+/-0,95)

GEN	<i>SSH</i>
Cyclophilin	0,40 (+/-0,05)



### 3. Regulationsprozesse

Bei *Acrosiphonia sp.* konnten verschiedene regulatorische Proteine gefunden werden, die an unterschiedlichen Prozessen im Zellgeschehen beteiligt sind. Die **Transkriptionsfaktoren eIF-5A** und das **BTF3-ähnliche Protein** sind an der Regulation der Transkription verschiedener Gene beteiligt und können so die Genexpression modulieren. (Hu und Ronne 1994; Valentini 2002) Ebenfalls beteiligt an der Regulation der Genexpression ist der **Translations-Initiationsfaktor eIF-2 $\gamma$** , dieser aber auf Ebene der Translation der Nukleinsäure in die entsprechende Aminosäure-Sequenz (Michal 1999).

GTP-bindende-Proteine, sogenannte **G-Proteine**, sind als Mediatoren an verschiedenen Signalkaskaden beteiligt, die in der Regel ebenfalls der Regulation der Genexpression dienen. Am Anfang von Signaltransduktionswegen stehen häufig **Serin/Threonin-Protein-Kinasen**. Diese können über die Phosphorylierung von Aminosäureresten eine Phosphorylierungskaskade auslösen, die letztendlich zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren führt und somit wieder eine Modulation der Genexpression zur Folge haben kann. (Michal 1999; Bischoff et al. 1999) Das **G-Strang bindende Protein (Gbp1)** bindet den G-Strang von Telomeren und kann darüber hinaus vermutlich spezifisch Interaktionen mit bestimmten RNA-Molekülen eingehen (Johnstone et al. 1999). Der **Bax-Inhibitor** kann dem durch die Bildung von Bax-Proteinen vermittelten programmierten Zelltod (Apoptose) entgegenwirken und somit das Absterben der betroffenen Zelle verhindern (Kawai-Yamada et al. 2001)

**DEAD-box-RNA-Helicasen** sind an der Entwindung von Sekundärstrukturen in RNA-Molekülen beteiligt und können dadurch die Translation der betreffenden mRNA beeinflussen (Okanami et al. 1998; Kujat und Owttrim 2000; Gong et al. 2005).

**Tabelle 3.1-5:** Zusammenfassende Darstellung der mittels Makroarray-Analyse ermittelten Expressionswerte für Regulations-assoziierte Gene von *Acrosiphonia sp.* unter Verwendung der cDNA von unterschiedlich lange exponierten Versuchspflanzen (4, 12 und 24 Stunden) bzw. den Sonden aus Vorwärts- und Rückwärtssubtraktion der *SSH*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sowie in Klammern die jeweiligen Standardabweichungen. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen den Expressionsstaus des jeweiligen Gens zum untersuchten Zeitpunkt (grün = reprimiert, gelb = keine Induktion oder Repression, rot = induziert).

GEN	4h	12h	24h
Eukaryotic initiation factor 5A	<b>1,12</b> (+/-0,06)	<b>0,84</b> (+/-0,32)	<b>0,64</b> (+/-0,11)
Ser/Thr protein kinase isolog	<b>0,98</b> (+/-0,27)	<b>1,04</b> (+/- 0,42)	<b>0,80</b> (+/- 0,15)

GEN	<i>SSH</i>
Eukaryotic initiation factor 5A	<b>0,52</b> (+/-0,18)
Eukaryotic initiation factor 5A	<b>0,53</b> (+/-0,04)
Eukaryotic translation initiation factor 2 $\gamma$ subunit, (putative)	<b>1,57</b> (+/-0,17)
Transcription factor homolog BTF3-like protein	<b>0,52</b> (+/-0,44)
Protein has homology to G protein beta subunit (putative)	<b>2,01</b> (+/-0,14)
G-strand binding protein (Gbp1)	<b>108</b> (+/-31,0)
Bax inhibitor-1 like protein	<b>2,76</b> (+/-0,76)
DEAD box RNA helicase	<b>8,15</b> (+/-0,95)

#### 4. Proteinabbau

Beim Abbau geschädigter oder inaktiver Proteine spielt die **ATP-abhängige Clp-Protease** eine wichtige Rolle. Sie ist darüber hinaus auch für den Umsatz regulatorischer Proteine wichtig. Es konnte sowohl eine proteolytische als auch eine regulatorische Untereinheit dieses Enzyms identifiziert werden. (Porankiewicz et al. 1998 ; Chandu und Nandi 2004) Ebenfalls am Protein-Abbau beteiligt ist das aus mehreren Untereinheiten aufgebaute Proteasom, das geschädigte und kurzlebige Peptide oder Proteine abbaut. Das eukaryotische **26S-Proteasom**

besteht aus zwei Teilen, dem **20S-Proteasom** und dem 19/22S-Regulator, die ihrerseits wiederum aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind. Bei *Acrosiphonia sp.* konnten zwei Untereinheiten der 20S-Proteasom-Teils und eine regulatorische Untereinheit identifiziert werden. Vom Proteasom werden in erster Linie Proteine abgebaut, die durch das Anfügen von Ubiquitin-Resten entsprechend markiert wurden. Dieser Prozess wird von der **Ubiquitin-Protein-Ligase** katalysiert, während die **OTU-ähnliche Cystein-Protease** Ubiquitin-Reste von Proteinen wieder entfernen kann. Sie wird deshalb auch als Deubiquitylierendes Enzym (DUB) bezeichnet. (Hellmann und Estelle 2002; Balakirev et al. 2003; Schwechheimer und Calderon Villalobos 2004).

**Tabelle 3.1-6:** Zusammenfassende Darstellung der mittels Makroarray-Analyse ermittelten Expressionswerte für Proteinabbau-assoziierte Gene von *Acrosiphonia sp.* unter Verwendung der cDNA von unterschiedlich lange exponierten Versuchspflanzen (4, 12 und 24 Stunden) bzw. den Sonden aus Vorwärts- und Rückwärtssubtraktion der *SSH*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sowie in Klammern die jeweiligen Standardabweichungen. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen den Expressionsstaus des jeweiligen Gens zum untersuchten Zeitpunkt (grün = reprimiert, gelb = keine Induktion oder Repression, rot = induziert).

GEN	4h	12h	24h
ATP-dependent Clp protease (proteolytic subunit)	<b>0,90</b> (+/-0,34)	<b>0,73</b> (+/-0,19)	<b>0,46</b> (+/-0,09)
20S proteasome subunit C8	<b>1,24</b> (+/-0,19)	<b>0,81</b> (+/-0,14)	<b>0,57</b> (+/-0,11)
20S proteasome subunit alpha 3	<b>1,61</b> (+/-0,38)	<b>1,02</b> (+/- 0,32)	<b>0,16</b> (+/- 0,16)
26S proteasome regulatory subunit (putative)	<b>1,13</b> (+/-0,16)	<b>1,13</b> (+/-0,13)	<b>0,55</b> (+/-0,15)
OTU-like cysteine protease-like	<b>1,04</b> (+/-0,14)	<b>1,16</b> (+/-0,17)	<b>0,56</b> (+/-0,14)

GEN	<i>SSH</i>
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 3	<b>4,42</b> (+/-1,34)
UPL6; ubiquitin-protein ligase	<b>2,06</b> (+/-0,20)

### 5. Stoffwechsel und weitere zelluläre Prozesse

Aus dem Bereich des Stoffwechsels konnten bei *Acrosiphonia sp.* verschiedene Enzyme der Aminosäure-Biosynthese identifiziert werden. Dazu zählen die **Asparagin-Synthetase** und die **N-acetyl- $\gamma$ -glutamyl-P-Reduktase**, die an der Synthese von Asparagin bzw. Ornithin beteiligt sind. Die **Phosphoglycerat-Dehydrogenase** spielt durch die Katalyse der Reaktion von 3-P-Glycerat zu 3-P-Hydroxypyruvat beim Serin-Stoffwechsel eine Rolle. Für den Transport von Aminosäuren über Membranen hinweg ist das **Aminosäure-Transportprotein** wichtig. (Michal 1999; Ho und Saito 2001; Herrera-Rodriguez et al. 2004)

Daneben wurden noch weitere Transporter gefunden, ein **Oxoglutarat/Malat-Translokator**, der am Transport von 2-Oxoglutarat in Chloroplasten und Mitochondrien mitwirkt, und ein **Nitrat-Transporter**, der für den Transport von Nitrat über Membranen ist verantwortlich ist. (Unkles et al. 1991; Taniguchi und Sugiyama 1997; Weber und Flügge 2002)

Darüber hinaus konnten Gene identifiziert werden, deren Genprodukte an Biosynthese-Wegen beteiligt sind. Die **Malat-Dehydrogenase** katalysiert die Reaktion von Malat zu Oxalacetat und ist damit am Malat-Shuttle-System beteiligt, welches über den Antiport von Malat/Oxalacetat an der Mitochondrienmembran für den Abbau überschüssiger Reduktionsäquivalente aus der Atmungskette sorgt (Richter et al. 2000)

Die  **$\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthetase** ist am Stoffwechsel von Glutathion beteiligt, welches bei verschiedenen Stress-Reaktionen eine bedeutende Rolle spielt, während die  $\beta$ -Glucosidase eine Rolle bei der Abspaltung von Kohlenhydrat-Resten spielt (Michal 1999)

Die **Transketolase** spielt durch die Übertragung von C2-Einheiten beim Pentosephosphatweg eine wichtige Rolle und trägt damit auch zur Gewinnung des Reduktionsäquivalentes NADPH/H<sup>+</sup> bei, das zur Reduktion von Glutathion benötigt wird (Michal 1999)

Einen wichtigen Bestandteil der Atmungskette stellt die **NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase** dar, von der bei *Acrosiphonia sp.* ein das Gen für ein Vorläuferprotein der 31 kDa-Untereinheit identifiziert werden konnte (Remacle et al. 2001).

**Tabelle 3.1-7:** Zusammenfassende Darstellung der mittels Makroarray-Analyse ermittelten Expressionswerte für Stoffwechsel-assoziierte Gene von *Acrosiphonia sp.* unter Verwendung der cDNA von unterschiedlich lange exponierten Versuchspflanzen (4, 12 und 24 Stunden) bzw. den Sonden aus Vorwärts- und Rückwärtssubtraktion der *SSH*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sowie in Klammern die jeweiligen Standardabweichungen. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen den Expressionsstaus des jeweiligen Gens zum untersuchten Zeitpunkt (grün = reprimiert, gelb = keine Induktion oder Repression, rot = induziert).

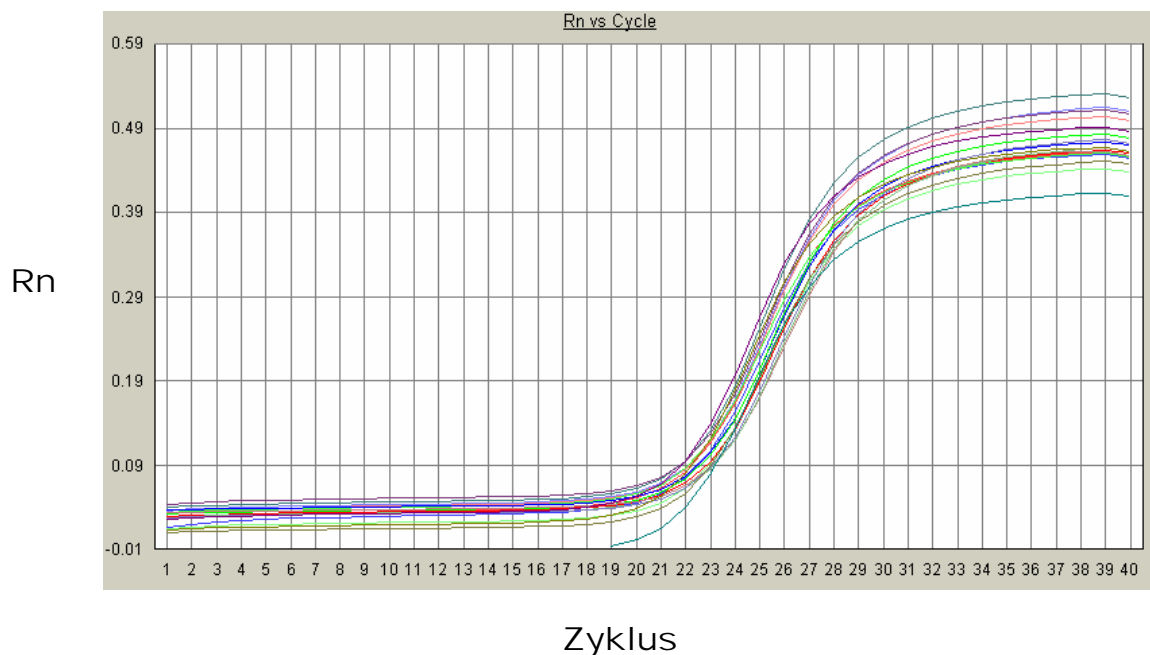
GEN	4h	12h	24h
Phosphoglycerate dehydrogenase (putative)	<b>1,13</b> (+/-0,28)	<b>1,25</b> (+/-0,32)	<b>0,64</b> (+/-0,06)
DIN2 (DARK INDUCIBLE 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	<b>1,02</b> (+/-0,15)	<b>1,44</b> (+/-0,19)	<b>0,99</b> (+/-0,45)
Stearoyl-acyl carrier protein desaturase	<b>1,22</b> (+/-0,27)	<b>1,24</b> (+/-0,09)	<b>0,89</b> (+/-0,19)
High affinity nitrate transporter	<b>0,78</b> (+/-0,30)	<b>1,75</b> (+/-0,35)	<b>0,98</b> (+/-0,38)

GEN	<i>SSH</i>
NADH-ubiquinone oxidoreductase 30.4 kDa subunit (putative)	<b>0,63</b> (+/-0,02)
vacuolar membrane ATPase subunit G (AVMA10)	<b>1,43</b> (+/-0,25)
Malate dehydrogenase, glyoxysomal precursor, (putative)	<b>1,53</b> (+/-0,33)
Oxoglutarate/malate translocator-like protein	<b>0,59</b> (+/-0,07)
$\gamma$ -glutamyl-cysteine-synthetase	<b>12,19</b> (+/-4,13)
N-acetyl- $\gamma$ -glutamyl-phosphate reductase	<b>0,61</b> (+/-0,03)
Asparagin-Synthetase ASN1 (DARK INDUCIBLE 6)	<b>0,53</b> (+/-0,03)
Amino acid transport protein (putative)	<b>1,42</b> (+/-0,09)
Tansketolase 1 (putative)	<b>0,54</b> (+/-0,18)

Um zu überprüfen, ob die mittels *SSH* und Makroarray-Experimenten ermittelten Ergebnisse auch dem in der Pflanze tatsächlich gegebenen Expressionsstatus entsprechen, wurde für einige der identifizierten Gene eine quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Diese Methode beruht nicht, wie die Makroarray-Analyse, auf dem Prinzip der Hybridisierung, sondern nutzt eine PCR-gestützte genspezifische Quantifizierung des

gesuchten Transkriptes. Sie bietet somit eine gute Möglichkeit, Hybridisierungsergebnisse mit einer grundlegend unterschiedlichen Methode verifizieren zu können und damit methodische Fehler auszuschliessen.

Als Matritze für die qRT-PCR wurde cDNA eingesetzt, die aus RNA von unterschiedlich lange UV- bzw. PAR-exponierten Individuen von *Acrosiphonia sp.* synthetisiert wurde. Es wurden für jedes zu überprüfende Gen spezifische Primerpaare verwendet, die zuvor auf ihre Eignung überprüft worden waren. Zur Kontrolle wurde für jede cDNA-Probe zusätzlich eine Quantifizierung der 18S-rRNA durchgeführt. Während des Verlaufs der PCR wurde die Zunahme der Fluoreszenz nach jedem Temperatur-Zyklus der PCR per Laser vermessen und in einem Amplifikations-Plot dargestellt. Abbildung 3.1-7 zeigt beispielhaft den Amplifikations-Plot für das *Gbp1*-Gen.



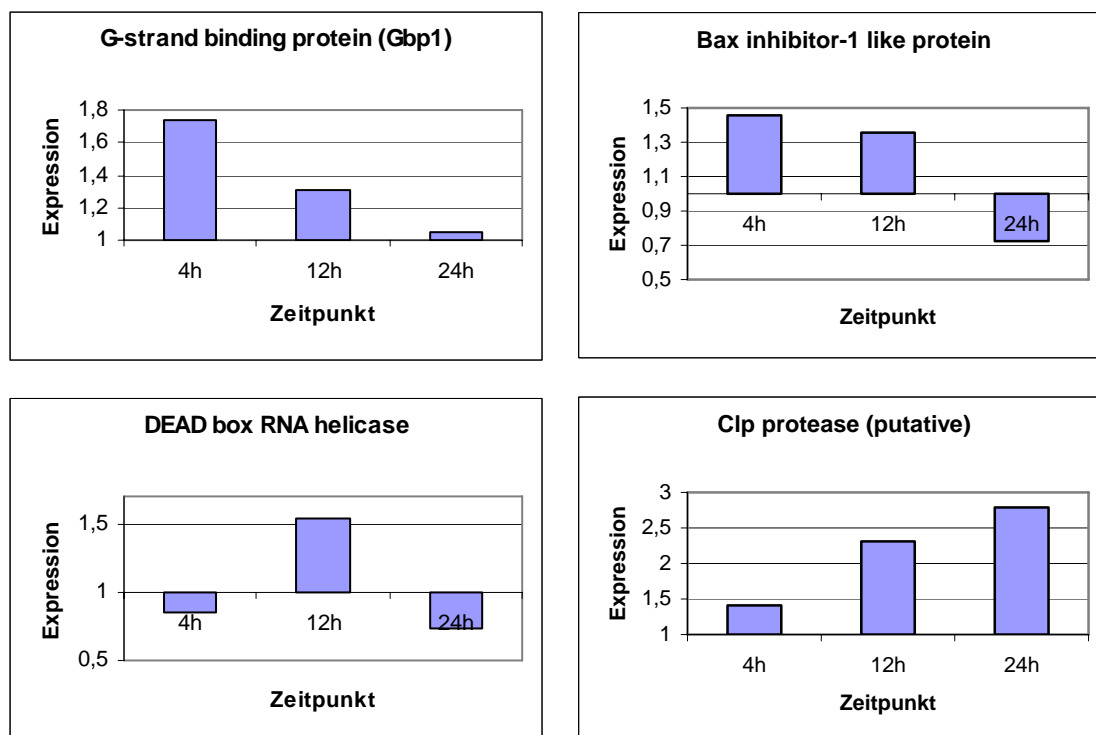
**Abbildung 3.1-7:** Amplifikations-Plot der Ergebnisse der qRT-PCR für das *Gbp1*-Gen von *Acrosiphonia sp.*. Aufgetragen ist die Anzahl der PCR-Zyklen gegen die Intensität der Fluoreszenz-Emission (Rn).

Die Quantifizierung der Transkriptmengen erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms *Relative Expression Software Tool* (REST<sup>®</sup> - version 2, Pfaffl und Horgan 2002) aus den vom Computer ermittelten ct-Werten. In Tabelle 3.1-8 sind die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse für die untersuchten Gene angegeben. Mit aufgeführt sind

auch die Werte, die unter Verwendung der Makroarray-Hybridisierung für das jeweils betreffende Gen ermittelt wurden. In Abbildung 3.1-8 sind die Real-Time-PCR-Ergebnisse für jedes untersuchte Gen graphisch dargestellt.

**Tabelle 3.1-8:** Ergebnisse der qRT-PCR für 4 ausgewählte Gene von *Acrosiphonia sp.* zu verschiedenen Zeitpunkten nach UV-Exposition (berechnet nach Pfaffl und Horgan 2002). Zum Vergleich sind die Ergebnisse der Makroarray-Analysen mit angegeben.

	Real-Time-PCR			Makroarray-Analyse
	4h	12h	24h	SSH (12h)
<b>G-strand binding protein (Gbp1)</b>	1,737	1,304	1,048	108 (+/-31,0)
<b>Bax inhibitor-1 like protein</b>	1,458	1,357	0,723	2,76 (+/-0,76)
<b>DEAD box RNA helicase</b>	0,847	1,541	0,734	8,15 (+/-0,95)
<b>Clp protease (putative)</b>	1,408	2,309	2,789	4,42 (+/-1,34)



**Abbildung 3.1-8:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR für 4 ausgewählte Gene von *Acrosiphonia sp.*

### 3.2. *Monostroma arcticum*

Auch für diese Alge wurde zunächst eine Subtraktive Genbibliothek mittels *SSH* hergestellt. Dafür wurde RNA eingesetzt, die aus im Freiland gesammelten und für 12 Stunden UV-exponierten Individuen gewonnen wurde. Die Durchführung erfolgte wie bereits für *Acrosiphonia sp.* beschrieben und wird hier nicht weiter erläutert. Die dabei identifizierten Klone sind in Tabelle 3.2-1 zusammengefasst.

**Tabelle 3.2-1:** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der *BLAST*-Analyse (blastx) für die sequenzierten cDNA-Inserts der *SSH*-Genbibliothek für *M. arcticum*. Angegeben sind die ermittelten wahrscheinlichsten Treffer mit den entsprechenden e- und Score-Werten sowie dem jeweiligen Organismus und der zugehörigen *NCBI*-Akkzessionsnummer. Ebenfalls mit aufgeführt sind die mittels Makroarray-Analyse bestimmten Expressionswerte (gemittelt aus 6 Einzelwerten von 3 unabhängigen Experimenten) und die jeweiligen Standardabweichungen.

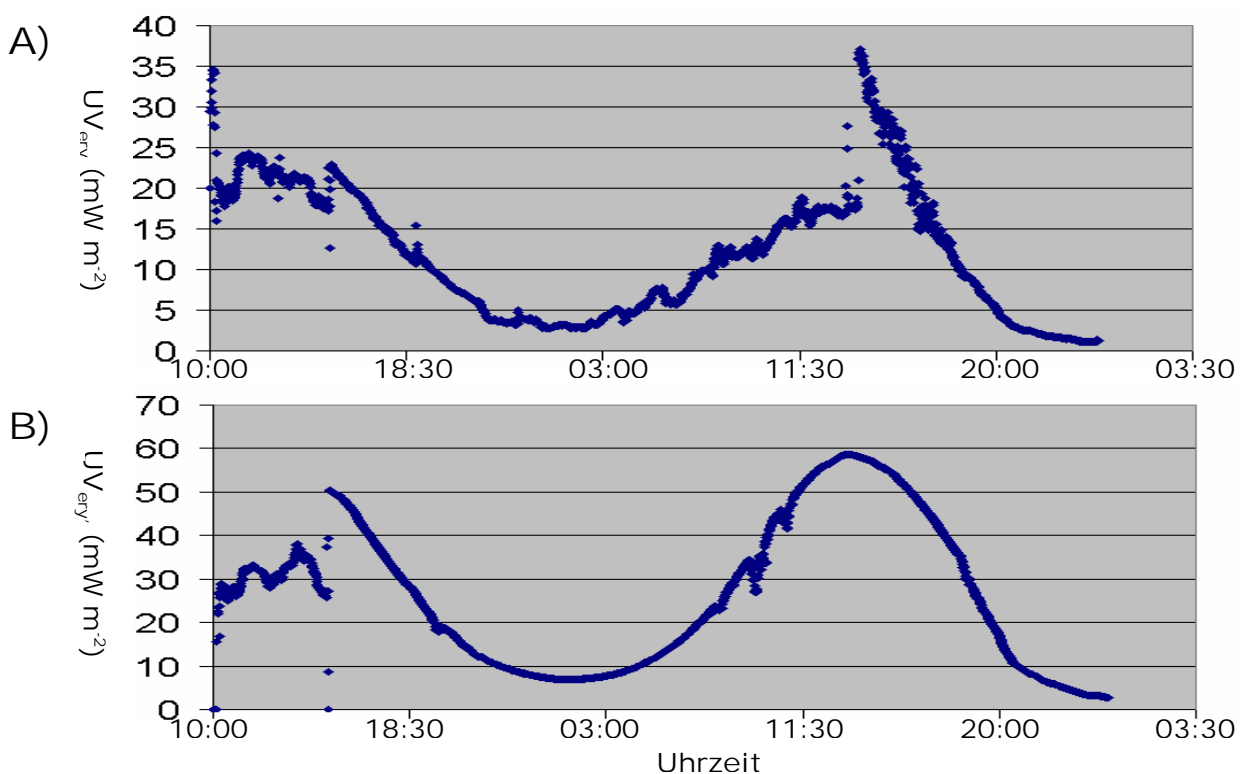
Gen	*)	Ind.-Faktor	SD	e-Wert	Organismus	Score-Wert	Klon-Länge (bp)	Akzessions-Nummer (NCBI)
AMP-activated protein kinase (AMPK) beta subunit glycogen binding domain A	1	1,76	0,63	2e-09	<i>Arabidopsis thaliana</i>	64,3	464	AAL31148
Dihydropteroate synthase	1	1,98	1,46	3e-17	<i>Prochlorococcus marinus</i>	90,1	407	ZP_01006186
serine acetyl transferase	1	3,64	1,51	2e-21	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	103	478	AAM23309
putative ABC transporter	2	2,09	1,21	5e-54	<i>Oryza sativa</i>	213	780	NP_915325
uroporphyrinogen decarboxylase	1	0,49	0,15	3e-38	<i>Sphingomonas sp.</i>	159	383	ZP_01303175

Hier ergab sich die gleiche Problematik der relativ kurzen Fragmente wie bei *Acrosiphonia sp.*, so dass auch hier nur einem geringen Anteil der analysierten Sequenzen eine Identität zugeordnet werden konnte.

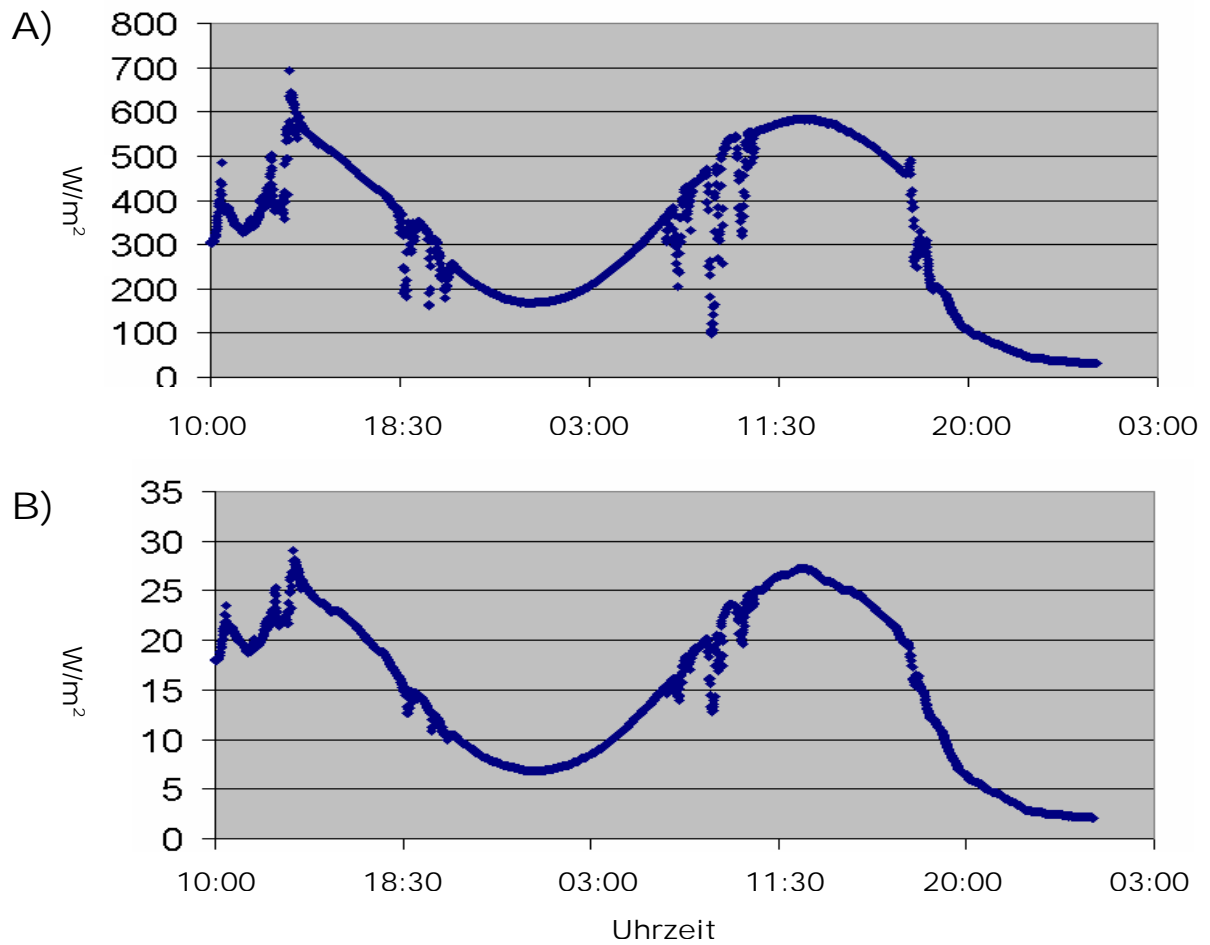
Somit musste auch in diesem Fall eine gröbenselektionierte Genbibliothek hergestellt werden um den Anteil der identifizierbaren Sequenzen zu erhöhen. Auch hierfür wurde RNA aus im Freiland gesammelten und für 12 Stunden künstlicher UV-Strahlung ausgesetzten Pflanzen extrahiert wurde. Die Größenselektionierung und Klonierung erfolgte wie für *Acrosiphonia sp.* beschrieben und wird hier nicht näher erläutert. Es wurden 1344 Klone selektioniert und zur Herstellung von Makroarray-Membranen verwendet. Zur Synthese von cDNA, die für die anschließende Hybridisierung verwendet werden sollte, wurde RNA verwendet, die aus unter verschiedenen Bedingungen exponierten Individuen extrahiert wurde. Es kam ausschließlich



Freilandmaterial zur Verwendung, das zuvor an verschiedenen Stellen des Kongsfjords (Spitzbergen) gesammelt worden war. Es wurden sowohl Versuche mit künstlicher Strahlung im Labor als auch unter Freilandbedingungen durchgeführt. In allen Fällen wurden die Algen für 12, 24 und 36 Stunden bestrahlt bzw. im Falle des Freilandversuchs auf der Expositionsplattform belassen. Als Kontrolle dienten jeweils Algen, die durch Ausschluss der UV-Strahlung mittels geeigneter Filterfolien nur unter PAR-Lichtbedingungen exponiert wurden. Der Freilandversuch mit *M. arcticum* wurde vom 17.06.2004, 10:00 Uhr bis zum 18.06.2004, 24:00 Uhr in der Bucht vor dem alten Kraftwerk in Ny-Ålesund durchgeführt. Zur Ermittlung der Strahlungsbedingungen während des Freilandversuchs wurden mit Hilfe von *ELUV14*-Messgeräten an der Expositionsplattform in etwa 0,5 Metern Wassertiefe und zum Vergleich an der Wasseroberfläche während der gesamten Versuchsdauer minütlich UV-Dosismessungen (Erythema-gewichtet,  $UV_{ery}$ ; El Naggar et al. 1995) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.2-1a dargestellt. Zusätzlich sind die Strahlungsdaten, die von den Messgeräten an der Koldewey-Station minütlich erfasst werden, mit angegeben. Es sind dies die Globalstrahlung und die UV-Strahlung (300 – 370 nm), jeweils in  $W\ m^{-2}$  (Abbildung 3.2-1b)

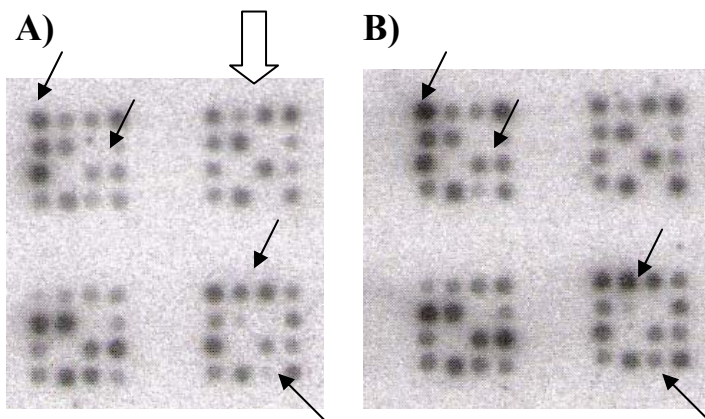
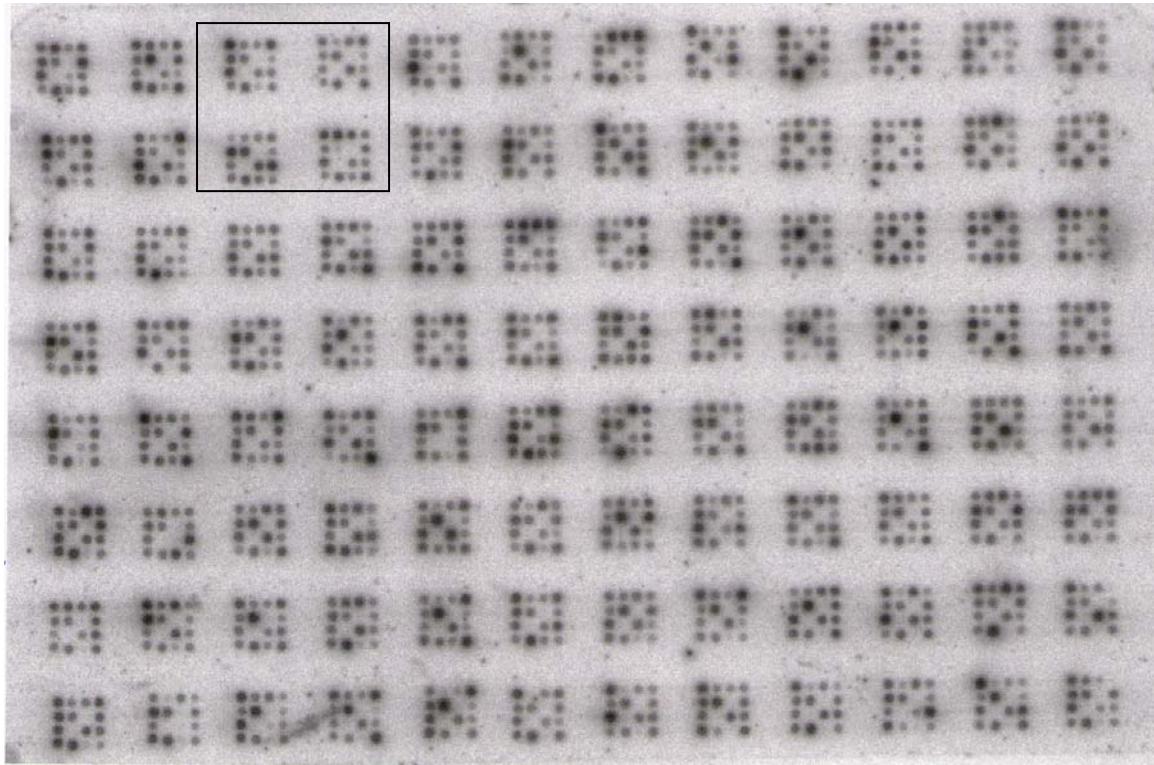


**Abbildung 3.2-1a:** Ergebnisse der minütlichen Erythema-gewichteten UV-Dosismessungen ( $UV_{ery}$ ) mittels *ELUV14*-Messgeräten während des Freilandversuchs mit *M. arcticum* direkt an der Expositionsplattform in etwa 0,5 Metern Wassertiefe (A) und an der Wasseroberfläche (B).



**Abbildung 3.2-1a:** Ergebnisse der minütlichen Strahlungsmessungen an der Koldewey-Station während des Freilandversuchs mit *M. arcticum*. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Globalstrahlung (A) und der UV-Strahlung (300 – 370 nm; B) in  $W m^{-2}$ .

Abbildung 3.2-2 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Hybridisierung der Makroarray-Membranen mit radioaktiv markierter cDNA, die aus der RNA von Versuchsmaterial synthetisiert wurde.



**Abbildung 3.2-2:** Beispielhafte Darstellung des Autoradiogramms einer Makroarray-Membran, das zur Analyse der gröÙenselektionierten Genbibliothek von *M. arcticum* verwendet wurde. Die hier abgebildete Membran wurde mit cDNA hybridisiert, die zuvor aus der RNA von 12 Stunden UV-exponierten Algen synthetisiert und anschließend mit dem radioaktiven Isotop  $\alpha^{32}\text{P}$  wurde markiert wurde. Zur Veranschaulichung unterschiedlicher Spot-Intensitäten ist ein Ausschnitt der Membran vergrößert dargestellt (A) und demselben Ausschnitt einer Membran gegenübergestellt, die zuvor mit cDNA von Kontrollpflanzen hybridisiert wurde (B).

Die dabei als induziert oder reprimiert identifizierten Klone wurden anschließend wie oben beschrieben weiter analysiert. Im Zuge dessen wurden die Plasmid-Inserts von insgesamt 336 Klonen sequenziert, von diesen konnten 72 Sequenzen eine Identität zugeordnet werden. Diese sind in Tabelle 3.2-2 zusammengefasst.

**Tabelle 3.2-2:** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der *BLAST*-Analyse (blastx) für die sequenzierten cDNA-Inserts der gröÙenselektionierten Genbibliothek für *M. arcticum*. Angegeben sind die ermittelten wahrscheinlichsten Treffer mit den entsprechenden e- und Score-Werten sowie dem jeweiligen Organismus (mit grün sind Vertreter der *Chlorophyta* gekennzeichnet) und der zugehörigen *NCBI*-Akkzessionsnummer.

PHOTOSYNTHESE							
Gen	Anzahl Klone pro Gen	e-Wert	Organismus	Score-Wert	Klon-Länge (bp)	Akkzessions-Nummer (NCBI)	Klon-Nr.
chlorophyll a/b binding protein	3	6e-47	<i>Tetraselmis sp.</i>	189	536	AAB70556	2241-G09
chlorophyll a/b binding protein LI818r-1	4	7e-30	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	132	611	CAA64619	2521-A09
auxin-induced putative CP12 domain-containing protein	2	1e-13	<i>Arachis hypogaea</i>	77,8	521	gi:55736085	2340-F07
light-harvesting complex I protein	1	4e-04	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	45,8	325	gi:27542569	2340-F05
Photosystem I reaction center subunit X, chloroplast precursor (PSI-K)	1	2e-25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	117	535	gi:21555328	2520-A03
oxygen-evolving enhancer protein 1 precursor	1	8e-59	<i>Volvox carteri</i>	228	627	gi:5902584	2520-E05
photosystem II protein PSII10	1	4e-28	<i>Bigeloviella natans</i>	127	603	AAP79212	2340-H09
core subunit of photosystem II precursor	1	4e-11	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	69,3	462	gi:5739404	2520-D07
putative Thylakoid luminal 21.5 kDa protein	2	7e-10	<i>Oryza sativa</i>	65,9	571	gi:50935799	2521-C01
STRESS & ABWEHR							
Gen	Anzahl Klone pro Gen	e-Wert	Organismus	Score-Wert	Klon-Länge (bp)	Akkzessions-Nummer (NCBI)	Klon-Nr.
heat shock protein hsp70	1	5e-25	<i>Pisum sativum</i>	116	644	gi:1771479	2521-E09
utative dnaK-type molecular chaperone luminal binding protein, BiP	1	6e-24	<i>Scherffelia dubia</i>	112	640	gi:13897312	2521-F01
heat shock protein binding	1	2-23	<i>Arabidopsis thaliana</i>	111	560	NP_191819	2318-C03
glutathione S-transferase	1	2e-18	<i>Coccomyxa sp.</i>	94,0	560	gi:1150788	2520-G04
protein disulfide isomerase	1	4e-20	<i>Zea mays</i>	100	619	gi:59861275	2520-G07
Thioredoxin family protein/PDI	1	7e-18	<i>Oryza sativa</i>	92,0	370	ABF95370	2232-A03

glutaredoxin	1	7e-17	<i>Tilia platyphyllos</i>	88,6	497	AAL04507	2241-D09
glutaredoxin	1	1e-18	<i>Triticum aestivum</i>	95,1	631	AAP80853	2241-E07
type 2 peroxiredoxin	1	3e-07	<i>Brassica rapa</i>	56,2	400	gi:4928472	2521-A01
carotene biosynthesis-related protein cbr	1	1e-04	<i>Dunaliella bardawil</i>	48,1	485	gi:99362	2520-C04
<b>REGULATION &amp; PROTEINABBAU</b>							
Gen	Anzahl Klone pro Gen	e-Wert	Organismus	Score-Wert	Klon-Länge (bp)	Akkzessions-Nummer (NCBI)	Klon-Nr.
EF-1 alpha-like protein	1	6e-22	<i>Helicosporidium sp.</i>	106	645	gi:54399516	2520-B06
small zinc finger-like protein	1	5e-18	<i>Oryza sativa</i>	94,0	797	gi:50935395	2340-C01
GTP-binding protein yptV1	1	5e-42	<i>Volvox carteri</i>	172	507	gi:401686	2520-A05
cytosolic IMP-GMP specific 5'-nucleotidase, putative	1	6e-15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	82,4	397	AAG12692	2318-F03
putative Mob1-like protein	1	2e-59	<i>Oryza sativa</i>	230	645	XP_463026	2241-G07
putative pre-rRNA processing protein	1	5e-10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	65,5	388	gi:6671953	2318-A11
cell division protein	1	8e-04	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	45,8	513	NP_681523	2521-G07
Mr19,000 outer arm dynein light chain	1	3e-13	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	76,6	509	gi:2138334	2521-C03
low CO <sub>2</sub> -inducible protein	1	9e-11	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	70,1	910	gi:3420927	2318-F11
small nuclear riboprotein Sm-D1-like protein	1	3e-20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100	651	CAB77769	2241-G11
putative polyubiquitin	1	1e-04	<i>Arabidopsis thaliana</i>	49,7	680	AAO43309	2241-E11
putative ubiquitin-related modifier	1	5e-17	<i>Oryza sativa</i>	89,0	492	gi:50936971	2318-D01
ubiquitin fusion protein	2	6-51	<i>Pyrus pyrifolia</i>	202	640	gi:8698909	2318-G11
ubiquitin extension protein (UbCEP52)	1	3e-59	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	229	503	CAA43216	2241-A01
ubiquitin extension protein	1	1e-04	<i>Lupinus albus</i>	47,8	480	gi:438111	2520-G11
<b>STOFFWECHSEL &amp; WEITERE ZELLULÄRE PROZESSE</b>							
Gen	Anzahl Klone pro Gen	e-Wert	Organismus	Score-Wert	Klon-Länge (bp)	Akkzessions-Nummer (NCBI)	Klon-Nr.
ATP synthase gamma chain	1	1e-102	<i>Solanum tuberosum</i>	421	534	gi:2921166	2318-B09
vacuolar membrane ATPase subunit G (AVMA10)	1	1e-08	<i>Arabidopsis thaliana</i>	61,6	580	AAF24609	2241-H03
fumarase	1	3e-23		110	627	CAA62817	2241-B03
granule-bound starch synthase	1	1e-06	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	54,3	453	AAL28128	2241-D03
putative pyridoxine biosynthetic enzyme	1	2e-15	<i>Phaseolus vulgaris</i>	84,3	506	AAG17942	2520-D12
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor	1	5e-45	<i>Solanum tuberosum</i>	182	502	gi:10444388	2340-H07
40S ribosomal protein S25	1	4e-21	<i>Glycine max</i>	102	424	AAQ22726	2318-E11
40S ribosomal protein S30-like	2	5e-16	<i>Oryza sativa</i>	85,9	480	BAD72277	2521-H01

50S ribosomal protein L27	1	6e-16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	86,3	560	AAM62675	2521-B05
60S ribosomal protein L12	1	4e-65	<i>Capsicum annuum</i>	249	584	AAR83868	2318-H11
60S ribosomal protein L19	1	3e-37	<i>Capsicum annuum</i>	156	535	AAR83877	2340-G09
putative 60S ribosomal protein L24	1	3e-26	<i>Oryza sativa</i>	85,1	581	BAD82702	2520-G06
60S ribosomal protein L27A	2	1e-45	<i>Arabidopsis thaliana</i>	184	462	AAM62795	2318-A09
60S ribosomal protein L36	1	4e-22	<i>Ulva compressa</i>	106	423	Q9LRB8	2318-F01
60S ribosomal protein L37a	1	5e-31	<i>Gossypium hirsutum</i>	136	545	AAD28753	2241-D11
60S ribosomal protein L38	1	1e-18	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	94,4	346	AAO13217	2241-C11
60S ribosomal protein L44	1	1e-40	<i>Coccidioides immitis</i>	167	445	EAS35534	2340-G01
ribosomal protein P1	2	6e-19	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	95,5	461	CAA47042	2520-D05
ribosomal protein S11	1	1e-22	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	99,4	606	CAA46835	2241-F11
ribosomal protein S18	1	5e-59	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	229	629	CAA58668	2520-B12
ribosomal protein S27	1	2e-37	<i>Arabidopsis thaliana</i>	157	539	AAM66954	2521-F11
S28 ribosomal protein	1	2e-34	<i>Triticum aestivum</i>	114	548	AAP80664	2521-H05
Ribosomal protein L29	2	8e-23	<i>Medicago truncatula</i>	108	520	ABE84269	2521-A07
Ribosomal L29e protein	1	4e-14	<i>Medicago truncatula</i>	79,7	435	ABE83198	2520-H03
ribosomal protein L30	1	1e-36	<i>Lupinus luteus</i>	154	525	CAA11256	2318-A05
P30 precursor protein	1	5e-20	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	99,4	528	gi:18180	2520-F02
unknown protein	1	6e-27	<i>Oryza sativa</i>	123	611	XP_467624	2521-H11

Im Folgenden soll auf die identifizierten Transkripte bzw. deren Proteinprodukte näher eingegangen werden. Diese lassen sich, wie schon bei *Acrosiphonia sp.* in mehrere funktionelle Gruppen einteilen, die auch getrennt besprochen werden. In der folgenden genaueren Beschreibung der Genprodukte werden die bei den Makroarray-Experimenten ermittelten Induktions- bzw. Reprimierungsfaktoren in tabellarischer Form mit angegeben. Die Werte wurden aus den Ergebnissen von jeweils drei unabhängigen Makroarray-Experimenten berechnet, wobei in Klammern die entsprechende Standardabweichung mit angegeben ist.

## 1. Photosynthese

Ähnlich wie bei *Acrosiphonia sp.* konnten auch bei *M. arcticum* zahlreiche Gene identifiziert werden, die in einem Zusammenhang mit dem Prozess der Photosynthese stehen. Hier waren ebenfalls die schon beschriebenen **Chlorophyll-a/b-Bindeproteine** als differentiell exprimiert gefunden, wozu auch das spezielle **Chlorophyll-a/b-Bindeprotein LI818** zu zählen ist. (Escoubas et al. 1995; Savard et al. 1996; Im et al. 2003)

Einen integralen Bestandteil des PSII stellt das Genprodukt von **psbZ** (PSII core subunit) dar. Dieses ist an der Kontrolle der Wechselwirkung der Lichtsammelantennen mit dem Kern des PSII beteiligt. Das Genprodukt von **psbO (Oxygen Evolving Enhancer Protein 1)**, das ebenfalls Teil des PSII ist, spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung einer optimalen chemischen Umgebung für die Wasseroxidation, vermutlich über die Stabilisierung des Mn-Clusters. Daneben konnten mit **PSI-K** und **PSI reaction center chain IV precursor** auch Komponenten des Photosystems I identifiziert werden. (Mayfield et al. 1987; Jensen et al. 2000)

Das kleine Peptid **CP12** ist an der Lichtregulation des Calvin-Zyklus beteiligt, wobei es die Wechselwirkung zweier Schlüsselenzyme, Phosphoribulokinase und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) über eine NADPH-abhängige Reaktion steuert (Wedel und Soll 1998; Marri et al. 2005)

Mit der **Uroporphyrinogen-Decarboxylase** konnte auch bei *M. arcticum* ein Enzym des Chlorophyll-Stoffwechsels gefunden werden, welches die Decarboxylierung von Actetat-Seitenketten an den Pyrrol-Ringen von Uroporphyrinogen III katalysiert und so zur Bildung von Coproporphyrinogen III beiträgt (Mock und Grimm 1997)

**Tabelle 3.2-3:** Zusammenfassende Darstellung der mittels Makroarray-Analyse ermittelten Expressionswerte für Photosynthese-assoziierte Gene von *M. arcticum* zu verschiedenen Versuchszeitpunkten des Labor- und Freilandversuchs. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sowie in Klammern die jeweiligen Standardabweichungen. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen den Expressionsstatus des jeweiligen Gens zum untersuchten Zeitpunkt (grün = reprimiert, gelb = keine Induktion oder Repression, rot = induziert; n.D. = kein(e) Messwert(e) vorhanden).

GEN	Laborversuch			Freilandversuch		
	12h	24h	36h	12h	24h	36h
chlorophyll a/b binding protein	<b>1,86</b> (+/-0,07)	<b>4,34</b> (+/-1,32)	<b>2,48</b> (+/-0,75)	n.D.	n.D.	n.D.
chlorophyll a/b binding protein	<b>1,94</b> (+/-0,08)	<b>4,22</b> (+/-1,60)	<b>1,99</b> (+/-0,22)	n.D.	n.D.	n.D.
chlorophyll a/b binding protein	<b>2,07</b> (+/-0,37)	<b>4,16</b> (+/-0,35)	<b>2,16</b> (+/-0,23)	n.D.	n.D.	n.D.
chlorophyll a/b binding protein LI818r-1	<b>0,07</b> (+/-0,05)	<b>0,24</b> (+/-0,03)	<b>0,10</b> (+/-0,06)	<b>1,78</b> (+/-0,16)	<b>1,73</b> (+/-1,43)	<b>0,41</b> (+/-0,02)
chlorophyll a/b binding protein LI818r-1	n.D.	n.D.	n.D.	<b>1,58</b> (+/-0,02)	<b>1,74</b> (+/-1,26)	<b>0,26</b> (+/-0,03)
putative CP12 domain-containing protein	<b>0,95</b> (+/-0,09)	<b>0,38</b> (+/-0,12)	<b>0,53</b> (+/-0,06)	<b>0,82</b> (+/-0,41)	<b>1,43</b> (+/-0,54)	<b>0,33</b> (+/-0,14)
light-harvesting complex I protein	<b>1,83</b> (+/-0,42)	<b>2,08</b> (+/-0)	<b>1,76</b> (+/-0,25)	n.D.	n.D.	n.D.
core subunit of photosystem II precursor	<b>1,27</b> (+/-0,01)	<b>1,90</b> (+/-0,41)	<b>1,25</b> (+/-0,11)	<b>0,61</b> (+/-0,23)	<b>1,37</b> (+/-0,33)	<b>1,48</b> (+/-0,95)
Photosystem I reaction center subunit X (PSI-K)	<b>1,11</b> (+/-0,1)	<b>1,49</b> (+/-0,15)	<b>1,81</b> (+/-0,38)	<b>0,46</b> (+/-0,03)	<b>1,02</b> (+/-0,27)	<b>0,97</b> (+/-0,09)
photosystem II protein PSII10	<b>1,21</b> (+/-0,21)	<b>1,51</b> (+/-0,32)	<b>1,68</b> (+/-0,25)	<b>1,04</b> (+/-0,23)	<b>1,05</b> (+/-0,41)	<b>1,83</b> (+/-0,40)
oxygen-evolving enhancer protein 1 precursor	<b>1,00</b> (+/-0,13)	<b>0,99</b> (+/-0,14)	<b>0,65</b> (+/-0,09)	<b>1,16</b> (+/-0,19)	<b>1,30</b> (+/-0,83)	<b>2,07</b> (+/-0,39)
putative Thylakoid lumenal 21.5 kDa protein	<b>1,16</b> (+/-0,56)	<b>2,40</b> (+/-0,68)	<b>0,45</b> (+/-0,20)	<b>0,22</b> (+/-0,11)	<b>3,81</b> (+/-3,95)	<b>0,76</b> (+/-0,39)



## 2. Regulation

Auch bei *M. arcticum* konnten verschiedene regulatorische Komponenten für verschiedene zelluläre Prozesse gefunden werden. Der **Elongationsfaktor 1 $\alpha$**  kann zu einer Aktivierung der Transkriptionsrate von mRNA-Molekülen beitragen. Auch das kleine **Zink-Finger-ähnliche Protein** ist über seine potentiell DNA-bindende Domäne vermutlich an Regulationsprozessen auf der Ebene der Nukleinsäure beteiligt. Dagegen spielt das **GTP-Bindeprotein ypt v1** eine Rolle bei der Erkennung und Translokation von Proteinen im Chloroplasten. (Bischoff et al. 1999; Michal 1999)

Eine ähnliche Funktion hat das lösliche **Dynein-Partikel**, das als molekularer Motor am Transport verschiedener Zellbestandteile beteiligt ist und auch bei der Mitose eine Rolle spielt. Bei *M. arcticum* konnte die leichte Kette des Dynein identifiziert werden. An der Zellteilung ist auch das **Cell-Division-Protein** über die Ausbildung bestimmter Strukturen beteiligt. Die **cytosolische IMP-GMP spezifische 5'-Nucleotidase** kann bei Vorliegen geeigneter Nukleoside als Phosphotransferase fungieren und ist bisher das einzig bekannte Enzym, das Inosin- und Guanosin-Analoga phosphorylieren kann und somit eventuell an entsprechenden Signaltransduktionswegen beteiligt sein könnte. (Patel-King et al. 1997; Löwe und Amos 1998; DiBella et al. 2001)

**Tabelle 3.2-4:** Zusammenfassende Darstellung der mittels Makroarray-Analyse ermittelten Expressionswerte für Regulations-assoziierte Gene von *M. arcticum* zu verschiedenen Versuchszeitpunkten des Labor- und Freilandversuchs. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sowie in Klammern die jeweiligen Standardabweichungen. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen den Expressionsstatus des jeweiligen Gens zum untersuchten Zeitpunkt (grün = reprimiert, gelb = keine Induktion oder Repression, rot = induziert; n.D. = kein(e) Messwert(e) vorhanden).

GEN	Laborversuch			Freilandversuch		
	12h	24h	36h	12h	24h	36h
<b>GTP-binding protein yptV1</b>	<b>0,55</b> (+/-0,14)	<b>1,30</b> (+/-0,09)	<b>0,95</b> (+/-0,12)	<b>1,11</b> (+/-0,20)	<b>1,08</b> (+/-0,82)	<b>0,45</b> (+/-0,41)
<b>EF-1 alpha-like protein</b>	<b>0,82</b> (+/-0,09)	<b>0,86</b> (+/-0,28)	<b>0,44</b> (+/-0,06)	<b>0,76</b> (+/-0,18)	<b>0,57</b> (+/-0,52)	<b>0,54</b> (+/-0,46)
<b>Small zinc-finger like protein</b>	<b>0,75</b> (+/-0,28)	<b>0,49</b> (+/-0,37)	<b>1,50</b> (+/-1,13)	n.D.	n.D.	n.D.
<b>outer arm dynein light chain (Mr19,000)</b>	<b>0,72</b> (+/-0,07)	<b>0,61</b> (+/-0,05)	<b>0,55</b> (+/-0,15)	<b>1,86</b> (+/-0,58)	<b>0,66</b> (+/-0,27)	<b>0,94</b> (+/-0,20)
<b>cytosolic IMP-GMP specific 5'-nucleotidase</b>	n.D.	<b>0,26</b> (+/-0,17)	<b>0,68</b> (+/-0,54)	n.D.	n.D.	n.D.
<b>Cell division protein</b>	<b>0,38</b> (+/-0,15)	<b>0,50</b> (+/-0,03)	<b>0,65</b> (+/-0,17)	<b>0,88</b> (+/-0,17)	<b>1,32</b> (+/-0,13)	<b>1,12</b> (+/-0,19)

### 3. Proteinabbau

Desweiteren konnten mehrere Gene identifiziert werden, deren Translationsprodukte im Zusammenhang mit **Ubiquitin** stehen. Dieses kleine Protein wird unter anderem als Markierung an zum Abbau bestimmte Proteine angefügt, welche dann durch den oben beschriebenen Proteasom-Komplex abgebaut werden. Das **Ubiquitin-Fusions-Protein** und das **Ubiquitin-Extensions-Protein** sind beide für die Synthese von funktionellem Ubiquitin wichtig. Der **Ubiquitin-related-modifier** kann mit einer Vielzahl zellulärer Proteine konjugiert werden und reguliert und modifiziert hierüber eine Vielzahl von Proteinfunktionen. (Hellmann und Estelle 2002; Balakirev et al. 2003; Schwechheimer und Villalobos 2004)

**Tabelle 3.2-5:** Zusammenfassende Darstellung der mittels Makroarray-Analyse ermittelten Expressionswerte für Proteinabbau-assoziierte Gene von *M. arcticum* zu verschiedenen Versuchszeitpunkten des Labor- und Freilandversuchs. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sowie in Klammern die jeweiligen Standardabweichungen. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen den Expressionsstatus des jeweiligen Gens zum untersuchten Zeitpunkt (grün = reprimiert, gelb = keine Induktion oder Repression, rot = induziert; n.D. = kein(e) Messwert(e) vorhanden).

GEN	Laborversuch			Freilandversuch		
	12h	24h	36h	12h	24h	36h
<b>Polyubiquitin (putative)</b>	<b>0,74</b> (+/- 0,10)	<b>0,97</b> (+/- 0,05)	<b>0,72</b> (+/-0,13)	n.D.	n.D.	n.D.
<b>Ubiquitin fusion protein</b>	<b>0,99</b> (+/- 0,18)	<b>0,49</b> (+/- 0,20)	<b>1,49</b> (+/-1,03)	n.D.	n.D.	n.D.
<b>Ubiquitin extension protein (UbCEP52)</b>	<b>0,53</b> (+/- 0,12)	<b>0,73</b> (+/- 0,19)	<b>0,53</b> (+/-0,08)	<b>2,05</b> (+/- 0,92)	<b>1,50</b> (+/- 0,67)	<b>1,07</b> (+/-0,31)
<b>Ubiquitin-related modifier (putative)</b>	<b>1,01</b> (+/- 0,28)	<b>0,52</b> (+/- 0,17)	<b>0,51</b> (+/-0,44)	n.D.	n.D.	n.D.

#### 4. Stress und weitere zelluläre Prozesse

Bei *M. arcticum* konnten ähnliche Stress-assoziierte Gene wie bei *Acrosiphonia sp.* als differentiell exprimiert identifiziert werden. Auch hier sind verschiedene **Hitzeschockproteine** (HSP70, dnak-Typ Chaperon) zu nennen, die, wie bereits oben beschrieben, als molekulare Chaperone wirken und bei der korrekten Faltung von neuen oder durch Stress-Einwirkung denaturierten Proteinen mithelfen. In diesem Zusammenhang ist auch die **Protein-Disulfid-Isomerase** zu erwähnen, die ebenfalls als Chaperon wirkt, aber auch Aufgaben in der Signaltransduktion übernimmt. (Fourie et al. 1994; Miernyk 1999; Lewis et al. 2001; Ray et al. 2003) Parallel zu *Acrosiphonia sp.* wurde auch hier das Gen für die **Glutathion-S-Transferase** identifiziert, die, wie oben beschrieben, an verschiedenen antioxidativen und detoxifizierenden Mechanismen in der Zelle beteiligt ist (Hayes und Strange 1995; Wagner et al. 2002).

Bei der Entgiftung spielt auch **Peroxiredoxin** eine wichtige Rolle. Es reduziert schädliche Peroxide zu den ungefährlicheren korrespondierenden Alkoholen. Darüber hinaus scheint es auch bei der Induktion der Translation unter oxidativem Stress eine Rolle zu spielen (Dietz et al. 2002).

Das **Low-CO<sub>2</sub>-inducible-Protein** wird bei geringen Konzentration von Kohlendioxid induziert und ist an einem Mechanismus zur Konzentrierung von CO<sub>2</sub> beteiligt (Chen et al. 1997).

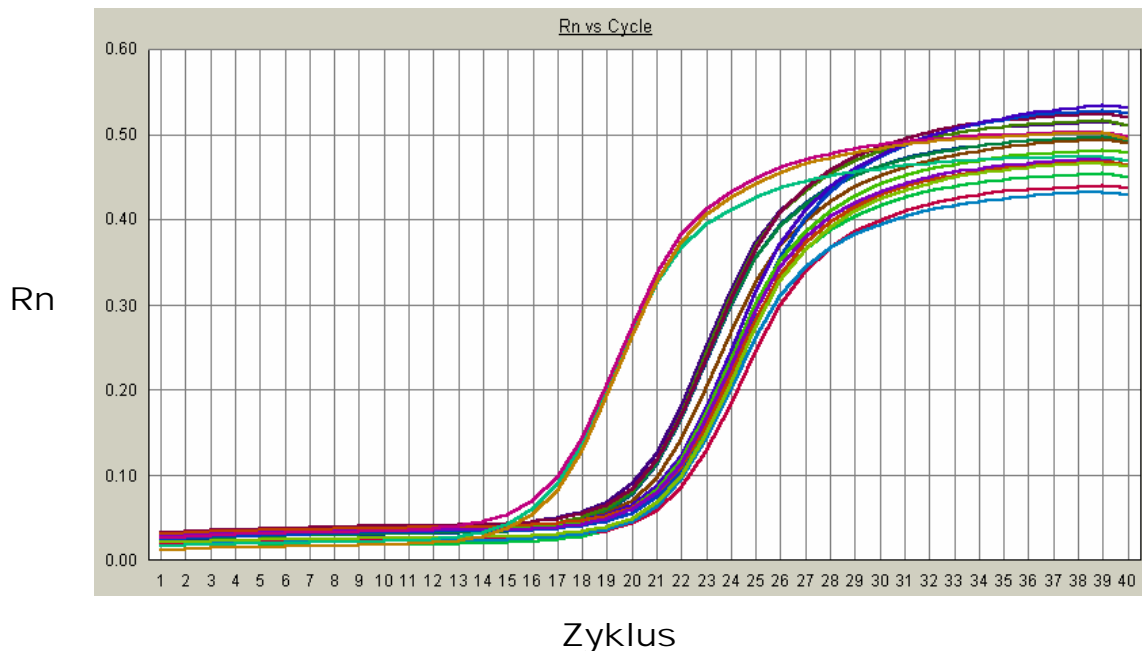
Die **Dihydrolipoamid-Dehydrogenase** ist als Teil des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes im Zuge der oxidativen Decarboxylierung an der Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A beteiligt. Der Multienzymkomplex der **ATP-Synthase** wird durch den Transport von H<sup>+</sup> angetrieben, was zu einer „Dreischritt-Rotation“ der asymmetrischen **γ-Untereinheiten** führt, was letztendlich über Konformationsänderungen weiterer Untereinheiten die Bildung von ATP aus ADP + P<sub>i</sub> katalysiert. (Michal 1999)

**Tabelle 3.2-6:** Zusammenfassende Darstellung der mittels Makroarray-Analyse ermittelten Expressionswerte für Stress-assoziierte Gene von *M. arcticum* zu verschiedenen Versuchszeitpunkten des Labor- und Freilandversuchs. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sowie in Klammern die jeweiligen Standardabweichungen. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen den Expressionsstaus des jeweiligen Gens zum untersuchten Zeitpunkt (grün = reprimiert, gelb = keine Induktion oder Repression, rot = induziert; n.D. = kein(e) Messwert(e) vorhanden).

GEN	Laborversuch			Freilandversuch		
	12h	24h	36h	12h	24h	36h
Heat shock protein HSP70	<b>0,34</b> (+/-0,14)	<b>0,12</b> (+/-0,05)	<b>0,26</b> (+/-0,10)	<b>2,04</b> (+/-0,16)	<b>1,06</b> (+/-0,90)	<b>0,50</b> (+/-0,16)
dnaK-type molecular chaperone luminal binding protein, BiP (putative)	<b>0,74</b> (+/-0,01)	<b>0,61</b> (+/-0,05)	<b>0,29</b> (+/-0,22)	<b>1,73</b> (+/-0,66)	<b>9,70</b> (+/-12,7)	<b>0,74</b> (+/-0,2)
Protein disulfide isomerase	<b>1,03</b> (+/-0,09)	<b>1,39</b> (+/-0,17)	<b>1,23</b> (+/-0,48)	<b>1,06</b> (+/-0,27)	<b>2,28</b> (+/-1,62)	<b>0,61</b> (+/-0,09)
Type 2 peroxiredoxin	<b>0,94</b> (+/-0,06)	<b>0,43</b> (+/-0,09)	<b>0,38</b> (+/-0,04)	<b>2,14</b> (+/-0,99)	<b>1,11</b> (+/-0,43)	<b>0,22</b> (+/-0,03)
Glutathione S-transferase	<b>0,51</b> (+/-0,28)	<b>0,38</b> (+/-0,23)	<b>0,44</b> (+/-0,16)	<b>0,70</b> (+/-0,13)	<b>0,85</b> (+/-0,85)	<b>0,91</b> (+/-0,07)
Low CO <sub>2</sub> -inducible protein	n.D.	<b>0,15</b> (+/-0,14)	<b>0,57</b> (+/-0,53)	n.D.	n.D.	n.D.
Dihydrolipoamid-Dehydrogenase precursor	n.D.	n.D.	n.D.	<b>2,22</b> (+/-0,37)	<b>0,66</b> (+/-0,09)	<b>0,52</b> (+/-0,31)
ATP-Synthase γ-chain	n.D.	n.D.	n.D.	<b>2,93</b> (+/-0,50)	<b>0,90</b> (+/-0,32)	<b>0,89</b> (+/-0,08)

Die Ergebnisse der Makroarray-Hybridisierung wurden auch hier für einige ausgewählte Gene von *M. arcticum* mittels Real-Time-PCR überprüft. Als Matritze diente auch hier cDNA, die aus der RNA von unterschiedlich lange bestrahlten (UV und PAR-Kontrolle) Individuen von *M. arcticum* synthetisiert wurde. Für jede verwendete cDNA-Präparation wurde auch hier eine 18S-rRNA-Kontrollreaktion mitgeführt und in die Berechnungen der relativen Transkriptmengen mit einbezogen.

Abbildung 3.2-3 zeigt beispielhaft den Amplifikations-Plot für das Chlorophyll a/b binding protein-Gen, während in Tabelle 3.2-7 und Abbildung 3.2-8 die Ergebnisse der qRT-PCR-Untersuchungen für die untersuchten Gene dargestellt sind. Zum Vergleich sind in Tabelle 3.2-7 die bei der Makroarray-Analyse ermittelten Werte mit angegeben.



**Abbildung 3.2-3:** Amplifikations-Plot der Ergebnisse der qRT-PCR für das Chlorophyll a/b binding protein-Gen von *M. arcticum*. Aufgetragen ist die Anzahl der PCR-Zyklen gegen die Intensität der Fluoreszenz-Emission (Rn).

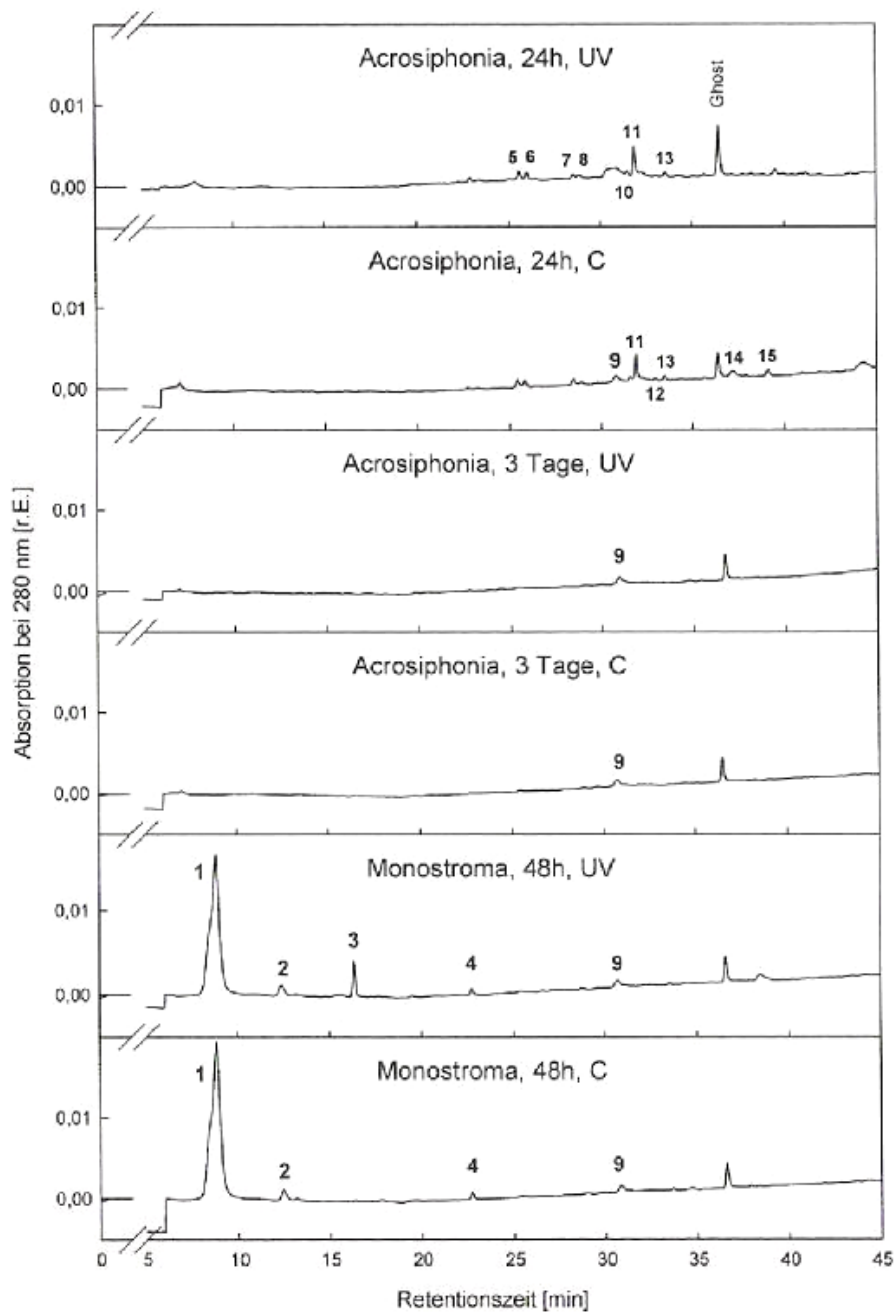
**Tabelle 3.2-7:** Ergebnisse der Real-Time-PCR für 3 ausgewählte Gene von *M. arcticum* zu verschiedenen Zeitpunkten der UV-Exposition (berechnet nach Pfaffl und Horgan 2002). Zum Vergleich sind die Ergebnisse der Makroarray-Analysen mit angegeben.

	Real-Time-PCR			Makroarray-Analyse		
	12h	24h	36h	12h	24h	36h
<b>Chlorophyll a/b binding protein</b>	0,780	3,538	6,869	1,86 (+/-0,07)	4,34 (+/-1,32)	2,48 (+/-0,75)
<b>Thylakoid lumenal 21.5 kDa protein (putative)</b>	0,993	3,521	0,338	1,16 (+/-0,56)	2,40 (+/-0,68)	0,45 (+/-0,20)
<b>GTP-binding protein yptV1</b>	0,469	4,624	0,089	0,55 (+/-0,14)	1,30 (+/-0,09)	0,95 (+/-0,12)

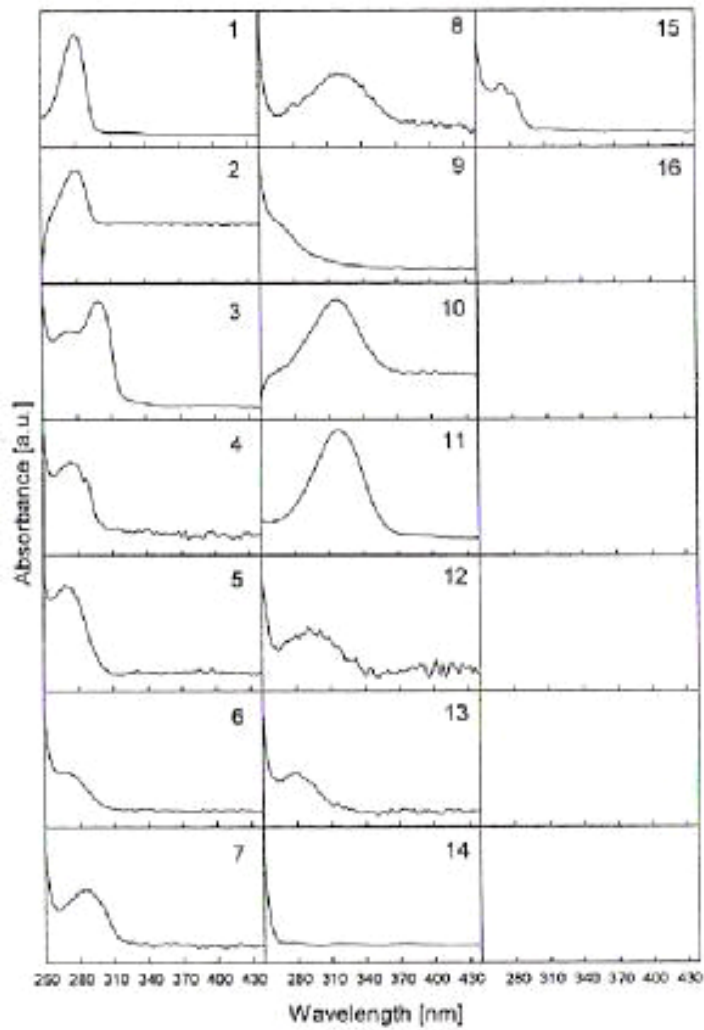
### Inhaltsstoff-Analysen in *Acrosiphonia sp.* und *M. arcticum*

Die UV-Induktion des Gens für eine putative Flavonol 3-*O*-Glucosyltransferase in *Acrosiphonia sp.* ließ vermuten, das es in dieser Alge bei UV-Bestrahlung zur Bildung von Substanzen aus der Gruppe der Flavonoide kommen könnte. Um dies zu überprüfen, wurden Algen, die für 24 Stunden oder 3 Tage mit künstlicher UV-Strahlung bzw. zur Kontrolle nur mit PAR bestrahlt worden waren, einer Methanol-Extraktion unterzogen. Zusätzlich wurden auch Proben von *M. arcticum* untersucht, die für 48 Stunden künstlicher UV-Strahlung (bzw. PAR) ausgesetzt waren. Die eingesetzten Bestrahlungsstärken entsprachen denen, die auch für die übrigen Versuche mit diesen Algen zur Anwendung kamen. Die Methanol-Extrakte wurden mittels HPLC unter Verwendung eines UV-Diodenarraydetektors auf das Vorhandensein phenolischer Substanzen hin untersucht. Die dabei erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 3.2-4 dargestellt während die vom UV-Diodenarraydetektor ermittelten Spektren für die jeweiligen Peaks der Chromatogramme in Abbildung 3.2-5 gezeigt sind.

Die HPLC-Analysen der Methanol-Extrakte von *Acrosiphonia sp.* und *M. arcticum* in Verbindung mit der UV-Diodenarraydetektor-Analyse ließen keine Hinweise auf das Vorhandensein von Flavonoid-ähnlichen Verbindungen in den untersuchten Proben erkennen.



**Abbildung 3.2-4:** Chromatogramme der HPLC-Analyse von Methanol-Extrakten der Grünalgen *Acrosiphonia sp.* und *M. arcticum*. Die Pflanzen waren zuvor für unterschiedlich lange Zeiträume künstlicher UV-Strahlung (UV) bzw. zur Kontrolle nur PAR (C) ausgesetzt.



**Abbildung 3.2-5:** UV-Spektren für die einzelnen Peaks der Chromatogramme aus Abbildung 3.2-4, gemessen mittels eines UV-Diodenarraydetektors.

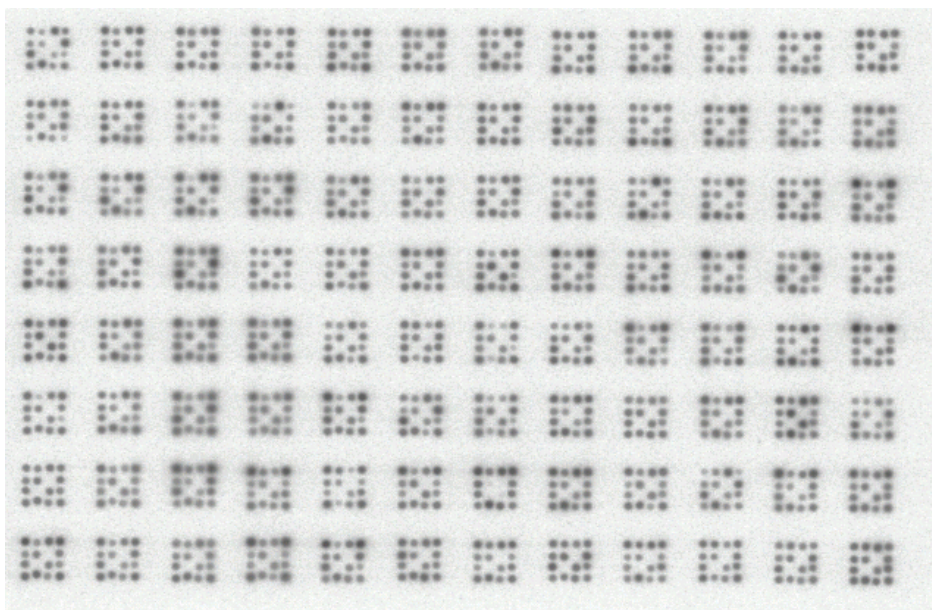


### 3.3. *Laminaria* spp.

Für *L. saccharina* wurde zunächst aus jungen Sporophyten, die in Kultur angezogen worden waren, RNA extrahiert und zur Herstellung einer Subtraktiven Genbibliothek mittels SSH verwendet. Die Sporophyten waren zuvor im Labor 12 Stunden künstlicher UV-Strahlung bzw. zur Kontrolle nur PAR-Licht ausgesetzt gewesen. Die RNA-Ausbeuten unter Verwendung der Methode von Apt et al. (1995) lagen dabei zwischen 30 und 100 µg Gesamt-RNA pro g Frischgewicht.

Die Vorgehensweise erfolgte wie oben beschrieben. Zur Herstellung der Makroarray-Membranen wurden 672 bakterielle Klone ausgewählt, bei denen mittels PCR das Vorhandensein eines cDNA-Fragmentes im Vektor nachgewiesen werden konnte. Die PCR-Produkte wurden wie oben beschrieben aufgereinigt und jeweils in doppelter Ausführung aufgetragen. Zur Hybridisierung wurde mit dem radioaktiven Isotop  $\alpha^{33}\text{P}$  markierte cDNA verwendet, die aus den Vorwärts- und Rückwärtsexperimenten der SSH stammte. Für jede Bedingung wurden 3 unabhängige Hybridisierungen durchgeführt.

In Abbildung 3.3-1 ist beispielhaft das Ergebnis einer solchen Hybridisierung zu sehen.



**Abbildung 3.3-1:** Beispielhafte Darstellung des Autoradiogramms einer Makroarray-Membran, das zur Analyse der subtrahierten Genbibliothek von *L. saccharina* verwendet wurde. Die hier abgebildete Membran wurde mit cDNA hybridisiert, die mittels Rückwärtssubtraktion bei der SSH hergestellt und anschließend mit  $\alpha^{33}\text{P}$  markiert wurde.

Durch eine softwaregestützte, vergleichende Analyse der Hybridisierungsergebnisse konnten 165 Klone identifiziert werden, deren korrespondierende Spots auf den Membranen bei den entsprechenden Experimenten unterschiedliche Intensitäten zeigten. Von diesen wurden 96 Klone ausgewählt, bei denen eine gute Übereinstimmung der ermittelten Expressionswerte zwischen den einzelnen Experimenten ermittelt werden konnte. Die entsprechenden Plasmid-Inserts wurden sequenziert und zur Annotation einer *BLAST*-Analyse unterzogen. Dabei konnten 7 der 91 erhaltenen Sequenzen einer bestimmte Genfunktion zugeordnet werden. Diese sind in Tabelle 3.3-1 zusammen mit der Länge der jeweiligen Sequenz aufgeführt.

**Tabelle 3.3-1:** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der *BLAST*-Analyse (blastx) für die sequenzierten cDNA-Inserts der *SSH*-Genbibliothek für *Laminaria saccharina*. Angegeben sind die ermittelten wahrscheinlichsten Treffer mit den entsprechenden e- und Score-Werten sowie dem jeweiligen Organismus und der zugehörigen *NCBI*-Akkzessionsnummer. Ebenfalls mit aufgeführt sind die mittels Makroarray-Analyse bestimmten Expressionswerte (gemittelt aus 6 Einzelwerten von 3 unabhängigen Experimenten) und die jeweiligen Standardabweichungen. (SD = Standardabweichung; \*) = Anzahl der Klone pro Gen)

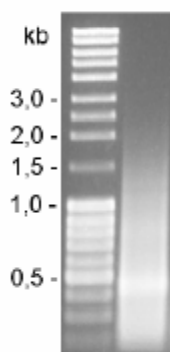
Gen	*)	Ind.-Faktor	SD	e-Wert	Organismus	Score-Wert	Klon-Länge (bp)	Akkzessions-Nummer (NCBI)
methionine sulfoxide reductase A	1	2,89	0,90	0,042	<i>P. balsamifera</i>	39,7	81	AAS46232
glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1	4,25	2,19	1e-09	<i>L. digitata</i>	71,9	315	AJ130773
Actin	1	0,24	0,15	5,1	<i>L. usitatissimum</i>	32,7	201	AAW34192
photosystem I P700 apoprotein A1	1	15,3 2	8,44	6e-04	<i>A. punctatus</i>	45,8	366	BAA83440
fucoxanthin chlorophyll a/c binding protein	1	2,66	1,13	5e-21	<i>M. pyrifera</i>	102	217	AAC49019
Actin related protein 2/3 complex, subunit	1	4,78	3,74	4e-28	<i>D. rerio</i>	125	304	AAH78273
40S ribosomal protein S3	1	0,50	0,12	7e-08	<i>C. incerta</i>	58,9	133	ABA01099

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich ist, konnten nur rund 8 % der untersuchten Sequenzen eine bestimmte Identität zugeordnet werden, was auch hier mit der geringen Länge der mittels *SSH* generierten cDNA-Fragmente zusammenhängt. Im Fall der Braunalge *L. saccharina* ist dies allerdings noch problematischer als bei den oben beschriebenen Grünalgen. Während diese in einem relativ engen Verwandtschaftsverhältnis zu genetisch bereits gut charakterisierten Grünalgen wie *Chlamydomonas* oder *Volvox* bzw. auch zu höheren Gefäßpflanzen stehen, ist

dies bei *L. saccharina* nicht der Fall. Die Braunalgen werden taxonomisch den *Heterokontophyta* zugeordnet, einer phylogentisch eher isolierten Gruppe, denen auch die Kieselalgen (*Diatomeen*) und Panzergeißler (*Peridineen*) zugerechnet werden. Aufgrund der im Verlauf der Evolution bereits frühen Abspaltung der *Heterokontophyta* von den Vorläufern der rezenten grünen Pflanzen, bestehen zwischen diesen auch auf Gen-Sequenzebene große Unterschiede, die eine Identifizierung von Braunalgen-Genen – welche ja auf dem Vergleich mit bereits bekannten Sequenzen beruht - deutlich erschweren. Von Organismen aus der Gruppe der *Heterokontophyta* sind bisher vergleichsweise wenige Sequenzdaten bekannt.

Um längere Sequenzen und damit eine höhere Ausbeute an identifizierbaren Genfunktionen zu bekommen, wurde die Erstellung einer entsprechenden Genbibliothek durch die Firma *vertis Biotechnologie AG* (Freising) in Auftrag gegeben. Die für die Genbank notwendige RNA wurde aus Sporophyten von *L. saccharina* extrahiert, die für unterschiedliche lange Zeiträume (3, 6, 12, 24 und 36 Stunden; siehe 2.15.4) künstlicher UV-Strahlung ausgesetzt. Dies sollte eine möglichst hohe Diversität an klonierten Genen bzw. Transkripten gewährleisten.

Als Ausgangsmaterial wurde von der Gesamt-RNA isolierte poly(A)+-RNA verwendet, die unter Verwendung eines oligo(dT)-*NotI*-Primers in eine Erststrang-Synthese eingesetzt und dann mittels 16 Zyklen einer LA-PCR („Long & Accurate-PCR“) amplifiziert wurde. Das Ergebnis dieser Amplifikation ist in Abbildung 3.3-2 dargestellt.



**Abbildung 3.3-2:** Amplifikation der cDNA von *L. saccharina* mittels LA-PCR.

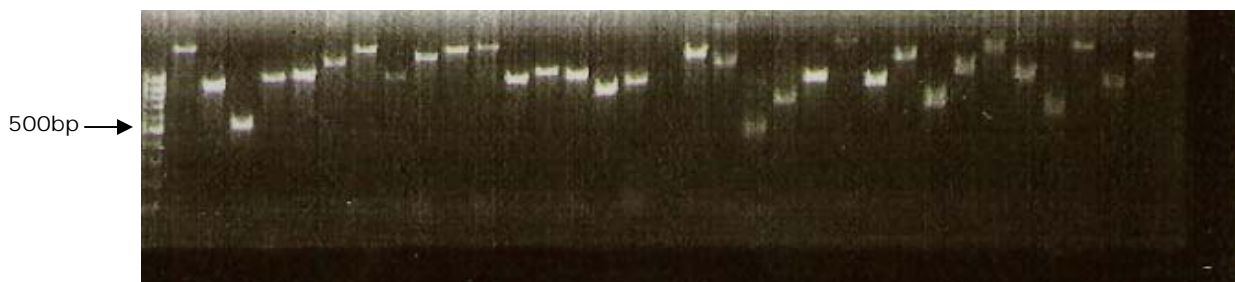
Vor der Ligation der cDNA wurde diese durch elektrophoretische Auftrennung in einem 1,3 %igen Agarosegel und darauf folgender Elution der Fraktion > 500 bp gröbenselektioniert. Anschließend wurde die cDNA in pBS II sk+ - Vektoren ligiert.

Die von der *vertis Biotechnologie AG* ermittelten Charakteristika der so hergestellten Genbibliothek sind in Tabelle 3.3-2 zusammengefasst.

**Tabelle 3.3-2:** Charakteristika der von der *vertis Biotechnologie AG* hergestellten Genbibliothek für *Laminaria saccharina* (nach Angaben des Herstellers).

Mittlere Insert-Größe der analysierten Klone	820 bp
Klonierungs-Vektor	PBS II sk +
Bakterien-Stamm für Transformation	TransforMax™ EC100™ -T1 <sup>R</sup>
cDNA-Fraktion für die Ligation	> 500 bp
Vektor-Hintergrund (Plasmide ohne Insert)	< 5 %
Titer der primären Genbibliothek	400 cfu/μl
Gesamtzahl der Klone in der primären Genbibliothek	2.300.000 cfu

Die von der *vertis Biotechnologie AG* gelieferten transformierten *E. coli*-Bakterien wurden auf Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsmarker ausplattiert, über Nacht bei 37 °C bebrütet und schließlich 2304 willkürlich ausgewählte Bakterienkolonien in LB-Glycerinmedium auf Mikrotiterplatten überimpft. Die entsprechenden Plasmid-Inserts wurden mittels PCR amplifiziert, über Millipore-Filterplatten aufgereinigt und in Spotting-Puffer gelöst. In Abbildung 3.3-3 sind beispielhaft gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkte von *L. saccharina* gezeigt. Wie man erkennt, beträgt die Sequenzlänge eines Großteils der PCR-Produkte deutlich mehr als 500 bp.



**Abbildung 3.3-3:** Plasmid-Inserts der von der *vertis Biotechnologie AG* hergestellten Genbibliothek von *L. saccharina* nach Amplifikation mittels PCR und elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,5 %igen Agarosegel.

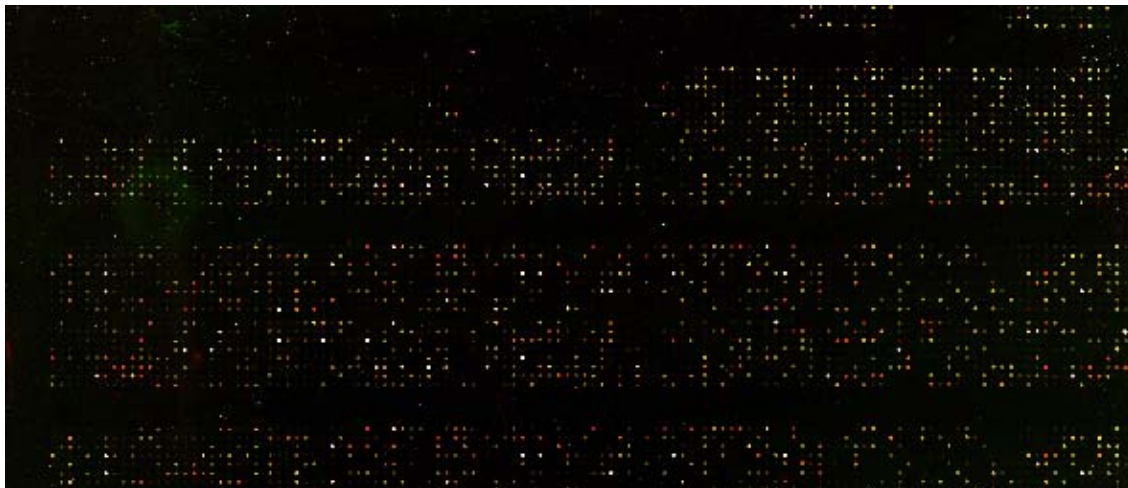
Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines DNA-Spotters (*MicrogridII*, Biorobotics) auf Aldehyd-beschichtete Glasobjektträger aufgebracht; die so hergestellten Micorarrays konnten dann nach verschiedenen Blockierungs- und Denaturierungsschritten für Hybridisierungsexperimente eingesetzt werden.

Zur Hybridisierung wurde cDNA verwendet, die aus der RNA von Sporophyten (junge Thalli) und Sporen von *L. saccharina* aber auch von jungen Sporophyten der Arten *L. digitata* und *L. solidungula* synthetisiert wurde.

Die beiden zu vergleichenden cDNA-Proben wurden dabei zunächst mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen (Cy3 und Cy5, Amersham Biosciences) markiert, was eine Hybridisierung beider Proben mit ein und demselben Mikroarray ermöglichte. Diese erfolgte bei 42° C für ca. 16 Stunden im Hybridisierungssofen. Anschließend wurden die Mikroarrays mit verschiedenen Pufferlösungen gewaschen und so von überschüssigem, nicht gebundenem Farbstoff befreit. Nach dem Einscannen wurden die digitalisierten Bilder mit Hilfe des Computerprogramms GenePix Pro 6.0 ausgewertet.

Verglichen wurden jeweils Proben von Individuen, die entweder für 12 Stunden mit künstlichem UV-Licht bzw. zur Kontrolle mit PAR-Licht bestrahlt wurden.

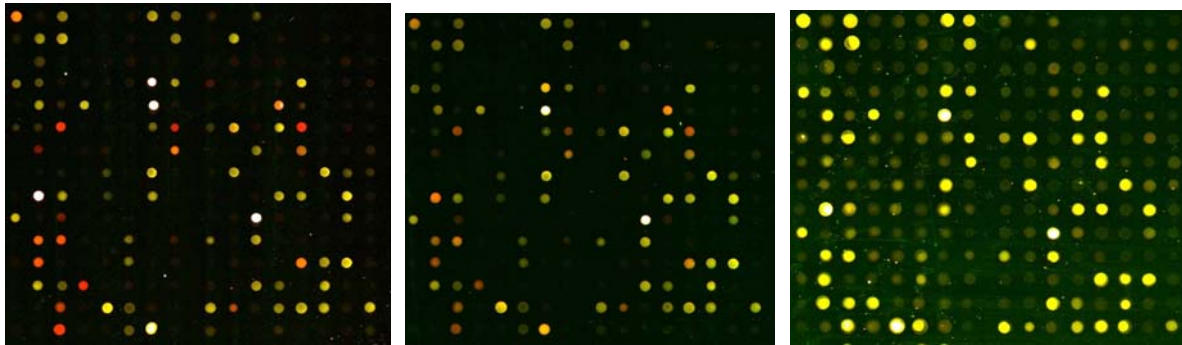
In Abbildung 3.3-4 ist das Ergebnis einer Mikroarray-Hybridisierung zu sehen. Hier wurde cDNA von Proben junger Sporophyten von *L. saccharina* verwendet, die mit dem Farbstoff Cy3 (UV-bestrahlte Probe) bzw. Cy5 (PAR-Kontrolle) markiert wurde. Induzierte Gene erscheinen bei dieser Darstellung rot, reprimierte grün. Solche Spots, die eine eher gelbliches Signal zeigen, stellen Gene dar, bei denen keine differentielle Reaktion in einer der beiden zu vergleichenden Proben festzustellen ist.



**Abbildung 3.3-4:** Ergebnis der Hybridisierung eines Mikroarrays mit Cy3- bzw. Cy5-markierter cDNA von bestrahlten Individuen und Kontrollpflanzen von *Laminaria saccharina*.

Zwischen den unterschiedlichen Spezies von *Laminaria*, die für Hybridisierungsexperimente mit den Mikroarrays eingesetzt wurden, waren teilweise deutliche Unterschiede bei der

Hybridisierung zu erkennen. In Abbildung 3.3-5 ist ein Ausschnitt des verwendeten Mikroarrays nach Hybridisierung mit cDNA der verschiedenen *Laminaria*-Arten zu erkennen.



**Abbildung 3.3-5:** Ergebnis der Hybridisierung von Mikroarrays mit Cy3- bzw. Cy5-markierter cDNA von bestrahlten Individuen und Kontrollpflanzen von *Laminaria saccharina* (links), *L. solidungula* (mitte) und *L. digitata* (rechts). Dargestellt ist jeweils der selbe Ausschnitt des Mikroarrays. (Dauer der UV-Exposition bei allen Arten: 12 Stunden)

Die Abbildung zeigt, dass bei den hier gezeigten Genen von *L. saccharina* und *L. solidungula* durch UV-Exposition eine deutlich stärkere differentielle Reaktion erfolgt als bei *L. digitata*.

Um eine solide Datenbasis auch für spätere Experimente zu haben, wurden die Plasmid-Inserts aller Klone, die für die Herstellung des *Laminaria*-Mikroarrays verwendet wurden, sequenziert und einer BLAST-Analyse unterzogen. Die Annotationen wurden dabei automatisch durch das „Sequence Analysis and Management System“ (SAMS) des Zentrums für Biotechnologie (*CeBiTec*) der Universität Bielefeld durchgeführt.

Tabelle 3.3-3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Annotation während in Tabelle 3.3-4 die Ergebnisse der Annotationen für diejenigen Sequenzen dargestellt ist, denen eine bestimmte Funktion zugeordnet werden konnte. Die ribosomalen Proteine sind nicht dargestellt.

**Tabelle 3.3-3:** Überblick über die mittels *SAMS*-Analyse untersuchten und identifizierten Sequenzen von *L. saccharina*.

<b>Anzahl der untersuchten Sequenzen</b>	2208
<b>Anzahl der mittels <i>SAMS</i>-Analyse identifizierten Sequenzen</b>	667
<b>Davon:</b>	
<b>Hypothetische Proteine</b>	440
<b>Proteine, die bestimmten Gruppen zugeordnet werden konnten</b>	227
<b>Ribosomale Proteine</b>	112
<b>Photosynthese</b>	16
<b>Stress und Abwehr</b>	21
<b>Regulationsprozesse</b>	37
<b>Stoffwechsel und weitere zelluläre Prozesse</b>	41

**Tabelle 3.3-4:** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Annotation (mittels automatischer *SMAS*-Analyse) für die sequenzierten cDNA-Inserts der Genbibliothek, die für *Laminaria saccharina* hergestellt wurde. Angegeben sind die ermittelten wahrscheinlichsten Treffer mit den entsprechenden e- und Score-Werten sowie dem jeweiligen Organismus und der zugehörigen Akkzessionsnummer.

<b>PHOTOSYNTHESE</b>							
<b>Gen</b>	<b>Anzahl Klone</b>	<b>e-Wert</b>	<b>Organismus</b>	<b>Score-Wert</b>	<b>Länge</b>	<b>Akkz.-Nr.</b>	<b>Klon-Name</b>
Photosystem II P680 chlorophyll A apoprotein	2	2,2e-91	<i>O. sinensis</i>	334	613	Gi1346844	P01A05
Photosystem II D2 protein	2	7e-108	<i>P. littoralis</i>	399	575	AY876245	P15E07
Photosystem Q (D1, psbA)	2	5e-86	<i>L. digitata</i>	326	519	Gi46487092	P11H04
Fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein B, chloroplast precursor	3	7e-161	<i>L. saccharina</i>	575	651	AF226859	P11B03
Fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein C, chloroplast precursor	1	1e-15	<i>M. pyrifera</i>	82	577	Q40299	P05F01
Chlorophyll a-b binding protein L1818, chloroplast precursor.	1	8,6e-14	<i>C. reinhardtii</i>	80	771	CAA64632	P22A07
Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplast.	1	5,2e-40	<i>C. merolae</i>	165	616	CMO314C (KEGG)	P17A10
light-independent protochlorophyllide reductase	1	9,1e-44	<i>P. purpurea</i>	174	455	P51187	P19H11
ribulose-bisphosphate carboxylase large chain	1	2e-119	<i>E. siliculosus</i>	427	787	P24313	P23H11
ribulose-bisphosphate carboxylase small chain	1	7,7e-74	<i>E. siliculosus</i>	276	734	P24395	P20A02
Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast precursor	3	1,6e-14	<i>C. merolae</i>	80	572	CMI196C	P06G09

<b>STRESS &amp; ABWEHR</b>							
<b>Gen</b>	<b>Anzahl Klone</b>	<b>e-Wert</b>	<b>Organismus</b>	<b>Score-Wert</b>	<b>Länge</b>	<b>Akkz.-Nr.</b>	<b>Klon-Name</b>
NADPH--cytochrome P450 reductase	1	2,3e-17	<i>C. roseus</i>	87	551	QO5001	P20G01
mercuric reductase	1	5,5e-59	<i>R. baltica</i>	229	744	RB11205 (KEGG)	P02A08
Luminal-binding protein 3	1	1,2e-42	<i>N. tabacum</i>	172	755	Gi729619	P04H08
Chaperone protein dnaK (HSP70)	3	5e-103	<i>C. merolae</i>	373	900	Q85FW4	P18B03
Heat shock protein STI	1	1e-26	<i>C. hominis</i>	122	776	Chro.20201 (KEGG)	P05A12
Peptide methionine sulfoxide reductase	1	1,5e-19	<i>A. thaliana</i>	93	364	KOG1635	P13A01
Putative peroxiredoxin bcp	1	2,6e-17	<i>H. pylori</i>	88	804	Q9ZMU4	P21E09
Thioredoxin.	2	4,2e-23	<i>G. cydonium</i>	108	809	Q96952	P08D10
Glutathione S-transferase 1	1	4e-18	<i>C. elegans</i>	91	855	KOG1695	P21B10
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA	1	1e-46	<i>B. napus</i>	184	594	P46523	P01F10
Ubiquitin.	8	3e-142	<i>A. thaliana</i>	503	855	KOG0001	P14E01
<b>REGULATION</b>							
<b>Gen</b>	<b>Anzahl Klone</b>	<b>e-Wert</b>	<b>Organismus</b>	<b>Score-Wert</b>	<b>Länge</b>	<b>Akkz.-Nr.</b>	<b>Klon-Name</b>
Translationally-controlled tumor protein homolog	9	3,8e-28	<i>O. sativa</i>	124	793	549063	P05C10
Ras-related protein Rab-1A.	1	1,7e-64	<i>R. norvegicus</i>	244	587	Q6N487	P03H06
calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID	1	1,7e-37	<i>A. thaliana</i>	154	736	KOG0032	P04G01
Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1	15	2,6e-95	<i>D. rerio</i>	347	813	3023849	P08H05
Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein.	3	1,1e-97	<i>C. reinhardtii</i>	355	677	P25387	P13D01
eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	2	5,4e-58	<i>A. thaliana</i>	223	748	KOG0052	P10G04
F-box-like/WD-repeat protein TBL1Y	1	3,9e-60	<i>H. sapiens</i>	230	648	Q9BQ87	P11A11
Elongation factor Ts (EF-Ts).	1	1,5e-68	<i>F. vesiculosus</i>	268	481	DQ307683	P11D03
Cell division protein ftsH homolog (EC 3.4.24.-).	1	5,7e-12	<i>P. purpurea</i>	69	467	P51327	P14G05
Probable cyclin-dependent kinases regulatory subunit.	1	4,4e-27	<i>A. thaliana</i>	120	826	4063484	P20D08
Elongation factor 3 (EF-3).	1	5e-28	<i>P. carinii</i>	123	557	P29551	P23A10
helicase, putative	1	2,7e-41	<i>C. muridarum</i>	170	804	TC0602	P23G08
<b>STOFFWECHSEL &amp; WEITERE ZELLULÄRE PROZESSE</b>							
<b>Gen</b>	<b>Anzahl Klone</b>	<b>e-Wert</b>	<b>Organismus</b>	<b>Score-Wert</b>	<b>Länge</b>	<b>Akkz.-Nr.</b>	<b>Klon-Name</b>
NADH-ubiquinone oxidoreductase B14 subunit	1	1,6e-14	<i>B. taurus</i>	79	824	Q02366	P03D06
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 2	1	1,2e-18	<i>A. thaliana</i>	92	794	KOG3446	P20A08
Cytochrome b559 alpha subunit	2	1,1e-37	<i>C. merolae</i>	158	715	CMV231C (KEGG)	P17E10



Cytochrome c-550 precursor (Cytochrome c550).	1	3,6e-59	<i>G. theta</i>	227	802	078454	P18A08
ATP synthase F1, beta subunit	2	1,3e-72	<i>P. littoralis</i>	282	764	X60329	P19B09
ATP synthase beta subunit	1	2e-102	<i>F. vesiculosus</i>	381	708	DQ307681	P20D11
long-chain fatty acid CoA ligase, putative	1	1e-27	<i>P. falciparum</i>	124	497	PFE1250w (KEGG)	P09A12
acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	1	1e-26	<i>C. porcella</i>	119	577	Q9Z1NO	P10A05
Protein transport protein SEC61 gamma subunit.	4	1,9e-14	<i>C. elegans</i>	78	571	Q19967	P21B04
Succinyl-CoA ligase	1	5,3e-12	<i>A. thaliana</i>	70	771	P68209	P05F12
Probable acetyltransferase san	3	1,8e-30	<i>D.malanogaster</i>	132	869	Q9NHD5	P23F04
Urease accessory protein ureG.	1	1e-28	<i>H. pylori</i>	126	758	Q09066	P06H12
Protein TAR1	5	9,1e-19	<i>C. albicans</i>	95	633	Orf.196834.10 (KEGG)	P08D05
BET1 homolog	1	2,2e-11	<i>M. musculus</i>	69	829	035623	P09E07
inorganic pyrophosphatase	1	4,8e-42	<i>A. thaliana</i>	168	465	KOG1626	P16A05
Dynein 18 kDa light chain, flagellar outer arm.	1	4,3e-32	<i>C. reinhardtii</i>	137	738	Q39584	P05H10
Caltractin (Centrin).	1	2e-87	<i>S. lomentaria</i>	332	793	AB127360	P18G03
Adenosylhomocysteinase	1	6,7e-14	<i>B. japonicum</i>	75	403	Q89HP6	P22G01
S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	2				646		P22G02
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3	1	6,8e-57	<i>S. cerevisiae</i>	220	755	P32899	P22H06
Probable histone deacetylase 1-A	1	5,8e-14	<i>X. laevis</i>	76	582	3023937	P01C01
Histone H2A-III.	1	9,4e-68	<i>C.reinhardtii</i>	266	759	CREHIH3G	P15F05
Histone H3.	1	1,1e-42	<i>A. formosa</i>	173	817	P22843	P06G05
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	1	8,6e-16	<i>A. thaliana</i>	82	744	KOG3503	P02D12
Ribosome-binding protein 1	1	2,6e-12	<i>M. musculus</i>	71	695	Q99P25	P04E08
similar to ES/130-related protein	1	2,7e-11	<i>R.norvegicus</i>	70	666	501805 (KEGG)	P06C02
Protein C9orf41.	1	1,4e-23	<i>H. sapiens</i>	108	588	Q8N430	P16F03

Für die so identifizierten Gene wurden die mittels Mikroarray-Analyse erhaltenen Expressionwerte für die verschiedenen *Laminaria*-Arten ermittelt und sind vergleichend in Tabelle 3.3-5 dargestellt. Dabei sind nur solche Gene gezeigt, für die eine signifikante Induktion bzw. Repression ermittelt werden konnte.

**Tabelle 3.3-5:** Zusammenfassende Darstellung der mittels Mikroarray-Analysen erhaltenen Expressionswerte für Gene verschiedener *Laminaria*-Arten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 (*L. solidungula* und junge Thalli von *L. saccharina*) bzw. 3 unabhängigen Experimenten (*L. digitata* und Sporen von *L. saccharina*) und jeweils 2 Wiederholungen sowie in Klammern die jeweiligen Standardabweichungen. (grün = reprimiert; rot = induziert; Dauer der UV-Exposition bei allen Arten: 12 Stunden). Es sind nur solche Gene aufgeführt, für die eine signifikante Induktion bzw. Repression ermittelt werden konnte.

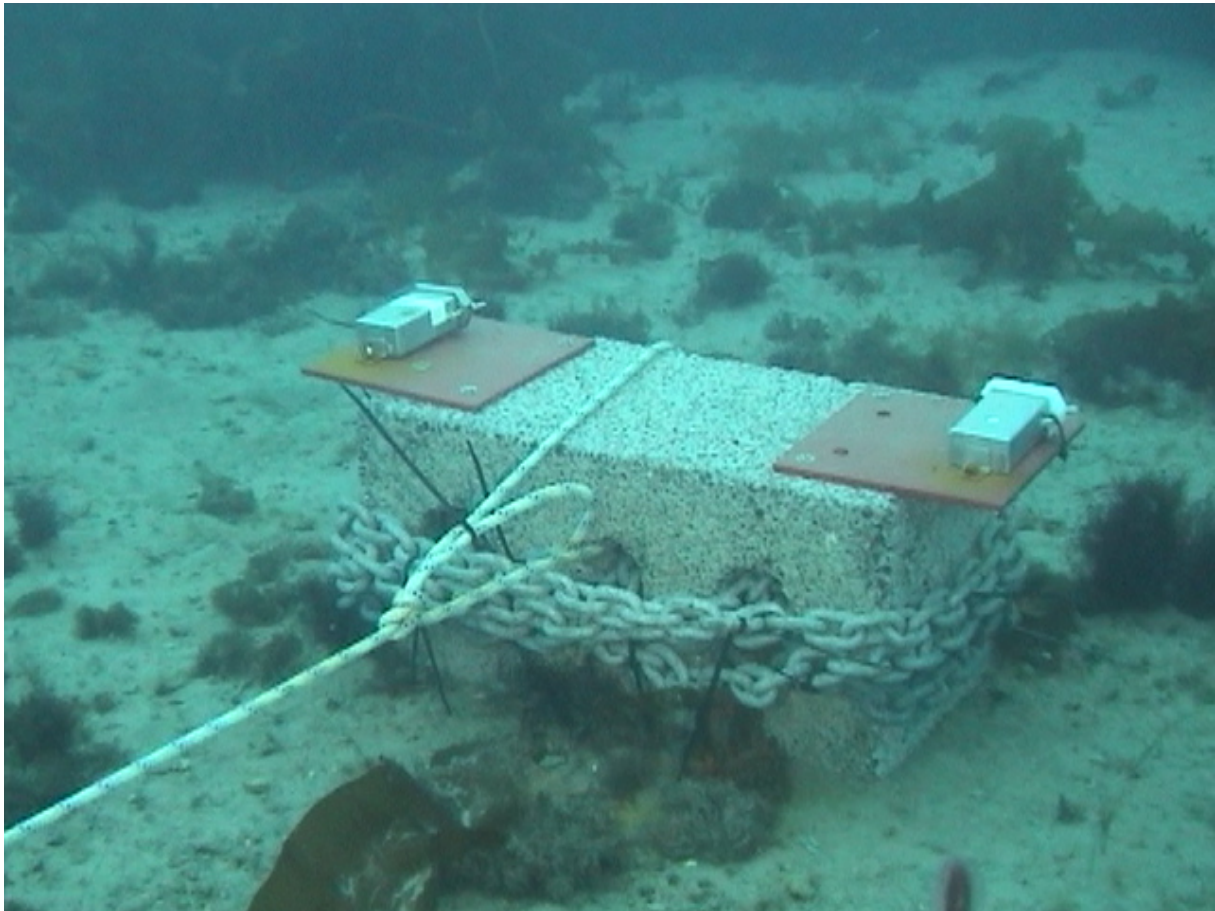
	<i>Laminaria digitata</i>	<i>Laminaria solidungula</i>	<i>L. saccharina</i> , junge Thalli	<i>L. saccharina</i> , Sporen
Photosystem II P680 chlorophyll A apoprotein			1,50 (+/-0,59)	
Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast precursor				0,66 (+/-0,04)
mercuric reductase	-1,22 (+/-0,57)			
Glutathione S-transferase 1	0,22 (+/-0,11)		2,79 (+/-0,10)	
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA				-0,41 (+/-0,12)
Thioredoxin	-0,33 (+/-0,14)		3,01 (+/-0,31)	
Chaperone protein dnaK				-0,35 (+/-0,13)
Cell division protein ftsH homolog (EC 3.4.24.-)	-0,93 (+/-0,38)	-0,86 (+/-0,09)		
eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1		1,96 (+/-0,53)	3,27 (+/-0,31)	-1,78 (+/-0,81)
Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1		0,55 (+/-0,10)	-0,43 (+/-0,04)	
Probable cyclin-dependent kinases regulatory subunit			2,90 (+/-0,27)	
Protein TAR1		0,91 (+/-0,39)	-1,50 (+/-0,71)	
acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl		-2,24 (+/-0,40)		
ATP synthase F1, beta subunit		1,77 (+/-0,45)		
NADH-ubiquinone oxidoreductase B14 subunit				0,75 (+/-0,24)

### 3.4 Beobachtungen im Freiland

Die Feldreise in das Untersuchungsgebiet auf Spitzbergen wurde in 2004 relativ früh im Jahr, von April bis Juni, durchgeführt. Zu Beginn dieses Zeitraums befanden sich im Inneren des Kongsfjordes noch ausgedehnte Flächen geschlossenen Meereises, das teilweise eine Mächtigkeit von etwa zwei Metern erreichen konnte.

Da eine geschlossene Meereisdecke den Großteil der einfallenden Sonnenstrahlung abschirmt, sind die darunter lebenden Makroalgen zu diesem frühen Zeitpunkt im Jahr noch an sehr geringe Lichtintensitäten angepasst. Durch ein Zusammenwirken von bestimmten hydrographischen Gegebenheiten, Wind und ansteigenden Temperaturen im Frühjahr kann diese Eisdecke mitunter innerhalb weniger Stunden aufbrechen und abgetrieben werden. Die vorher unter Schwachlichtbedingungen lebenden Algen können so an einem sonnigen Tag und klarem Wasser innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes von wenigen Stunden in Starklichtbedingungen versetzt werden.

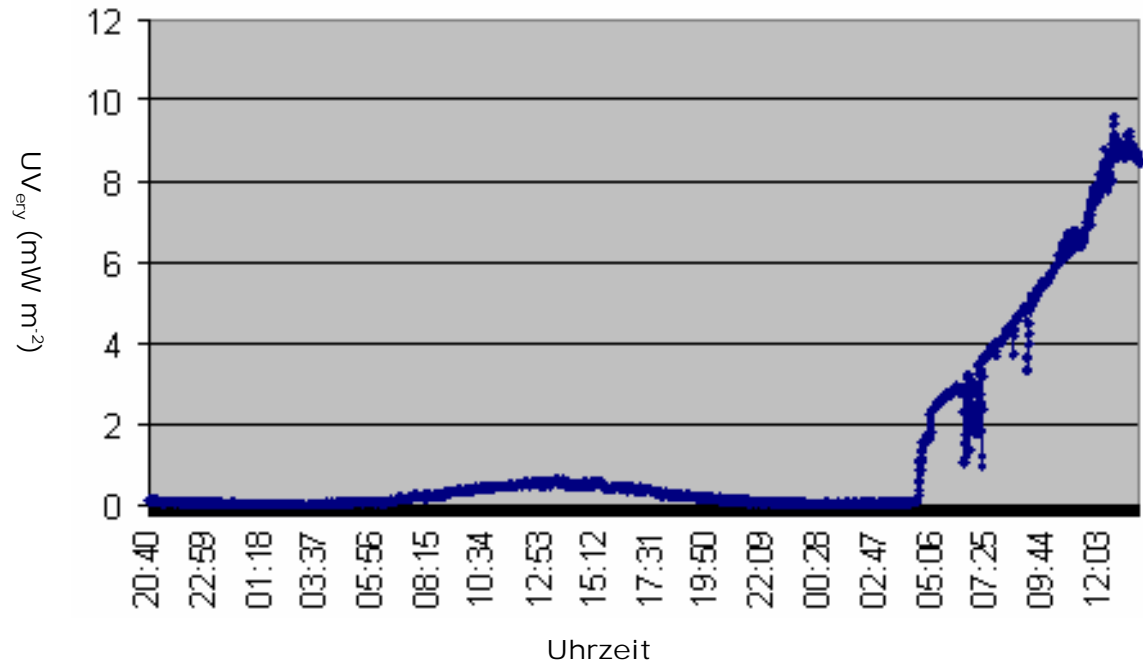
Das Aufbrechen des Meereises konnte während der Expedition 2004 beobachtet und dokumentiert werden. Dazu wurden zwei *ELUVI4*-Messgeräte etwa 30 Meter von der Eiskante entfernt unter der geschlossenen Eisdecke in etwa vier Metern Tiefe auf dem Meeresboden installiert (siehe Abbildung 3.4-1).



**Abbildung 3.4-1:** *ELUVI4*-Messgeräte, die zur Erfassung der UV-Strahlung in einer Wassertiefe von etwa vier Metern unter einer geschlossenen Eisdecke installiert wurden. Die Geräte wurden mittels Kunststoffplatten auf einem Betonstein fixiert, der zur besseren Stabilisierung zusätzlich mit einer Eisenkette beschwert war. Die in der unteren Bildhälfte zu sehende Leine diente den Tauchern, die Messeinrichtung unter der geschlossenen Eisdecke zu finden.

Die Mächtigkeit der Eisdecke betrug an dieser Stelle etwa einen Meter, die Oberfläche des Eises war mit Schnee bedeckt. Der Meeresgrund ist hier eben und mit Sediment bedeckt, das von kleinen und größeren Steinen durchsetzt ist. Auf diesen hat sich eine relativ dichte Makroalgen-Vegetation angesiedelt, welche v.a. von Braunalgen der Gattungen *Laminaria*, *Alaria* und *Saccorhiza* dominiert wird.

Am 28. Mai 2004 kam es zu einem raschen Aufbrechen des Eises, was anhand der Messungen des *ELUVI4*-Messgerätes gut dokumentiert werden konnte. Abbildung 3.4-2 zeigt die Messwerte kurz vor und während des Aufbrechens der Eisdecke, während in Abbildung 3.4-3 das Aufbrechen des Küsteneises über einen weiten Teil des Kongsfjordes im Frühjahr 2004 zu sehen ist.



**Abbildung 3.4-2:** UV-B-Strahlung unter einer geschlossenen Eisdecke und nach Aufbrechen der Eises am 28.05.2004, gemessen mit einem *ELUV14*-Messgerät in etwa 4 Metern Wassertiefe (Erythema-gewichtet UV<sub>ery</sub>; El Naggar et al. 1995)



**Abbildung 3.4-3:** Aufbrechen des Küsteneises in einem größeren Abschnitt des südlichen Kongsfjordes im Frühjahr 2004.

Wie zu erkennen ist, kam es hier innerhalb kurzer Zeit zu einem massiven Anstieg der UV-Strahlungswerte. Bei Tauchgängen an der durch das Messgerät markierten Stelle konnten in den folgenden Tagen ein Ausbleichen und Absterben zahlreicher Individuen von *Laminaria saccharina* beobachtet werden. Die betroffenen Exemplare waren entweder nur an einigen Stellen des Thallus ausgebleicht oder, in der Regel mit Ausnahme des Cauloids, bereits völlig pigmentlos. Abbildung 3.4-4 zeigt gesunde und teilweise ausgebleichene Individuen von *L. saccharina* während in Abbildung 3.4-5 ein bereits völlig verblichenes Exemplar am Meeresgrund in etwa 4 Metern Tiefe zu sehen ist.



**Abbildung 3.4-4:** Intakte (rechts) und teilweise ausgebleichene (links) Exemplare von *L. saccharina*, die nach Aufbrechen der Eisdecke in etwa 4 Metern Wassertiefe gesammelt wurden.



**Abbildung 3.4-5:** Völlig ausgebleichenes Exemplar von *L. saccharina* an einer Stelle, an der wenige Tage zuvor die Meereisdecke aufgebrochen war in etwa 4 Metern Wassertiefe.

Etwa zwei Wochen nach Aufbrechen der Eisdecke, also ab Mitte Juni, kam es durch einen Anstieg der Lufttemperatur und der damit einhergehenden Schneeschmelze zu einem vermehrten Eintrag von Süßwasser und Schmutzpartikeln in den Kongsfjord, was zu einer verstärkten Eintrübung des Wassers führte. Dabei war auch ein deutlicher Rückgang des Anteils ausgebleichter Individuen von *L. saccharina* an der Beobachtungsstelle zu verzeichnen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einführung und methodische Ansätze

Die Zunahme der hochenergetischen UV-Strahlung an der Erdoberfläche, die mit der saisonal und regional stark schwankenden Ausdünnung der stratosphärischen Ozonschicht in Zusammenhang steht, und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Biosphäre, werden seit Langem intensiv erforscht. Pflanzen sind dabei in besonderem Maße von der UV-Strahlung betroffen, da sie zum einen zur Energiegewinnung mittels Photosynthese auf Licht angewiesen sind und zum anderen nicht in der Lage sind, wie etwa viele Tiere, durch aktive Bewegung Orte geringerer Strahlungsdichten aufzusuchen. Pflanzen mussten also besondere Strategien entwickeln, um mit hohen Strahlungsintensitäten umzugehen und dabei eine effektive Energiegewinnung aufrecht zu erhalten (Madronich et al. 1998; Jansen et al. 1998; Rozema et al. 2002)

Neben Landpflanzen können auch aquatische Pflanzen von einer Zunahme der UV-Belastung betroffen sein. Wie stark diese Belastung ausfällt, hängt dabei von vielen Faktoren, wie etwa der Verbreitungstiefe der jeweiligen Art und verschiedenen hydrographischen Gegebenheiten ab. In den Polargebieten trifft man dabei auf ein spezielles Zusammenwirken verschiedener Umwelteinflüsse, die hohe Anforderungen an die dort lebenden Meeresalgen stellen. Faktoren, die das Unterwasser-Lichtklima stark beeinflussen sind die langen Dunkel- (Polarnacht) bzw. Dauerlichtperioden (Polartag), die Eisbedeckung der Küstengewässer bis in das Frühjahr und der Trübstoffeintrag durch die Schneeschmelze. Im Frühjahr kann es durch das rasche Aufbrechen des Meereises und der dann bereits herrschenden langen Sonnenscheindauer zu einem sprunghaften Anstieg der Strahlungsintensität in dem zu dieser Zeit in der Regel noch sehr klaren Wasser kommen. Erschwerend kommt hinzu, dass gerade im Frühjahr häufig eine maximale Ausdünnung der stratosphärischen Ozonschicht über dem Nordpolargebiet auftritt, was zu einer deutlichen Zunahme der die Erdoberfläche erreichenden UV-Strahlung führen kann. (Bischof et al. 2002)

Wie arktische Makroalgen mit einer solchen Zunahme der UV-Strahlungsbelastung umgehen, wird seit vielen Jahren vor allem an benthischen Großalgen des Kongsfjordes auf der arktischen Inselgruppe Spitzbergen untersucht. Die bisherigen Ergebnisse auf physiologischer Ebene zeigen, dass viele Makroalgen sehr effektiv dazu in der Lage sind, mit der in ihrer jeweiligen Verbreitungstiefe auftretenden Strahlungsintensität umzugehen. Sie verfolgen dazu



verschiedene Strategien, um die schädlichen Auswirkungen der UV-Strahlung auf ein Minimum zu reduzieren. (Bischof et al. 2006)

Bisher liegen aber für marine Makroalgen noch kaum Ergebnisse vor, die zeigen, welche Veränderungen auf der Ebene der Genexpression stattfinden und damit weiterführende Aussagen über die molekularen Prozesse bei der Anpassung an eine hohe Strahlungsbelastung zulassen würden. Ziel dieser Arbeit war es, einen ersten Überblick über die bei der UV-Antwort beteiligten Gene bei verschiedenen Makroalgen zu gewinnen und damit, neben dem Aspekt der Etablierung verschiedener Methoden, eine Ausgangsbasis für gezieltere Untersuchungen bestimmter molekularer Prozesse auf der Ebene der Transkription oder Translation zu schaffen.

Um differentiell durch UV-Strahlung exprimierte Gene identifizieren zu können, kam zunächst die Methode der *Subtraktiven Suppressions-Hybridisierung (SSH)* in Kombination mit Makroarray-Analysen zur Anwendung. Die *SSH* erlaubt die Anreicherung differentiell exprimierter Transkripte, die dann amplifiziert und kloniert werden können. Die so resultierende Genbibliothek kann zur Herstellung von Makro- oder Mikroarrays genutzt werden, die dann das gezielte Durchmusterung der Genbibliothek nach differentiell exprimierten Transkripten gestattet. Dieser Ansatz wurde bereits erfolgreich für verschiedene menschliche und tierische Zelltypen (Yang et al. 1999; Liu et al. 2003) und höhere Pflanzen (Sävenstrand et al. 2000; Heidenreich et al. 2001) angewandt.

Die Methode der *SSH* und Makroarray-Analysen sollten nun zunächst für die Braunalge *Laminaria saccharina* eingesetzt werden. *L. saccharina* ist eine an den Küsten der gemäßigten und polaren Breiten sehr häufige Makroalge, die auf physiologischer Ebene bereits gut untersucht ist und auch durch ihre vertikale Verbreitung durchaus biologisch relevanten UV-Strahlungsintensitäten ausgesetzt sein kann.

Bei Anwendung der erwähnten Methoden für *L. saccharina* ergaben sich jedoch verschiedene Probleme. So war es relativ aufwendig, die für die Herstellung einer Subtraktiven Genbibliothek und die anschließenden Makroarray-Analysen notwendige Menge an RNA zu erhalten. Die gängigen Methoden zur RNA-Extraktion aus Pflanzen liefern bei Braunalgen aufgrund der hohen Polysaccharid- und Polyphenolgehalte, v.a. in älteren und stärker differenzierten Individuen, nur sehr geringe Ausbeuten an RNA. Eine modifizierte Methode von Apt et al. (1995) entfernt zwar durch eine Ethanol-Fällung die störenden Polysaccharide, jedoch waren auch mit dieser Methode nur geringe RNA-Ausbeuten zu erzielen.

Ein weiteres Problem ergab sich durch den bei der *SSH* notwendigen Restriktionsverdau der cDNA-Population mit *RsaI*, um diese auf die Ligation mit verschiedenen Adaptoren

vorzubereiten. Dies führte schließlich zur Klonierung kurzer cDNA-Fragmente von nur 80 bis 300 bp Länge. Bei der Annotation der entsprechenden Sequenzen, die ja auf dem Vergleich mit bereits bekannten Gen-Sequenzen beruht und somit auch von der Länge abhängig ist, konnten daher nur sehr wenigen (etwa 8 %) der untersuchten Plasmid-Inserts eine bestimmte Identität zugeordnet werden.

Im Fall der Braunalgen kommt erschwerend hinzu, dass diese einer phylogenetisch eher isolierten Gruppe, den *Heterokontophyta* (denen auch die Kieselalgen – *Diatomeen* - und Panzergeißler – *Peridineen* - zugerechnet werden) angehören. Aufgrund der bereits frühen evolutiven Abspaltung der *Heterokontophyta* von den Vorläufern der rezenten grünen Pflanzen, bestehen zwischen diesen auch auf Gen-Sequenzebene große Unterschiede, die eine Identifizierung von Braunalgen-Genen über einen Sequenzvergleich deutlich erschweren. Von Organismen aus der Gruppe der *Heterokontophyta* sind bisher vergleichsweise wenige Sequenzdaten bekannt.

Um eine größere Anzahl an identifizierbaren Gensequenzen zu erhalten und die Anwendbarkeit der molekularbiologischen Methoden für marine Makroalgen testen zu können, wurden zwei Grünalgen, *Acrosiphonia sp.* und *Monostroma arcticum* für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Aufgrund der näheren evolutiven Verwandtschaft dieser Algen zu den Landpflanzen und *Chlamydomonas reinhardtii*, einer genetisch bereits gut charakterisierten einzelligen Grünalge, war hier mit besseren Resultaten als bei *L. saccharina* zu rechnen. Beide Algen sind ebenfalls häufig an den Küsten der Nordpolarregion anzutreffende Arten und können in ihrem natürlichen Lebensraum einer biologisch relevanten UV-Belastung ausgesetzt sein. Zudem weisen beide Algen für Untersuchungen von UV-Effekten interessante Charakteristika auf. Der flächige Thallus von *M. arcticum* besteht aus nur einer einzigen Zellschicht, wohingegen Pflanzen von *Acrosiphonia sp.* aus einzelnen Zellfäden bestehen, die sich übereinander legen und somit gegenseitig beschatten können.

Die Extraktion von RNA gestaltete sich bei diesen Algen-Arten einfacher als bei *L. saccharina*. Hier konnte ein Protokoll zur RNA-Extraktion von Chang et al. (1993) erfolgreich eingesetzt werden, dennoch ließen sich auch hier keine besonders hohen Ausbeuten erzielen. Offenbar besitzen auch diese Algen Inhaltsstoffe oder Auflagerungen, welche die RNA-Extraktion stören.

Mittels *SSH* und anschließender Durchmusterung der resultierenden Genbibliotheken mit Hilfe der Makroarray-Technologie ließen sich auch bei *Acrosiphonia sp.* und *M. arcticum* keine größeren Zahlen an Genen identifizieren, im Falle von *M. arcticum* lag diese sogar noch

unter derjenigen, die bei *L. saccharina* ermittelt wurde. Dies lag sicherlich ebenfalls an der geringen Länge der Sequenzen und der damit niedrigen Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Identifizierung mittels Sequenzvergleich. Verbessert hatte sich allerdings die Rate der Sequenzübereinstimmungen bei einem erfolgreichen Treffer und damit die Wahrscheinlichkeit, dass das betreffende Gen tatsächlich mit der ermittelten Identität übereinstimmt (e-Wert).

Um nun auch eine Verbesserung der Trefferquote bei der Annotation zu erreichen, mussten die Sequenzlängen in der Genbibliothek deutlich gesteigert werden. Um dies zu erreichen, wurde eine Methodik angewandt, der bereits von Lévesque et al. (2003) erfolgreich für tierische Zellen eingesetzt wurde. Dieser Ansatz benutzt die *SMART*-Methode (Clontech), bei der die zu untersuchende mRNA unter Verwendung eines speziellen Oligo(dT)-Primers in der RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben wird und dann mittels PCR amplifiziert werden kann. Die Methode lieferte im Fall beider Grünalgen lange cDNA-Fragmente (300 bis 1500 bp), die dann nach Auftrennung in einem Agarosegel gröbenselektiv eluiert wurden. Für die anschließende Herstellung von Genbibliotheken wurden Fragmente von mehr als 500 bp Länge verwendet. Da diese gröbenselektionierten Genbibliotheken aber nicht, wie zuvor mittels *SSH*, für differentiell exprimierte Transkripte angereichert werden konnte, musste hier bei der Durchmusterung mittels Makroarray-Analyse mit einer geringeren Anzahl an unterschiedlich regulierten Genen gerechnet werden. Aus diesem Grund wurden zur Herstellung der Makroarray-Membranen deutlich mehr Klone verwendet, als im Falle von *L. saccharina* (*L. saccharina*: 672; *Acrosiphonia* sp.: 1440; *M. arcticum*: 1344), was zur Folge hatte, dass hier keine internen Wiederholungen gespottet werden konnten. Bei *L. saccharina* hatte sich allerdings gezeigt, dass die Spots der Wiederholungen stets in gleicher Weise reagierten, weshalb es im Falle der Grünalgen als wichtiger erschien, mehr Klone der Genbibliotheken durchmustern zu können.

## 4.2 Beobachtungen im Freiland

Während der Feldreise nach Spitzbergen in 2004 konnte im Frühjahr das Aufbrechen des Küsteneises und die Auswirkungen auf die darunterliegende Algenvegetation direkt beobachtet werden. Innerhalb weniger Stunden kam es an einer Stelle, an der zuvor UV-Messgeräte installiert wurden, zu einem kompletten Wegbrechen der Eisdecke was die darunterliegende Algenvegetation einem sprunghaften Anstieg der Strahlungsintensität

aussetzte. Die UV-Bestrahlungsstärke nahm im zu dieser Zeit noch sehr klaren Wasser innerhalb von 7 Stunden um den etwa 10fachen Wert zu, der zuvor unter der Eisdecke maximal erreicht werden konnte. Da an diesem Tag eine Wolkendecke die direkte Sonneneinstrahlung verhinderte, ist zu vermuten, dass diese Zunahme an einem sonnigen Tag unter Umständen noch deutlicher ausfallen kann. (Brey et al. 2006)

Bei Tauchgängen an dieser Stelle in den nächsten Tagen war dort eine massive Zunahme an Individuen von *L. saccharina* zu beobachten, deren Thalli teilweise oder auch völlig ausgebleichen war. Es ist zu vermuten, dass dieses Ausbleichen auf eine strahlungsinduzierte Schädigung von photosynthetischen Pigmenten zurückzuführen ist. Die an Schwachlicht-Bedingungen adaptierten Algen waren möglicherweise durch das rasche Aufbrechen der Eisdecke und der damit verbundenen massiven Zunahme der Strahlungsintensität nicht in der Lage, schnell genug effiziente Schutzmechanismen in Gang zu bringen. Diese Befunde zeigen, dass die arktische Algenvegetation durch ein Zusammenwirken verschiedener Faktoren durchaus einem für sie schädlichen Ausmaß an Sonnenstrahlung ausgesetzt sein kann, die zu Beeinträchtigungen oder sogar Absterben der betroffenen Individuen führen kann. Inwieweit diese Schäden durch UV-Strahlung ausgelöst werden oder in erster Linie starklicht-induziert sind, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Möglicherweise könnten hier UV-Ausschluss-Experimente im Feld zur Klärung beitragen.

### **4.3 UV-Effekte auf die Genexpression bei *Acrosiphonia* sp.**

Die für *Acrosiphonia* sp. hergestellten Makroarrays wurden sowohl mit cDNA aus der SSH, als auch mit cDNA, die direkt aus der RNA von Versuchspflanzen synthetisiert wurde, hybridisiert. Die für die SSH-Analyse eingesetzte RNA stammte dabei aus Algen, die für 12 Stunden UV-exponiert wurden. Für den UV-Bestrahlungsversuch im Labor wurden Expositionszeiten von 4, 12 und 24 Stunden gewählt. Die Bestrahlungsstärke orientierte sich dabei an Versuchen, die bereits an *Acrosiphonia* sp. durchgeführt wurden (Aguilera et al. 2002), um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Für alle Versuche mit *Acrosiphonia* sp. wurde ausschließlich Kulturmaterial eingesetzt, da die im Feld gesammelten Pflanzen schwer von morphologisch ähnlichen Arten unterscheidbar waren und zudem in hohem Maße von Aufwuchs durchsetzt waren. Beides erschien hinderlich, um aus diesem Material Genbibliotheken zu erstellen und erste Versuche zur Durchmusterung mittels der Array-Technologie durchzuführen.

Insgesamt konnten mittels Makroarray-Analysen 432 Klone der größenselektionierten Genbibliothek als differentiell exprimiert identifiziert werden. Diese wurden sequenziert und mittels *BLAST*-Analyse annotiert. Dabei konnte 114 Sequenzen eine bestimmte Identität zugeordnet werden, was mit etwa 26 % eine deutliche Steigerung der identifizierbaren Sequenzen gegenüber der mittels *SSH* hergestellten Genbibliothek bedeutet. Die verschiedenen Gene lassen sich anhand der Funktion ihrer jeweiligen Genprodukte in mehrere Gruppen einteilen, die im Folgenden zusammen diskutiert werden. Dabei wird auch auf die jeweiligen Expressionsdaten eingegangen, sofern diese statistische Relevanz aufweisen.

#### 4.3.1 Photosynthese

Die Photosynthese stellt als der zentrale lichtabhängige Prozess in Pflanzen ein besonders wichtiges Angriffsziel der UV-Strahlung dar. Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigt, dass eine übermäßige UV-Belastung zu einer Reduktion der Photosynthese-Effizienz führt, wobei hier Effekte auf verschiedene Teilprozesse wie Elektronentransport, Photophosphorylierung und Kohlenstoff-Fixierung in unterschiedlichem Ausmaß beitragen können (Mackerness und Jordan 1999; Hanelt et al. 2003b). Variationen der Lichtbedingungen führen bei Pflanzen im Allgemeinen zu Veränderungen in der Häufigkeit verschiedener Komponenten der Photosyntheseapparate (LaRoche et al. 1991; Shapira et al. 1997; Minagawa et al. 2001). Auch bei *Acrosiphonia sp.* konnten mehrere Gene als differentiell exprimiert identifiziert werden, deren Genprodukte für verschiedene Untereinheiten der Photosyntheseapparate codieren. Die Gene für mehrere Komponenten der Lichtsammelkomplexe, darunter diejenigen für Chlorophyll a/b-Bindeproteine, zeigten nach einer 4-stündigen UV-Exposition zunächst eine Inhibition, die dann nach 24 Stunden in eine starke Induktion überging. Dies zeigt, dass die Alge zunächst allgemein mit einer Inhibition der Neusynthese von Komponenten der Lichtsammelkomplexe reagiert, eventuell um damit die Reaktionszentren vor einer überschüssigen Energiezufuhr zu schützen. Nach einer gewissen Akklimatisationszeit beginnt die Pflanze dann mit der Neubildung dieser Komponenten, um sich auf die veränderten Bedingungen einzustellen und möglicherweise geschädigte Bestandteile der Lichtsammelkomplexe zu ersetzen. Eine lichtabhängige Regulation der Transkription der Chlorophyll a/b-Bindeproteine konnte auch in der einzelligen Grünalge *Dunaliella* beobachtet werden (Escoubas et al. 1995).

Eine weitere Untereinheit der Lichtsammelkomplexe stellt das kleine CP26 dar, das neben seiner Funktion bei der Weiterleitung von Lichtenergie zum Photosystem II auch eine Rolle bei der Photoprotektion spielen kann (Wentworth et al. 2003). In *Acrosiphonia* konnte das für CP26 codierende Gen (*lhcb5*) nur mittels *SSH*-Analyse und dabei als schwach reprimiert identifiziert werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen bei der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas*, wo ebenfalls nur eine sehr schwache Regulation der CP26-Expression nachgewiesen werden konnte (Minagawa et al. 2001).

Das Early-light-inducible-Protein (ELIP) weist strukturell eine Ähnlichkeit zu den Chlorophyll a/b-Bindeproteinen auf und findet sich in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten, wobei es auch Wechselwirkungen mit Komponenten des Photosystem II eingehen kann. Es ist vermutlich an Entwicklungsprozessen beteiligt, wurde aber auch als bei UV- und Starklichtstress induziert gefunden. Somit wird auch eine Schutzfunktion der ELIPs für verschiedene Komponenten, u.a. des D1-Proteins diskutiert (Adamska et al. 1992; Montane et al. 1997). Warum das ELIP-Gen bei *Acrosiphonia* im Zuge der UV-Exposition reprimiert wird, ist unklar. Möglicherweise hat das ELIP hier keine Schutzfunktion zu erfüllen und wird zusammen mit verschiedenen anderen Komponenten der Photosynthese-Apparate in der frühen Phase der UV-Exposition herunterreguliert. Eventuell spielen hier andere Proteine eine wichtigere Rolle beim Schutz der Photosysteme, etwas das Cbr-Protein, das in der Grünalge *Dunaliella* als Verwandter des ELIP identifiziert werden konnte (Banet et al. 1999).

Als deutlich induziert wurde mittels *SSH*-Analyse eine Chloroplast  $\omega$ -Desaturase gefunden. Auch in anderen Pflanzen konnte dieses Enzym durch verschiedene Stress-Typen, u.a. Kältestress und Pilzinfektionen, als induziert identifiziert werden. Es gewährleistet eine Anpassung der Fettsäurezusammensetzung von Membransystemen an veränderte Bedingungen und hilft so bei der Bewältigung von Stress-Situationen (Rikin et al. 1993; Kirsch et al. 1997; Khodakovskaya et al. 2006). Dies könnte auch bei der Anpassung von *Acrosiphonia* an eine erhöhte UV-Belastung eine Rolle zu spielen. Zudem ist hier auch denkbar, dass die UV-Strahlung entweder direkt oder über die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies, etwa über Lipidperoxidation, eine Schädigung von Membranen nach sich zieht, welcher die Pflanze mit Neusynthese und Umbau von Fettsäuremolekülen entgegenwirkt.

Ebenfalls als induziert konnte das Gen für die Glyceraldehyd-3-phosphate Dehydrogenase (GAP-DH) identifiziert werden. Diese ist unter anderem an der Phosphorylierungsreaktion im Calvin-Zyklus beteiligt und wurde auch bei oxidativem Stress in *Arabidopsis* als induziert beschrieben (Sweetlove et al. 2002). Eventuell dient dies der Aktivierung der

Dunkelreaktionen um damit überschüssige Energie, die bei der UV-Bestrahlung in den Photosystemen anfällt, abzubauen.

#### 4.3.2 Stress- und Abwehr

Pflanzen haben eine Reihe verschiedener Mechanismen entwickelt, um den schädlichen Effekten der UV-Strahlung entgegenzuwirken. Durch die Reaktion der hochenergetischen UV-Strahlung mit den verschiedenen Molekülen im pflanzlichen Organismus kann es zum einen zur Entstehung toxischer Verbindungen (z.B. Sauerstoffradikale) kommen, die dann von zellulären Schutzmechanismen entgiftet werden müssen. Zum anderen können Proteinmoleküle in ihrer Struktur derart verändert werden, dass sie ihre Funktion verlieren und dann nur von speziellen Chaperon-Molekülen wieder in ihre native Konformation zurückgefaltet werden können. Eine weitere Möglichkeit, schädlichen Auswirkungen der UV-Strahlung zu entgehen, besteht in der Bildung von UV-Schutzsubstanzen, die ein Eindringen der Strahlung in die Pflanze weitgehend verhindern sollen.

Bei *Acrosiphonia* konnten verschiedene typische Stress-assoziierte Gene als differentiell exprimiert gefunden werden. Das Hitzeschockprotein HSP17.7 gehört zur Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine, die in höheren Pflanzen die am häufigsten durch Stress induzierte Gruppe von Proteinen darstellt. Man findet hier mehr als 20 Vertreter, die je nach Stress-Reaktion in unterschiedlichem Ausmaß reguliert werden können und als molekulare Chaperone bei der Rückfaltung denaturierter Proteine helfen (Löw et al. 2000). Bei *Acrosiphonia* konnte bereits 4 Stunden nach Beginn der UV-Exposition eine verstärkte Bildung des HSP17.7-Transkriptes nachgewiesen werden, die dann im weiteren Verlauf des Experimentes inhibiert wurde. Bei einem anderen Mitglied der Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine war hingegen über die gesamte Dauer des Experimentes nur eine Repression der Transkription festzustellen. Mittels *SSH*-Analyse konnte darüberhinaus das Transkript eines weiteren molekularen Chaperons, des Cyclophilins, als reprimiert identifiziert werden. Dieses Protein ist über seine Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerase-Funktion ebenfalls an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt, spielt aber auch bei der Entwicklungskontrolle und Akklimatisierungsprozessen eine Rolle (Somanachi und Moroney 1999). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der Stress-Antwort von *Acrosiphonia* verschiedene Proteine mit Chaperon-Funktion eine Rolle spielen, die im zeitlichen Verlauf

der Bestrahlung in unterschiedlicher Weise induziert oder reprimiert werden und vermutlich auch weitere Funktionen im zellulären Geschehen übernehmen können.

Desweiteren konnten mit der Glutathion *S*-Transferase und der *S*-adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferase zwei Genprodukte identifiziert werden, die an Entgiftungsreaktionen beteiligt sein können. So trägt die Glutathion *S*-Transferase (GST), neben anderen Funktionen, zur Entgiftung von durch oxidativen Stress geschädigten Molekülen bei (Hayes und Strange 1995). Wie die bei *Acrosiphonia* gefundene Repression des entsprechenden Transkriptes im Verlauf der UV-Exposition bewertet werden kann, ist unklar. Dieses Ergebnis deckt sich aber mit den Befunden aus anderen Pflanzen und Cyanobakterien, bei denen unter verschiedenen Stress-Bedingungen ebenfalls eine Repression der GST zu verzeichnen war (Huang et al. 2002; Schäfer und Neuschäfer-Rube, persönliche Mitteilung). Eventuell bieten die verschiedenen anderen Funktionen der GST eine Erklärung für dieses Phänomen, die eine Reprimierung derselben unter bestimmten Bedingungen notwendig machen. Die *S*-adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase wurde hingegen nach einer Reprimierung zu Beginn des Experimentes im weiteren Verlauf induziert. Dies könnte zum einen auf die zunehmende Bedeutung des Enzyms bei der Entgiftung von sich anreichernden toxischen Verbindungen hindeuten. Zum anderen ist aber für dieses Enzym auch eine Funktion im Zusammenhang mit Fraßschutz über die Bildung organischer Thiolate bzw. Thiocyanate beschrieben (Attieh et al. 2002). Dies könnte auch bei der UV-Bestrahlung von *Acrosiphonia* eine Rolle spielen und als Versuch der insgesamt geschwächten Pflanze zu werten sein, sich dem Angriff von Herbivoren zu entziehen.

Mit dem Glutaredoxin konnte eine weitere typische Stress-assoziierte Proteinfunktion identifiziert werden. Glutaredoxin fungiert als Sensor und Regulator des Redoxzustandes verschiedener Enzymaktivitäten und des Glutathion-Systems und ist darüber hinaus an Signaltransduktionswegen in der Zelle beteiligt (Song et al. 2002). Die regulatorische Funktion dieses Enzyms erklärt eventuell auch die nur schwach ausgeprägte differentielle Reaktion, die erst nach 24 Stunden UV-Exposition nachgewiesen werden konnte.

Hinsichtlich der Stress-Antwort könnte auch die Induktion der Flavonol 3-*O*-Glucosyltransferase von Bedeutung sein. Dieses Enzym ist eventuell an der Flavonoid-Biosynthese und damit an der Bildung von UV-Schutzsubstanzen in *Acrosiphonia* beteiligt. Allerdings konnten in ersten Versuchen mittels HPLC-Analyse und UV-Spektroskopie keine Hinweise auf Flavonoid-ähnliche Substanzen in der Alge gefunden werden. Dabei wurden Proben untersucht, die für 24 und 72 Stunden künstlicher UV-Strahlung ausgesetzt waren. Auch in Proben von *M. arcticum*, die zusätzlich mit untersucht wurden, waren keine



derartigen Substanzen nachweisbar. Es ist also möglich, dass dieses Enzym nicht an der Biosynthese von Substanzen aus der Gruppe der Flavonoide beteiligt ist, sondern über seine Fähigkeit, UDP-Glucose auf Moleküle zu übertragen, bei anderen zellulären Prozessen eine Rolle spielt. Denkbar ist aber auch, dass die Bildung von Flavonoiden in *Acrosiphonia* nur langsam geschieht und möglicherweise zu späteren Zeitpunkten der UV-Exposition oder bei stärkerer UV-Bestrahlung doch Substanzen aus dieser Gruppe nachgewiesen werden könnten.

### 4.3.3 Regulationsprozesse

Die vielfältigen Veränderungen, die durch eine verstärkte UV-Bestrahlung in einer Pflanze auf der Ebene der Genexpression stattfinden, werden in der Regel durch eine Vielzahl von regulatorisch wirkenden Proteinen und Signalmolekülen übertragen. (Michal 1999)

Diese liegen entweder bei Beginn der UV-Einwirkung bereits in der Zelle vor oder werden erst selbst über die Wirkung anderer Signalmoleküle in ihrem Expressionsverhalten moduliert. Die meisten regulatorisch wirksamen Proteine werden dabei oft nur in sehr geringen Konzentrationen und in einem zeitlich sehr begrenzten Rahmen gebildet, was die Detektion der entsprechenden Transkripte erschwert. So war zu erwarten, dass bei *Acrosiphonia* v.a. mittels Subtraktiver Hybridisierung, die ja auch eine Anreicherung seltener Transkripte erlaubt, die differentielle Expression regulatorischer Proteine erfasst werden kann. Tatsächlich waren, bis auf zwei Ausnahmen, Veränderungen der Transkriptkonzentrationen bei den identifizierten Genen mit regulatorischer Proteinfunktion nur mittels *SSH*-Analyse nachzuweisen. Dies verdeutlicht die Stärke dieser Methode bei der Erfassung von Transkripten, die nur in geringem Umfang gebildet werden oder nur einer schwachen differentiellen Regulation unterliegen.

Ein Großteil der bei *Acrosiphonia* identifizierten Gene mit regulatorischer Protein-Funktion kann der Gruppe der Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden. Diese verändern durch Bindung an spezifische DNA-Bereiche die Expression der betreffenden Gene und sind damit für die Modulation der Genexpression direkt verantwortlich. Aus übergeordneten Signalwegen konnten ein GTP-bindendes Protein und eine Serin/Threonin-Protein-Kinase identifiziert werden, die beide an verschiedenartigen Signalkaskaden beteiligt sein können und darüber letztendlich ebenfalls die Genexpression beeinflussen können (Michal 1999; Bischoff et al. 1999).

Das G-Strang-bindende Protein bindet an den G-Strang von Telomeren und ist darüber hinaus vermutlich auch an spezifischen Interaktionen mit RNA beteiligt. In *Acrosiphonia* konnte mittels *SSH*-Analyse eine deutliche Induktion des entsprechenden Gens festgestellt werden. Welche Funktion dies bei der Reaktion von *Acrosiphonia* auf eine erhöhte UV-Belastung hat, ist unklar. Möglicherweise dient dies dem Schutz der Telomere, die eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress aufweisen (Johnston et al. 1999; von Zglinicki et al. 2000). Andererseits ist aber auch eine Beteiligung an regulatorischen Vorgängen über eine spezifische Wechselwirkung mit RNA-Molekülen denkbar.

Ebenfalls vermutlich an regulatorischen Prozessen beteiligt ist das Bax-Inhibitor-1-ähnliche Protein. Es ist an der Kontrolle des programmierten Zelltodes (Apoptose) beteiligt (Kawai-Yamada et al. 2001). Die deutliche Induktion in *Acrosiphonia* deutet darauf hin, dass es hier die Aufgabe übernimmt, durch UV-Strahlung induzierte Apoptose zu verhindern und so zellulären Reperaturmechanismen den Vorzug zu geben.

An der Regulation der Translation ist die DEAD-box-RNA-Helicase über die Entwindung von Sekundärstrukturen in mRNA-Molekülen beteiligt. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Stress-Antwort in *Arabidopsis* (Goug et al. 2005). Die ausgeprägte Induktion des korrespondierenden Gens bei der *SSH*-Analyse in *Acrosiphonia* lässt hier ebenfalls auf eine Beteiligung bei der Stress-Antwort schliessen und stimmt mit der lichtabhängigen Induktion dieses Gens in *Synechocystis* überein (Kujat und Owtrim 2000).

#### 4.3.4 Proteinabbau

Der Katabolismus geschädigter oder inaktivierter Proteine spielt bei vielen Stress-Antworten von Pflanzen eine wichtige Rolle. Auch bei *Acrosiphonia* konnten einige daran beteiligte Gene als differentiell exprimiert identifiziert werden. Allerdings sind die Ergebnisse der Expressions-Analysen hier schwer zu interpretieren und sollten mittels weiterer Untersuchungsmethoden genauer betrachtet werden.

Mittels *SSH*-Analyse konnte hier die proteolytische Untereinheit 3 der ATP-abhängigen Clp-Protease als induziert gefunden werden, wohingegen das Gen für eine weitere proteolytische Untereinheit des selben Enzymkomplexes bei einer 24-stündigen UV-Exposition als reprimiert erfasst wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass die proteolytische Funktion der ATP-abhängigen Clp-Protease bei der UV-Stressantwort von *Acrosiphonia* eine Rolle spielen könnte, die aber im Verlauf der UV-Exposition moduliert wird. Eine UV-Induktion dieses

Gens konnte auch bei *Synechocystis* nachgewiesen werden und spielt hier offenbar eine wichtige Rolle bei der UV-Akklimatisierung des Cyanobakteriums (Porankiewicz et al. 1998; Huang et al. 2002).

Auch das Ubiquitin-Proteasom-System übernimmt bei der Degradation geschädigter und inaktiverter Proteine eine wichtige Funktion (Hellmann und Estelle 2002; Schwechheimer und Villalobos 2004). Aus diesem komplexen System konnten auch bei *Acrosiphonia* mehrere Komponenten als differentiell reguliert identifiziert werden. So konnten die Gene für mehrere Untereinheiten des proteinabbauenden 26 S Proteasoms gefunden werden, wobei hier die proteolytische wirksame alpha 3-Untereinheit zu Beginn der UV-Exposition induziert wurde. Nach 24 Stunden UV-Bestrahlung waren hingegen alle 3 der identifizierten Untereinheiten des Proteasoms als reprimiert gefunden worden. Dies lässt vermuten, dass die proteinabbauende Funktion des Proteasoms am Beginn der Bestrahlung zur Degradation geschädigter Proteine induziert wird. Nach einer längeren UV-Exposition kommt es in der Pflanze, möglicherweise durch Induktion von Schutzmechanismen, nicht mehr zu einem vermehrten Auftreten geschädigter Proteine, so dass das Ubiquitin-Proteasom-System nicht mehr in einem erhöhten Umfang benötigt wird und die Expression der entsprechenden Transkripte reprimiert wird. Die mittels *SSH*-Analyse gefundene Induktion einer Ubiquitin-Protein-Ligase, die für die Markierung zum Abbau bestimmter Proteine über das Proteasom verantwortlich ist, zeigt aber, dass auch nach 12 Stunden der UV-Exposition noch ein verstärkter Abbau von Proteinen stattfinden könnte.

#### 4.3.5 Weitere Stoffwechselprozesse

Ein Großteil der bei *Acrosiphonia* gefundenen Gene, die für Enzyme weiterer Stoffwechselwege codieren, konnten hier nur mittels *SSH*-Analyse als differentiell exprimiert identifiziert werden. Dies verdeutlicht, dass die UV-induzierten Veränderungen von Stoffwechselwegen mit nur geringfügigen Änderung der Expression der entsprechenden Gene einhergehen und häufig nur unter Anwendung sensitiver Methoden, wie etwa der *SSH*, aufgedeckt werden können.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Repression des Gens für eine Komponente der Atmungskette, die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase, wie sie auch in *Arabidopsis* bei oxidativem Stress beobachtet wurde. Dies könnte auf eine Reduktion der Atmungsketten-Aktivität zur Minimierung der Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate hindeuten (Sweetlove

et al. 2002) und somit auch bei *Acrosiphonia* eine Rolle zur Minimierung des durch UV-Strahlung induzierten oxidativen Stress spielen. In diesem Kontext steht auch die Induktion der Malat-Dehydrogenase, einer Komponente des sogenannten Malat-Ventils. Dieses System katalysiert den Antiport von Malat/Oxalacetat über die Chloroplasten-Membran und verbraucht dabei überschüssige Reduktionsäquivalente, die während einer partiellen Entkopplung der Thylakoidmembran im Licht entstehen. Diese können dann unter Umgehung der oxidativen Phosphorylierung durch die „Alternative Oxidase“ thermisch entsorgt werden. Dieser Mechanismus spielt bei bestehendem Energieüberschuss, wie er bei Lichtstress vorliegen kann, eine wichtige Rolle in Pflanzen und könnte auch von *Acrosiphonia* genutzt werden (Richter, Universität Mainz). Darüber hinaus scheint der Malat-Metabolismus allgemein bei pflanzlichem Stress, insbesondere bei UV-Exposition und Verwundung, von Bedeutung zu sein (Casati et al. 1999). In diesem Zusammenhang ist vermutlich auch die Repression des Gens für einen Oxoglutarat/Malat-Translokator (OMT) zu sehen, die den Ausstrom von Malat zugunsten des Oxoglutarats im Chloroplasten verhindern könnte und damit die Verfügbarkeit des Malats für das System des Malat-Ventils erhöht. Die lichtabhängige Regulation eines OMT konnte auch in *Panicum* nachgewiesen werden (Taniguchi und Sugiyama 1997).

Desweiteren wurden bei *Acrosiphonia* zahlreiche Gene als differentiell reguliert identifiziert, deren Genprodukte mit dem Aminosäure- und Glutathion-Stoffwechsel in Verbindung stehen. So war mittels *SSH*-Analyse eine Induktion der  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthetase festzustellen, welche an der Biosynthese von Glutathion beteiligt ist. Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist ein wichtiges Reduktans und für viele entgiftende und zellschützende Wirkungen, insbesondere bei oxidativem Stress, verantwortlich (Michal, 1999). In diesem Kontext kann eventuell auch die Repression des Gens für die N-acetyl- $\gamma$ -glutamyl-phosphat Reduktase gesehen werden. Dieses Enzym spielt bei der Synthese von Ornithin aus Glutamat eine wichtige Rolle. Glutamat wird aber auch für die Bildung von Glutathion benötigt, somit könnte die Unterdrückung der Ornithin-Biosynthese die Bildung von Glutathion fördern.

Als leicht induziert wurde das Gen für ein Aminosäure-Transportprotein gefunden, was ein Hinweis auf einen allgemein gesteigerten Aminosäure-Metabolismus sein könnte. Ähnlich bewertet werden kann auch die Repression des Gens für eine Asparagin-Synthetase, welche eine wichtige Rolle bei der Speicherung von Stickstoff in Form von Asparagin spielt. Eine mögliche Reduktion dieser Enzymfunktion könnte eine Abschwächung der Stickstoffspeicherung zugunsten des Aminosäuremetabolismus anzeigen. Eine lichtabhängige Repression der Gene für Asparagin-Synthetasen konnte auch für andere Pflanzen

nachgewiesen werden (Herrera-Rodriguez et al. 2004). Ebenfalls in diesen Kontext passt die Induktion des Gens für einen Nitrat-Transporter, was auf einen gesteigerten Stickstoffbedarf und damit auf die Neusynthese von Aminosäuren in *Acrosiphonia* bei UV-Exposition hindeutet.

Die Induktion des Gens für die Stearoyl-acyl Carrier Protein-Desaturase ist in zweierlei Hinsicht zu deuten. Zum einen ist die durch dieses Enzym katalysierte Konversion von Stearinsäure in Ölsäure der entscheidende Schritt bei der Regulation der Konzentration ungesättigter Fettsäuren in der Zelle und damit vermutlich für die Anpassung der Fluidität von Membranen an den neuen physiologischen Zustand wichtig. Zum anderen ist aber auch eine Rolle bei der Regulation von Jasmonat- oder Salicylat-abhängigen Abwehrsignalwegen denkbar, was für *Arabidopsis* bereits bestätigt werden konnte. (Kachroo et al. 2005)

Wie die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, konnte die differentielle Expression vieler der identifizierten Gene nur mittels *SSH*-Analyse nachgewiesen werden. Im Zuge der *SSH* wird eine Subtraktion und Normalisierung der eingesetzten cDNA-Population durchgeführt, die eine Anreicherung von seltenen und differentiell exprimierten Transkripten zur Folge hat. Dies bedeutet aber auch, dass sich die in der Ausgangsprobe vorhandene Transkriptmenge eines bestimmten Gens verschiebt und die mittels *SSH*-Analyse erhaltenen Expressionsdaten nicht unbedingt dem tatsächlichen Status in der untersuchten Probe entsprechen müssen. Um dies zu überprüfen, wurden einige mittels *SSH*-Analyse als differentiell reguliert gefundene Gene ausgewählt und der Expressionsstatus zu verschiedenen Zeitpunkten der UV-Exposition mittels Real-Time-PCR untersucht. Es zeigte sich, dass in allen Fällen die mittels *SSH*-Analyse gefundene Induktion der Gene zum entsprechenden Zeitpunkt (12 Stunden UV-Exposition) verifiziert werden konnte. Allerdings war hier auch festzustellen, dass die Höhe des Signals bei der *SSH*-Analyse nicht unbedingt dem tatsächlichen Zustand entspricht. Dies zeigt, dass die Stärke der *SSH*-Methode darin liegt, differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, sie jedoch keine eindeutigen Aussagen über den tatsächlichen Betrag der Induktion oder Repression zulässt. Im Falle seltener Transkripte, etwa von schwach exprimierten regulatorischen Genen, die bei einer Array-gestützten Analyse von nicht-subtrahierter cDNA keine Unterschiede im Expressionsverhalten erkennen lassen, bietet sich dann einer Untersuchung mittels Real-Time-PCR an.

#### 4.4 UV-Effekte auf die Genexpression bei *Monostroma arcticum*

Für die Versuche mit *Monostroma arcticum* wurde eine andere Vorgehensweise als bei *Acrosiphonia sp.* gewählt. Hier musste in allen Fällen auf Freilandmaterial zurückgegriffen werden, da diese Art in Kultur nur sehr langsam wächst und somit nicht genügend Pflanzenmaterial für die Etablierung von Genbibliotheken und Makroarray-Hybridisierungen zur Verfügung stand. Bei Tauchgängen im Kongsfjord (Spitzbergen) war es aber möglich, ausreichende Mengen dieser Alge zu sammeln. Diese waren frei von sichtbarem Aufwuchs und konnten so ohne Bedenken in die entsprechenden Expositionsversuche eingesetzt werden. Die für *M. arcticum* hergestellten Makroarrays wurden sowohl mit cDNA aus der *SSH*, als auch mit cDNA, die direkt aus der RNA von Versuchspflanzen (Labor- und Freilandversuche) synthetisiert wurde, hybridisiert. Die für die *SSH*-Analyse eingesetzte RNA stammte dabei aus Algen, die für 12 Stunden UV-exponiert wurden. Für die UV-Bestrahlungsversuche im Labor und im Freilandversuch wurden Expositionszeiten von 4, 12 und 24 Stunden gewählt. Die Bestrahlungsstärke im Laborversuch orientierte sich an Versuchen, die bereits an *M. arcticum* durchgeführt wurden (Aguilera et al. 2002), um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Die Ergebnisse der vergleichenden relativen Strahlungsmessungen mit den *ELUV 14*-Messgeräten im Freiland zeigen, dass die UV-Bestrahlungsstärke in etwa 0,5 Metern Wassertiefe an der Expositionsplattform während des Untersuchungszeitraumes auf etwa die Hälfte der an der Oberfläche ermittelten Werte abgeschwächt wird. Durch einen Vergleich mit den absoluten UV-Strahlungswerten (300 – 370 nm), die an der Koldewey-Station über die Dauer des Versuchs gemessen wurden, lässt sich darüber hinaus ableiten, dass die maximal erreichten Werte an der Expositionsplattform etwa zwischen 13 und 15 W/m<sup>2</sup> betragen. Damit liegen diese also höher als die im Laborversuch eingesetzten UV-Strahlungsstärken (ca. 8,7 W/m<sup>2</sup>; 315 – 400 nm). Allerdings war im Freiland über die Dauer des Versuches ein typischer Tagesgang mit einem deutlichen Rückgang der Bestrahlungsstärke in den Nachtstunden mit tieferem Sonnenstand zu verzeichnen. Somit waren also deutliche Unterschiede in den Bestrahlungsszenarien bei Labor- und Freilandversuch gegeben.

Insgesamt wurden mittels Makroarray-Analysen 336 Klone der gröbenselektionierten Genbibliothek als differentiell exprimiert identifiziert. Diese wurden sequenziert und mittels *BLAST*-Analyse annotiert. Von diesen konnten dadurch 72 Sequenzen eine bestimmte Identität zugeordnet werden, was mit etwa 21 % auch bei *M. arcticum* eine deutliche

Steigerung der identifizierbaren Sequenzen gegenüber der mittels *SSH* hergestellten Genbibliothek bedeutet. Die verschiedenen Gene lassen sich auch hier anhand der Funktion der jeweiligen Genprodukte in mehrere Gruppen einteilen, die im Folgenden zusammen und im Kontext mit den Befunden bei *Acrosiphonia* diskutiert werden. Dabei wird auch auf die jeweiligen Expressionsdaten eingegangen, sofern diese statistische Relevanz aufweisen.

#### 4.4.1 Photosynthese

Auch bei *M. arcticum* waren, ähnlich wie bei *Acrosiphonia*, Veränderungen des Expressionsmusters der Gene für verschiedene Komponenten der Photosynthese-Apparate festzustellen. Hierbei waren ebenfalls diverse Bestandteile der Lichtsammelkomplexe betroffen. Am Beispiel der Chlorophyll a/b-Bindeproteine (*cab*) zeigt sich aber ein anderes UV-induziertes Expressionsverhalten als bei *Acrosiphonia*. Hier war im Laborversuch bereits nach 12 Stunden der UV-Exposition eine deutliche Induktion der entsprechenden Gene festzustellen, die nach 24 Stunden ein Maximum erreichte und nach 36 Stunden etwas abzusinken begann. Ein weiterer Vertreter der *cab*, das Chlorophyll a/b-Bindeprotein LI818r-1 zeigte hingegen ein abweichendes Verhalten. Im Laborversuch war zu allen Zeitpunkten eine Repression des entsprechenden Gens festzustellen, während es im Freilandversuch zunächst induziert und dann reprimiert wurde. Dieses im Vergleich zu den übrigen *cab* abweichende Expressionsmuster wurde bereits für *Chlamydomonas* beschrieben und deutet auf eine spezielle Funktion des *cab* LI818r-1 in den Lichtsammelkomplexen hin (Savard et al. 1996).

Daneben konnten auch die Gene für weitere Bestandteile der Photosysteme, etwa das PSI-K aus Photosystem I und zwei Untereinheiten des Photosystems II im Laborversuch als induziert gefunden werden. In zwei Fällen wich das Expressionsverhalten im Freilandversuch ab, was auch für das *psbO*-Gen (Oxygen evolving enhancer protein 1) gilt.

Interessant ist auch die differentielle Expression des kleinen nicht-enzymatischen Chloroplasten-Proteins CP12. Dieses Protein konnte unter anderem als an der Lichtregulation des Calvin-Zyklus bei *Chlamydomonas* und *Synechocystis* beteiligt identifiziert werden (Wedel und Soll 1998; Marri et al. 2005) und scheint auch bei der Reaktion von *Monostroma* auf UV-Bestrahlung eine Rolle zu spielen. Hier war sowohl im Labor- als auch im Freilandversuch eine Repression des entsprechenden Gens feststellbar.

Weiterhin war bei *M. arcticum* auch das Gen für ein Enzym der Chlorophyll-Biosynthese, die Uroporphyrinogen-Decarboxylase, als reprimiert gefunden worden. Sie katalysiert die Decarboxylierung von Uroporphyrinogen III. Möglicherweise kommt es in *M. arcticum* durch die UV-Exposition also zu einer Reduktion der Chlorophyll-Biosynthese, um die Bildung photosensitiver Tetrapyrrole, die an der Entstehung von oxidativem Stress beteiligt sein können, zu verhindern. Dies konnte bereits für andere Pflanzen gezeigt werden (Mock und Grimm 1997).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass auch bei *Monostroma* die Veränderungen diverser Komponenten der Photosynthese-Apparate bei der UV-Exposition eine wichtige Rolle spielt. Dies kann als Anpassung an die veränderten Lichtbedingungen gewertet werden. Dabei scheint *Monostroma* schneller und stärker als *Acrosiphonia* mit der Modulation der Photosysteme zu beginnen, was mit der unterschiedlichen Morphologie der Thalli zusammenhängen könnte. Das teilweise abweichende Expressionsverhalten einiger Gene zwischen Labor- und Freilandversuch zeigt, dass die unterschiedlichen Lichtbedingungen auch eine verschiedenartige Modulation der entsprechenden Komponenten nötig macht.

#### 4.4.2 Regulationsprozesse

Hinsichtlich der an Regulationsprozessen beteiligten Gene bietet sich bei *M. arcticum* ein von *Acrosiphonia* abweichendes Bild. So waren hier keine für Transkriptionsfaktoren codierende Gene als differentiell reguliert zu finden. Eine Ausnahme stellt ein kleines zinkfinger-ähnliches Protein dar, das über seine potentiell vorhandene DNA-bindende Domäne als Transriptionsfaktor fungieren könnte.

Eine Parallele zu *Acrosiphonia* stellt allerdings die differentielle Expression eines Vertreters aus der Gruppe der GTP-bindenden Proteine dar. Diese sind als an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt bekannt. Ebenfalls aus der Gruppe der GTP-bindenden Proteine konnte das Gen für das Cell Division Protein identifiziert werden, das in *Monostroma* ebenfalls durch UV-Strahlung differentiell reguliert zu sein scheint und vermutlich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (Mukherjee et al. 1993).

Darüber hinaus war hier das Gen für eine weitere am Zellzyklus beteiligte Komponente, die leichte Kette des Dyneins, als UV-reguliert zu finden. Dieser Bestandteil des löslichen Dynein-Partikels übernimmt, neben anderen Aufgaben, eine wichtige Rolle bei der Mitose und damit bei der Kontrolle der Zellteilung (DiBella et al. 2001).



Weiterhin konnte die Induktion des Gens für eine Untereinheit einer AMP-aktivierten Proteinkinase mittels *SSH*-Analyse nachgewiesen werden. Dieses Protein ist, wie viele andere Proteinkinasen auch, durch die Phosphorylierung von Zielmolekülen an Signaübertragungswegen innerhalb der Zelle beteiligt (Michal 1999).

Der Vergleich mit den Befunden zu *Acrosiphonia* zeigt, dass in *Monostroma* hinsichtlich des Regulationsgeschehens deutliche Unterschiede bestehen. Dies verwundert nicht, erfordert doch die Reaktion auf Umwelteinflüsse in jedem Organismus andere Mechanismen, um das hochkomplexe Regelwerk der Zelle auf die neue Situation einzustellen. So sind auch die teilweise deutlichen Unterschiede zwischen Labor- und Freilandversuch zu interpretieren, welche die Reaktion auf die jeweils unterschiedlichen Umwelteinflüsse widerspiegeln.

#### 4.4.3 Stress, Abwehr und Proteinabbau

Aus der Gruppe der Stress- und Abwehr-assoziierten Gene ließen sich bei *M. arcticum* ähnliche Vertreter identifizieren wie bei *Acrosiphonia*. So konnten auch hier verschiedene molekulare Chaperone als differentiell reguliert identifiziert werden. Hier sind die Gene für das Hitzeschock-Protein 70 (HSP70) und ein dnaK-Typ Chaperon zu nennen, die beide im Laborversuch zu allen Zeitpunkten reprimiert, im Freilandversuch hingegen nach 12 Stunden induziert wurden um schließlich nach 36 Stunden ebenfalls reprimiert zu werden. Das Gen für ein weiteres Chaperon-Protein, die Protein Disulfid Isomerase, war im Labor- als auch im Freilandversuch ähnlich reguliert. Hier kam es erst nach 24 Stunden zur Induktion dieses Gens, die dann im weiteren Verlauf der UV-Exposition wieder abgeschwächt oder sogar reprimiert wurde. In *Arabidopsis* konnte ebenfalls eine verstärkte Expression dieses Gens durch oxidativen Stress nachgewiesen werden (Sweetlove et al. 2002). Neben ihrer Funktion als molekulares Chaperon ist die Protein Disulfid Isomerase auch an Signaltransduktionswegen innerhalb der Zelle beteiligt (Ray et al. 2003).

Wie schon bei *Acrosiphonia* konnten auch bei *M. arcticum* zwei Gene als reguliert gefunden werden, deren Genprodukte an Entgiftungsprozessen beteiligt sein können. Das Gen für die schon beschriebene Glutathion *S*-Transferase wurde auch hier, sowohl im Labor- als auch im Freilandversuch, reprimiert. Im Gegensatz dazu konnte für Peroxiredoxin im Freilandversuch eine deutliche Induktion des entsprechenden Gens nach 12 Stunden UV-Exposition nachgewiesen werden. Dieses Enzym spielt eine Rolle bei der Entgiftung von Peroxiden durch die Reduktion derselben zu den korrespondierenden Alkoholen. Eine Induktion dieses

Gens konnte auch bei oxidativem Stress in *Arabidopsis* nachgewiesen werden. (Sweetlove et al. 2002; Dietz et al. 2002)

Die Induktion des Gens für die Serin-Acetyltransferase, die mittels *SSH*-Analyse nachgewiesen werden konnte, steht vermutlich im Zusammenhang mit der Bildung des antioxidativ wirksamen Reduktans Glutathion. Die Überexpression dieses Enzyms in Tabak- und Kartoffelpflanzen führte hier zu erhöhten Glutathion-Gehalten, was den Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress verlieh (Blaszczyk et al. 1999; Harms et al. 2000).

Ebenfalls mittels *SSH*-Analyse wurde die Induktion des Gens für einen ABC (ATP-binding cassette)-Transporter in *M. arcticum* gezeigt. Mitglieder dieser Familie stellen typische Stress-assoziierte Gene in Pflanzen dar und sind vermutlich an der Beseitigung cytotoxischer Substanzen beteiligt (Smart und Fleming 1996). Eine lichtabhängige Induktion konnte bereits in der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas* gezeigt werden (Im und Grossmann 2001). Offenbar spielen ABC-Transporter auch bei der Stress-Antwort von *Monostroma* eine Rolle.

Wie bereits oben für *Acrosiphonia* beschrieben, konnten auch bei *M. arcticum* die Gene für mehrere Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems als differentiell exprimiert identifiziert werden. Diese waren hier jedoch in allen Fällen im Laborversuch reprimiert, was bei *M. arcticum* auf eine nebensächliche Rolle dieses Systems zur Proteindegradation schließen lässt. Auch bei *Nicotiana* war in Folge von Hitzestress eine Reprimierung von Komponenten dieses Systems nachgewiesen worden (Park et al. 1997). Eventuell spielen hier andere Mechanismen, z.B. der über Clp-Proteasen vermittelte Abbau von Proteinen, eine wichtigere Rolle. Im Freilandversuch gelang kein Nachweis der differentiellen Regulation von Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems.

Interessant ist bei *M. arcticum* auch die deutliche Induktion des Gens für die  $\gamma$ -Untereinheit der ATP-Synthase, die im Freilandversuch nach 12 Stunden UV-Exposition nachgewiesen werden konnte. Für photosynthetische Zellen konnte gezeigt werden, dass es im Chloroplasten lichtabhängig zu einer Disulfidreduktion an der  $\gamma$ -Untereinheit der ATP-Synthase kommen kann, was eine partielle Entkopplung der Thylakoid-Membran durch einen gesteigerten Protonenleckstrom über die CF1-Untereinheit zur Folge haben kann (Richter 2000). Möglicherweise geschieht dies in Folge der UV-Bestrahlung auch in *M. arcticum* und die Pflanze versucht durch Neusynthese der  $\gamma$ -Unterheit dieser partiellen Entkopplung der Thylakoidmembran entgegenzuwirken.

Wie bereits weiter oben für *Acrosiphonia* beschrieben, wurden auch für 3 ausgewählte Gene von *M. arcticum* Real-Time-PCR-gestützte Analysen des Expressionsstatus zu verschiedenen Zeitpunkten der UV-Exposition durchgeführt um Vergleiche mit den Ergebnissen der Makroarray-Hybridisierungen anstellen zu können. Es zeigte sich, dass die mittels Makroarray erhaltenen Daten – bis auf eine Ausnahme – mit Hilfe der Real-Time-PCR-Experimente verifiziert werden konnten. Teilweise wich aber auch hier der Betrag der Expressionswerte zwischen den beiden Methoden ab, was vermutlich auch auf die unterschiedlichen methodischen Prinzipien zurückzuführen ist.

#### **4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse für *Acrosiphonia sp.* und *M. arcticum***

Die Untersuchungen der UV-induzierten Genexpression bei den Grünalgen *Acrosiphonia sp.* und *Monostroma arcticum* zeigen, dass beide Algen ähnliche Strategien bei der Reaktion auf UV-Stress verfolgen.

Jedoch konnten gerade im Hinblick auf die Photosynthese Unterschiede festgestellt werden, die mit früheren Untersuchungen zur UV-induzierten Veränderungen der Photosynthese bei diesen beiden Arten korrelieren und auf Unterschiede in der Morphologie und natürlicher Verbreitung zurückzuführen sind. So konnten Aguilera et al. (1999) bei *Acrosiphonia*, trotz der Verbereitung dieser Art im Eulittoral und oberen Sublittoral, eine vergleichsweise hohe Sensitivität der Photosynthese gegenüber einer erhöhten UV-Belastung feststellen. Diese Beobachtung wird durch die Befunde auf Transkriptionsebene bestätigt. Hier konnte bei mehreren Genen, die für Komponenten der Photosyntheseapparate codieren, zunächst eine Inhibition der Expression festgestellt werden, die dann aber im weiteren Verlauf in eine starke Induktion überging.

Im Gegensatz dazu reagiert die photosynthetische Leistung von *M. arcticum* auf eine erhöhte UV-Belastung weniger sensitiv, wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte (Aguilera et al. 1999; Bischof et al. 2000). Bei dieser Alge war auf Transkriptionsebene bereits nach 12 Stunden eine Induktion der Gene für etliche Komponenten der Photosysteme, insbesondere der Lichtsammelkomplexe, zu beobachten, die nach 24 Stunden ein Maximum erreichte und zum Ende des Versuches wieder absank. *Monostroma* kann sich also offenbar schneller auf das neue Lichtklima einstellen und durch die rasche Modulation der Photosysteme eine effiziente Photosynthese aufrecht erhalten. Der von Bischof et al. (2000) beobachtete Rückgang des Chlorophyll a-Gehaltes in *M. arcticum* bei UV-Exposition deckt

sich auf Transkriptionsebene mit der Reprimierung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase, die vermutlich eine verminderte Chlorophyll-Syntheseleistung nach sich zieht. Eine möglicher Grund für dieses unterschiedliche Verhalten der Photosynthese bei *Acrosiphonia* und *Monostroma* könnte in der abweichenden Morphologie der beiden Arten begründet sein. So weist *Acrosiphonia* eine büschelförmige Struktur auf, die aus einzelnen Zellfäden besteht. Während die apikalen Teile der Alge stark exponiert sein können, beschatten sich die basalen Teile selbst und schützen sich so vor einer verstärkten Sonneneinstrahlung. Aus diesem Grund findet man im Feld häufig Pflanzen mit gelblichen und ausgebleichten Spitzen, wohingegen die basalen Teile der Alge meist kräftig grün erscheinen (Aguilera et al. 1999). Aufgrund dieses Selbstschutzes durch Eigenbeschattung kann sich *Acrosiphonia* also eine erhöhte UV-Sensitivität der Photosynthese „leisten“, da maximale Bestrahlungsstärken nur die äußersten, apikalen Teile der Pflanze betreffen. Im Gegensatz dazu besitzt *Monostroma* einen flächigen Thallus, der zudem nur eine Zellschicht dick ist. Die Alge ist deshalb in einer etwas größeren Wassertiefe (oberes bis unteres Sublittoral) zu finden und muss ihre Photosyntheseleistung über die gesamte Fläche des Thallus auf das in der jeweiligen Tiefe vorherrschende Lichtklima rasch einstellen können.

Als weitere Anpassung an ihre vertikale Verbreitung besitzen beide Algen-Spezies ein hohes antioxidatives Potential, das durchaus mit dem höherer Pflanzen vergleichbar ist. So konnten in beiden Arten hohe Aktivitäten der antioxidativ wirkenden Enzyme Glutathion-Reduktase (GR), Superoxid-Dismutase (SOD) und Ascorbat-Peroxidase (APX) gemessen werden (Aguilera et al. 2002). In *Monostroma* findet man darüber hinaus hohe Konzentrationen von Ascorbat, das ebenfalls antioxidative Wirkung besitzt. Diese Befunde korrelieren mit der Verbreitung beider Arten in der oberen, teilweise gezeitenbeeinflussten Zone der Küsten, die dort häufig drastischen und schnellen Änderungen der Bestrahlungsstärke ausgesetzt sein können und deshalb offensichtlich ein effizientes biochemisches Abwehrsystem gegen oxidativen Stress entwickelt haben. (Aguilera et al. 2002)

Auch auf Transkriptionsebene konnte mit der Identifizierung von Genen, deren Genprodukte mutmaßlich an der Biosynthese von Glutathion beteiligt sind, ein Hinweis auf die UV-Induktion des antioxidativen Systems gefunden werden. Die teilweise starke Induktion der betreffenden Gene deutet auf eine erhöhte Bedeutung gerade des Glutathion-Systems im Hinblick auf UV-Stress in beiden Algen-Arten hin. Neben diesen Hinweisen auf Strategien der Anpassung an eine erhöhte UV-Belastung durch Veränderungen der Photosynthese und des antioxidativen Status, die bereits durch Untersuchungen auf physiologischer und biochemischer Ebene bestätigt wurden, konnten für beide Grünalgen weitere mutmaßliche

Mechanismen identifiziert werden. Diese werden im Folgenden für *Acrosiphonia sp.* und *Monostroma arcticum* stichpunktartig zusammengefasst.

### **Acrosiphonia sp.**

- Modulation der Zusammensetzung der Photosynthese-Apparate zur Anpassung an die veränderten Strahlungsbedingungen
- Veränderung der Fettsäure-Zusammensetzung der Membransystem des Chloroplasten und Neusynthese von Lipiden, die durch Lipidperoxidation geschädigt wurden
- Frühzeitige Induktion von molekularen Chaperonen, die in ihrer Funktion beeinträchtigten Proteinen helfen, in ihre native Konformation zurück zu kehren
- Entfernung toxischer Reaktionsprodukte und/oder Induktion von Schutz gegen Herbivoren
- Induktion der Biosynthese von Flavonoiden, die als UV-Schutzsubstanzen fungieren
- Schutz der empfindlichen Telomere gegen oxidativen Stress
- Inhibition der durch UV ausgelösten Apoptose
- Reduktion der Atmungskettenaktivität um die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen zu minimieren
- Nutzung des Mechanismus des Malat-Ventils zum Abbau überschüssiger Reduktionsäquivalente im Chloroplasten
- Induktion des Aminosäure- und Glutathionstoffwechsels als antioxidativer Mechanismus

### **Monostroma arcticum**

- Modulation der Zusammensetzung der Photosynthese-Apparate zur Anpassung an veränderte Strahlungsbedingungen
- Repression der Chlorophyll-Biosynthese um die Bildung photosensitiver Tetrapyrrole zu verhindern
- Induktion von molekularen Chaperonen, die in ihrer Funktion beeinträchtigten Proteinen helfen, in ihre native Konformation zurück zu kehren
- Induktion eines Mechanismus zur Entgiftung schädlicher Peroxide und weiterer cytotoxischer Substanzen
- Induktion des Glutathion-Stoffwechsels als antioxidativer Mechanismus

#### 4.6 UV-Effekte auf die Genexpression bei *Laminaria spp.*

Wie bereits weiter oben erwähnt, war die Anwendung der *SSH*-Methode für die Braunalge *Laminaria saccharina* mit verschiedenen Problemen behaftet. So führte vor allem die geringe Länge der mittels *SSH* erhaltenen cDNA-Fragmente, wie auch im Falle der beiden Grünalgen, zu einer unbefriedigenden Ausbeute an identifizierbaren Gensequenzen. So musste also auch hier eine Verbesserung der Länge der klonierten cDNA-Fragmente angestrebt und damit eine gröbenselektionierte Genbibliothek etabliert werden.

Um eine möglichst große Gen-Diversität dieser Genbibliothek zu gewährleisten, wurde zu deren Herstellung RNA aus Individuen verwendet, die für unterschiedlich lange Zeiträume künstlicher UV-Strahlung ausgesetzt waren. Die Größenselektionierung und Klonierung der so erhaltenen cDNA erfolgte durch die *vertis Biotechnologie AG* (Freising), die bereits erfolgreich mehrere Genbibliotheken für einzellige marine Algen hergestellt hatte.

Eine Analyse der klonierten Genfragmente zeigte, dass die mittlere Insertgröße mit 820 bp deutlich über derjenigen der mittels *SSH* etablierten subtrahierten Genbibliothek lag. Somit war zu erwarten, dass sich hier auch eine Verbesserung der Trefferquote bei der Annotation ergeben würde. Von dieser gröbenselektionierten Genbibliothek wurden die Plasmid-Inserts von 2208 Klonen durch die Sequenzierabteilung des MPI für Genetik (Berlin) sequenziert und die erhaltenen Gensequenzen einer automatischen Annotation mittels *SAMS (Sequence Analysis and Management System)* unterzogen. Dabei konnte 667 der Sequenzen eine Identität zugeordnet werden, wobei im Falle von 440 Sequenzen nur eine Identität als hypothetisches Protein vorgeschlagen wurde. Weitere 227 Sequenzen konnten tatsächlich als definierte Gene identifiziert werden, von denen etwa die Hälfte zur Gruppe der ribosomalen Proteine gehört. Der prozentuale Anteil der identifizierbaren Gene, lässt man die als hypothetische Proteine gedeuteten Sequenzen außer Acht, liegt also auch hier nur bei etwa 10 % und damit nur unwesentlich höher als bei der Subtraktiven Genbibliothek. Dieses Ergebnis zeigt, dass selbst die Verwendung langer Sequenzen nicht unbedingt zu einer Verbesserung der Trefferquote bei der Annotation, wie sie bei den beiden Grünalgen zu beobachten war, führen muss.

Offenbar ist es im Fall der Braunalgen-Gene ungleich schwieriger, Sequenzübereinstimmungen mit bereits bekannten Genen zu finden. Dies liegt sicherlich in der evolutiven Sonderstellung der Braunalgen begründet, die sich auch in den Gensequenzen niederschlägt. Eine Lösung dieses Problems kann beim momentanen Stand der Gen-Datenbanken nur die Analyse größerer Anzahlen von Gensequenzen bieten, um einen besseren Überblick über die in

Braunalgen exprimierten Gene zu erhalten. Immerhin konnten bei der Annotation der 2208 Sequenzen 62 unterschiedliche Gene identifiziert werden, die bereits einen gewissen Einblick in das Transkriptom der Alge bei UV-Stressbedingungen gewähren. Die gefundenen Gene lassen sich auch hier, wie schon bei den Grünalgen, in verschiedene funktionelle Gruppen einteilen.

Die gröbenselektionierte Genbibliothek von *L. saccharina* wurde zur Herstellung von Mikroarrays verwendet, mit deren Hilfe der Expressionsstatus der Gene bei UV-Bestrahlung untersucht werden sollte. Wie sich zeigte, konnten diese Mikroarrays auch für die verwandten Arten *L. digitata* und *L. solidungula* eingesetzt werden, auch hier waren gute Hybridisierungssignale zu erkennen. Für die Mikroarray-Analysen wurde in allen Fällen RNA verwendet, die aus 12 Stunden unter den gleichen Strahlungsbedingungen UV-exponierten Individuen gewonnen wurde. Die Bestrahlungsstärke orientierte sich dabei an früheren Untersuchungen zu UV-Effekten bei *Laminaria*, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten (Bischof et al. 2000; Aguilera et al. 2002).

Schwierigkeiten ergaben sich hier durch die bereits weiter oben erwähnten geringe Ausbeute bei der RNA-Extraktion aus *Laminaria spp.* Da das Probenmaterial limitiert war, konnten für *L. solidungula* und *L. saccharina* (junge Thalli) nur 2 unabhängige Hybridisierungsversuche (entsprechend 4 Einzelwerten) durchgeführt werden. Bei *L. digitata* und den Sporen von *L. saccharina* waren hingegen 3 unabhängige Hybridisierungsversuche (entsprechend 6 Einzelwerten) möglich.

Mittels Mikroarray-Analyse konnten 16 der 62 unterschiedlichen Gene in zumindest einer der untersuchten *Laminaria*-Arten als signifikant UV-reguliert identifiziert werden. Insgesamt fiel bei *L. digitata* das Ausmaß der differentiellen Expression am geringsten aus, was mit der im Vergleich zu *L. saccharina* größeren Toleranz dieser Art gegenüber der UV-Strahlung auch auf physiologischer Ebene korreliert (Dring et al. 1996; Bischof et al. 1998).

Auffällig ist die geringe Anzahl der Photosynthese-assoziierten Gene, bei denen eine differentielle Expression nachgewiesen werden konnte. Es ist unwahrscheinlich, dass dies auf eine Unempfindlichkeit der Photosynthese gegenüber UV bei den untersuchten *Laminaria*-Arten hindeutet. So konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass die Photosynthese der verschiedenen Spezies von *Laminaria* empfindlich auf eine erhöhte UV-Bestrahlung reagiert (Hanelt et al. 1996; Bischof et al. 2000; Brouwer et al. 2000; Michler et al. 2002). Zudem waren in der gröbenselektionierten Genbibliothek, zu deren Herstellung ja vor allem UV-exponierte Individuen von *L. saccharina* verwendet wurden, etliche Gene aus dem Bereich der Photosynthese zu finden.

Aus dem Bereich der Stressantwort und Abwehr konnten hingegen mehr Gene als UV-reguliert gefunden werden und lassen Parallelen zu den Ergebnissen bei den Grünalgen erkennen. Auch hier konnte das Gen für eine Glutathion *S*-Transferase gefunden werden, das in jungen Thalli von *L. saccharina*, im Gegensatz zu den Befunden bei den beiden Grünalgen, allerdings deutlich induziert wurde. Auch in *L. digitata* war eine Induktion dieses Gens festzustellen, die allerdings sehr schwach ausfiel und ebenfalls auf die relative Unempfindlichkeit dieser Art gegenüber UV-Strahlung hinweist.

Interessant ist auch die deutliche Induktion eines Thioredoxins in *L. saccharina*. Diese Proteine spielen als regulatorische Elemente bei der reversiblen Lichtaktivierung verschiedener Schlüsselenzyme der Photosynthese eine wichtige Rolle (Schürmann und Jacquot 2000; Balmer et al. 2003). Möglicherweise kommt es also auch in *L. saccharina* durch UV zu einer Thioredoxin-vermittelten Modulation der Photosynthese.

Weiterhin ist in diesem Kontext die mittels *SSH*-Analyse ermittelte Induktion des Gens für eine Methionin Sulfoxid Reduktase zu nennen. Dieses Enzym ist über die Reduktion von Methionin Sulfoxid zurück zu Methionin an einem Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress beteiligt (Weissbach et al. 2002).

Desweiteren wurden auch in den untersuchten *Laminaria*-Arten die Gene für verschiedene regulatorische Proteine durch die UV-Strahlung unterschiedlich reguliert. Neben einem Translations-Elongationfaktor und einem GTP-bindenden Protein, waren hier die Gene für 2 Regulatoren des Zellzyklus differentiell exprimiert. Das cell-division-Protein übernimmt eine wichtige Rolle bei der Zellteilung, wohingegen Cyclin-abhängige Kinasen den entscheidenden Kontrollmechanismus für das Durchlaufen des Zellzyklus darstellen (Löwe und Amos 1998; Michal 1999). Die Repression des cell-division-Proteins in *L. digitata* und *L. solidungula* sowie die Induktion einer Cyclin-abhängigen Kinase deuten darauf hin, dass in *Laminaria* durch UV-Bestrahlung das Durchlaufen des Zellzyklus verändert und die Zellteilung inhibiert wird. Wie Studien an verschiedenen Arten von *Laminaria* zeigen, kann es infolge einer UV-Bestrahlung durch die Bildung von Cyclobutan Pyrimidin Dimeren (CPD) zu Schädigungen der DNA in diesen Algen kommen. In erster Linie sind hier die einzelligen Verbreitungsstadien, die Zoosporen, betroffen. Aber auch in älteren Individuen konnten DNA-Läsionen nachgewiesen werden. Wie gezeigt werden konnte, ist *L. saccharina* in der Lage, UV-induzierte DNA-Schäden effizient zu reparieren (van de Poll et al. 2002; Roleda et al. 2005). Eine verstärkte Kontrolle und damit ein langsames Durchlaufen der verschiedenen Phasen des Zellzyklus durch Induktion einer Cyclin-abhängigen Kinase könnte der Alge mehr Zeit geben, UV-induzierte DNA-Schäden zu reparieren.



## 4.7 Schlußbetrachtung und Ausblick

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die verschiedenen molekularbiologischen Methoden zur Identifizierung differentieller Genexpression auch mit Erfolg bei marinen Makroalgen einsetzbar sind. Als problematisch erwies sich allerdings die RNA-Extraktion, hier waren - vor allem bei den Braunalgen - nur mit erheblichem Aufwand ausreichende Ausbeuten zu erzielen. Eine entsprechende Menge an RNA ist jedoch, gerade im Fall der *SSH* und der Array-gestützten Analysemethoden, von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Experimente. Schwierigkeiten traten insbesondere bei der RNA-Extraktion aus älteren und größeren Sporophyten von *Laminaria* auf, da diese erhebliche Mengen an Polysacchariden enthalten, welche die Isolierung von RNA behindern können. Bessere Ausbeuten konnten dagegen bei Verwendung der einzelligen Sporen der Braunalgen erzielt werden. Sporen verwenden Lipide als Reservestoffe und enthalten damit weniger Polysaccharide, was sie für die Extraktion von Nukleinsäuren deutlich geeigneter macht. Somit sollten in zukünftigen Experimenten mit Braunalgen vor allem auf diese einzelligen Fortpflanzungsstadien zurückgegriffen werden, bis geeignetere Methoden zur Isolierung von RNA auch für größere Thalli der Braunalgen zur Verfügung stehen.

Die Methode der *SSH* erwies sich durchaus auch als für Makroalgen geeignet. Zwar konnten bei der üblichen Vorgehensweise der *SSH*, also der Klonierung der mittels dieser Methode generierten cDNA-Fragmente, nur eine geringe Anzahl der entsprechenden Gene identifiziert werden. Als geeigneter erscheint die Verwendung der mittels der *SSH* gewonnenen Sonden in Verbindung mit gröbenselektionierten Genbibliotheken. Hier konnte die Anzahl der identifizierbaren Sequenzen im Falle der beiden Grünalgen mehr als verdoppelt werden. Es zeigte sich auch, dass mit dieser Methode vor allem solche Gene identifiziert werden konnten, bei denen eine geringe Transkriptionsrate und damit auch eine geringe Kopienzahl in der Zelle zu erwarten ist. Dieser Befund verdeutlicht auch die Stärke der *SSH*, nämlich die Anreicherung und Normalisierung seltener Transkripte. Diese Methode könnte daher auch für weitere Makoralgen eingesetzt werden, um einen Überblick über eine differentielle Genexpression bei verschiedensten zu vergleichenden Bedingungen zu erhalten. Allerdings lassen die unter Verwendung der *SSH*-Sonden erhaltenen Expressionswerte nur einen ersten Hinweis auf den tatsächlichen Transkriptionsstatus in der untersuchten Pflanze zu. Hier können ergänzende Untersuchungen, z.B. die Verwendung von RNA bzw. cDNA aus Versuchspflanzen für Array- oder qRT-PCR-Analysen, exaktere Daten liefern.

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Gene der verschiedenen Makroalgen-Arten können nun als Basis für tiefergehende Untersuchungen dienen. In weiteren Versuchen sollte die Expression ausgewählter Gene bei unterschiedlichen Stress-Szenarien analysiert werden. In Zukunft ist anzustreben, neben den Untersuchungen auf mRNA-Ebene die Genexpression bis hin zur Proteinebene darzustellen.

## 5. Zusammenfassung

Makroalgen stellen als Primärproduzenten eine bedeutende Komponente von marinen Küstenökosystemen der gemäßigten und hohen Breiten dar. Sie können dort, je nach vertikaler Verbreitung, biologisch relevanten Dosen der schädlichen UV-Strahlung ausgesetzt sein. In den Polarregionen kann es dabei durch ein Zusammenwirken verschiedener Umweltfaktoren insbesondere im Frühjahr zu einer starken UV-Belastung kommen. Welche Auswirkungen ein solcher Anstieg der UV-Strahlung auf der Ebene der Genexpression nach sich zieht, wurde in der vorliegenden Arbeit bei verschiedenen Vertretern der Grün- und Braunalgen untersucht. Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene kamen dabei die Methoden der Suppressiven Subtraktions-Hybridisierung (SSH) und Array-basierte Analyseverfahren zur Anwendung.

Die dabei identifizierten Gene lassen sich in verschiedene funktionelle Gruppen einordnen und stehen mehrheitlich in einem offensichtlichen Kontext zu Anpassungs- oder Schutzmechanismen gegenüber der UV-Strahlung. So waren bei den untersuchten Grünalgen, *Monostroma arcticum* und *Acrosiphonia sp.*, verschiedene Gene aus dem Bereich der Photosynthese als differentiell exprimiert identifiziert worden, was auf eine Modulation der Photosyntheseapparate zur Anpassung an die veränderten Strahlungsbedingungen hindeutet. Weiterhin werden Gene für molekulare Chaperone induziert, die an zellulären Mechanismen bei der Reparatur denaturierter Proteine beteiligt sind. Ebenfalls bei beiden Grünalgen konnte die Induktion von Genen des Glutathionstoffwechsels nachgewiesen werden, was auf eine Bedeutung des Glutathion-Systems als antioxidativer Mechanismus im Zuge der UV-Antwort verweist. Daneben konnten bei *Acrosiphonia sp.* solche Gene als differentiell exprimiert identifiziert werden, deren Genprodukte mit verschiedenen weiteren typisch stress-assoziierten Prozessen in Verbindung stehen könnten. Dazu zählen die Inhibition der durch UV-Strahlung induzierten Apoptose, die Induktion von Komponenten des „Malat-Ventils“ zum Abbau überschüssiger Reduktionsäquivalente im Chloroplasten, die Reduktion der Atmungskettenaktivität zur Verminderung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen und die Veränderung der Fettsäure-Zusammensetzung der Membransysteme der Chloroplasten. Weiterhin konnte für beide Grünalgen die differentielle Expression diverser Komponenten des zellulären Regulationsgeschehens gezeigt werden, wobei hier deutlich Unterschiede bei den untersuchten Arten festzustellen waren.

Auch bei verschiedenen Vertretern der Braunalgen-Gattung *Laminaria* konnten mehrere Gene identifiziert werden, deren Expressionsstatus durch die UV-Strahlung verändert wird. Wie

schon im Falle der Grünalgen waren auch hier Gene aus den Bereichen der Photosynthese und des zellulären Regulationsgeschehens sowie typische stress-assoziierte Transkripte zu finden. Beobachtungen im Freiland im Gebiet des arktischen Kongsfjordes (Spitzbergen) zeigten, dass es in der Polarregion im Frühjahr, insbesondere bei klarem Wasser, durch das plötzliches Aufbrechen der Meereisdecke zu einem sprunghaften Anstieg der in das Wasser eindringenden UV-Strahlung kommt. Dies kann zu einer strahlungsinduzierten Schädigung der betroffenen Makroalgen führen, was *in situ* am teilweisen oder gänzlichen Ausbleichen der Thalli von Individuen der Braunalge *Laminaria saccharina* beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse stellen einen ersten Meilenstein in der Darstellung der Effekte von UV-Strahlung auf die Genexpression mariner Makroalgen dar und bieten eine gute Ergänzung der bisher vorliegenden Daten auf physiologischer Ebene.

## 6. Literaturverzeichnis

Acevedo J, Nolan C (1993): Environmental UV-radiation: Causes, Effects Consequences. Directorate-General XII for Science, Commission of the European Communities, Brussels

Adamska I, Kloppstech K, Ohad I (1992): UV light stress induces the synthesis of Early Light-Inducible Protein and prevents its degradation. *J Biol Chem* 267: 24732-24737

Aguilera J, Karsten U, Lippert H, Vögele B, Philipp E, Hanelt D, Wiencke C (1999): Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. *Mar Ecol Progr Ser* 191: 109-119

Aguilera C, Dummermuth A, Karsten U, Schriek R, Wiencke C (2002): Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. *Polar Biol* 25:432-441

Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997): Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol Plant* 100: 224-233

Apt KE, Clendennen SK, Powers DA, Grossman AR (1995): The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Mol Gen Genet* 246: 455-464

Asada K, Takahashi M (1987): Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle DJ, Osmond C, Arntzen CJ (eds.) *Photoinhibition*. Elsevier, New York, pp 227-297

Attieh J, Djiana R, Koonjul P, Étienne C, Sparace SA, Saini HS (2002): Cloning and functional expression of two plant thiol methyltransferases: a new class of enzymes involved in the biosynthesis of sulfur volatiles. *Plant Mol Biol* 50: 511-521

Balakirev MY, Tcherniuk SO, Jaquinod M, Chroboczek J (2003): Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep* 4: 517-522

Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schürmann P, Buchanan BB (2003): Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *PNAS* 100: 370-375

Banet G, Pick U, Malkin S, Zamir A (1999): Differential responses to different light spectral ranges of violaxanthin de-epoxidation and accumulation of Cbr, an algal homologue of plant early light inducible proteins, in two strains of *Dunaliella*. *Plant Physiol Biochem* 37: 875-879

Barnes PW, Flint SD, Caldwell MM (1987): Photosynthesis damage and protective pigments in plants from a latitudinal arctic/alpine gradient exposed to supplemental UV-B radiation in the field. *Arctic Alpine Research* 19: 21-27

Bischof K, Hanelt D, Wiencke C (1998): UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Mar Biol* 131: 597-605

- Bischof K, Hanelt D, Tüg H, Karsten U, Brouwer PEM, Wiencke C (1998b): Acclimation of brown algal photosynthesis to ultraviolet-radiation in Arctic coastal waters (Spitsbergen, Norway). *Polar Biol* 20: 388-395
- Bischof K, Hanelt D, Wiencke C (1999): Acclimation of maximal quantum yield of photosynthesis in brown alga *Alaria esculenta* under high light and UV radiation. *Plant Biol* 1: 435-444
- Bischof K, Hanelt D, Wiencke C (2000): UV-effects on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. *Planta* 211: 555-562
- Bischof K, Hanelt D, Wiencke C (2002): UV-radiation and Arctic marine macroalgae. In: Hessen D (ed): *UV-radiation and Arctic ecosystems*. Ecological Studies Series 153, Springer, Heidelberg, Berlin, New York, pp 227-244
- Bischof K, Kräbs G, Wiencke C, Hanelt D (2002a): Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta* 215: 502-509
- Bischof K, Gomez I, Molis M, Hanelt D, Karsten U, Lüder U, Roleda MY, Zacher K, Wiencke C (2006): Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Rev Environ Sci Biotechnol*
- Bischoff F, Molendijk A, Rajendrakumar CSV, Palme K (1999): GTP-binding proteins in plants. *Cell Mol Life Sci* 55 : 233-256
- Blaszczyk A, Brodzki R, Sirko A (1999): Increased resistance to oxidative stress in transgenic tobacco plants overexpressing bacterial serine acetyltransferase. *Plant J* 20: 237-243
- Brey L, Bischof K, Wiencke C (2006): Seasonal changes of the underwater radiation regime in an Arctic fjord and related photosynthetic responses of four kelp species. In Vorbereitung
- Caldwell MM, Teramura AH, Tevini M (1989): The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends Ecol Evol* 4: 363-367
- Casati P, Drincovich MF, Edwards GE, Andreo CS (1999): Regulation of the expression of NADP-malic enzyme by UV-B, red and far-red light in maize seedlings. *Braz J Med Biol Res* 32:1187-1193
- Chandu D, Nandi D (2004): Comparative genomics and functional roles of the ATP-dependent proteases Lon and Clp during cytosolic protein degradation. *Res Microbiol* 155: 710-719
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993): A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Repr* 11: 113-116
- Chen Z-Y, Lavigne LL, Mason CB, Moroney JV (1997): Cloning and overexpression of two cDNAs encoding the low-CO<sub>2</sub>-inducible chloroplast envelope protein LIP-36 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 114: 265-273

- Christensen T (1994): *Algae – A taxonomic survey*. AiO Print Ltd., Odense
- Coelho S, Rijstenbil JW, Sousa-Pinto I, Brown MT (2001): Cellular responses to elevated light levels in *Fucus spiralis* embryos during the first days after fertilization. *Plant Cell Env* 24: 801-810
- Collen J, Davison IR (1999): Reactive production and damage in intertidal *Fucus spp.* (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 35: 54-61
- Davison IR, Pearson GA (1996): Stress tolerance in intertidal seaweeds. *J Phycol* 32: 197-211
- Deckmyn G, Impens I (1997): The ratio UV-B/photosynthetically active radiation (PAR) determines the sensitivity of rye to increased UV-B radiation. *Exp Env Bot* 37: 3-12
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdloy ED, Siebert PD (1996): Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6025-6030
- DiBella LM, Benashski SE, Tedford HW, Harrison A, Patel-King RS, King SM (2001): The Tctex1/Tctex2 class of dynein light chains. Dimerization, differential expression, and interaction with the LC8 protein family. *J Biol Chem* 276: 14366-14373
- Dietrich G, Kalle K, Krauss W, Siedler G (1975): *Allgemeine Meereskunde*. Gebrüder Borntraeger Verlag, Berlin - Stuttgart
- Dietz KJ, Horling F, König J, Baier M (2002): The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J Exp Bot* 53: 1321-1329
- Dring MJ, Makarov V, Schoschina E, Lorenz M, Lüning K (1996): Influence of ultraviolet-radiation on chlorophyll fluorescence and growth in different life history stages of three species of *Laminaria*. *Mar Biol* 126: 183-191
- Duguid JR, Dinauer MC (1990): Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res* 18: 2789-2792
- Dunton KH, Schell DM (1986): Seasonal carbon budget and growth of *Laminaria solidugula* in the Alaskan high Arctic. *Mar Ecol Prog Ser* 31: 57-66
- El Naggat S, Gustat H, Magister H, Rochlitzer R (1995): An electronic personal UV-B-dosimeter. *J Photochem Photobiol B: Biology* 31: 83-86
- Escoubas J-M, Lomas M, LaRoche J, Falkowski PG (1995): Light intensity regulation of cab gene transcription is signalled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10237-10241
- Ford CM, Boss PK, Hoj PB (1998): Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-I* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo*. *J Biol Chem* 273: 9224-9233

- Fourie AM, Sambrook JF, Gething M-JH (1994): Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J Biol Chem* 269: 30470-30478
- Franklin LA, Forster RM (1997): The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *Eur J Phycol* 32: 207-232
- Fridovich I (1986) : Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247: 1-11
- Gong Z, Dong CH, Lee H, Zhu J, Xiong L, Gong D, Stevenson B, Zhu K (2005): A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for developmental and stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 256-267
- Han T (1996) : Effect of ultraviolet-B radiation on *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta) I. Growth and pigment content. *Algae. Kor J Phycol* 11: 155-159
- Hanelt D, Wiencke C, Karsten U, Nultsch W (1997): Photoinhibition and recovery after high light stress in different developmental and life-history stages of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *J Phycol* 33: 387-395
- Hanelt D (1998): Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Mar Biol* 131: 361-369
- Hanelt D, Tüg H, Bischof K, Groß C, Lippert H, Sawall T, Wiencke C (2001): Light regime in an Arctic fjord: a study related to stratospheric ozone depletion as a basis for determination of UV effects on algal growth. *Mar Biol* 138: 649-658
- Hanelt D, Wiencke C, Bischof K (2003): Photosynthesis in Marine Macroalgae. In: Larkum AW, Douglas SE, Raven JA (eds.) *Photosynthesis in Algae*. Kluwer Academic Publishers, pp 413-435
- Hanelt D, Nultsch W (2003b): Photoinhibition in seaweeds. In: Heldmaier G and Werner D (eds.) *Environmental Signal Processing and Adaptation*. Springer Verlag Berlin, pp 1414-1467
- Harms K, von Ballmoos P, Brunold C, Hofgen R, Hesse H (2000): Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. *Plant J* 22: 335-343
- Hayes D, Strange RC (1995): Potential contribution of the glutathion S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic Res* 22: 193-207
- Heidenreich B, Mayer K, Sandermann JR H, Ernst D (2001): Mercury-induced genes in *Arabidopsis thaliana*: identification of induced genes upon long-term mercuric ion exposure. *Plant Cell Environ* 24: 1227-1234
- Hellmann H, Estelle M (2002): Plant development: regulation by protein degradation. *Science* 297: 793-797
- Herrera-Rodriguez MB, Maldonado JM, Perez-Vicente R (2004): Light and metabolic regulation of HAS1, HAS1.1 and HAS2, three asparagine synthetase genes in *Helianthus annuus*. *Plant Physiol Biochem* 42: 511-518



- Ho CL, Saito K (2001): Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* 20: 243-259
- Holm-Hansen O, Lubin D, Helbling EW (1993): Ultraviolet radiation and its effects on organisms in aquatic environments. In: Young AR, Björn LO, Moan J, Nultsch W (eds) *Environmental UV photobiology*. Plenum. New York, pp 379-425
- Hu GZ, Ronne H (1994): Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes in vivo. *Nucleic Acids Res* 22: 2740-2743
- Huang L, McCluskey MP, Ni H, LaRossa RA (2002) : Global gene expression profiles of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* Strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light. *J Bacteriol* 184: 6845-6858
- Im CS, Grossman AR (2002): Identification and regulation of high light-induced genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant J* 30: 301
- Im CS, Zhang Z, Shrager J, Chang C-W, Grossman AR (2003): Analysis of light and CO<sub>2</sub> regulation in *Chlamydomonas reinhardtii* using genome-wide approaches. *Photosynthesis Res* 75: 111-125
- Jansen MAK, Gaba V, Greenberg BM (1998): Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci* 3, 131-135
- Jensen PE, Gilpin M, Knoetzel J, Scheller HV (2000): The PSI-K subunit of photosystem I is involved in the interaction between light-harvesting complex I and the photosystem I reaction center core. *J Biol Chem* 275: 24701-24708
- Jerlov NG (1964): Optical classification of ocean water. In: *Physical aspects of light in the sea*. Univ. Hawaii Press, Honolulu, pp 45-49
- Johnston SD, Lew JE, Berman (1999): Gbp1, a protein with RNA recognition motifs, binds single-stranded telomeric DNA and changes its binding specificity upon dimerization. *Mol Cell Biol* 19: 923-933
- Jordan BR (1996): The effects of Ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. *Adv Bot Res* 22: 97-162
- Kachroo P, Venugopal SC, Navarre DA, Lapchyk L, Kachroo A (2005): Role of salicylic acid and fatty acid destauration pathways in ssi2-mediated signalling. *Plant Physiol* 139: 1717-1735
- Karentz D (1994): Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. *Antarct Res Ser* 62: 93-110
- Karsten U, Bischof K, Wiencke C (2001): Photosynthetic performance of Arctic macroalgae after transplantation from deep to shallow waters. *Oecologia* 127: 11-20
- Kawai-Yamada M, Jin L, Yoshinaga K, Hirata A, Uchimiya H (2001): Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). *PNAS* 98: 12295-12300

Kerr JB, McElroy CT (1993): Evidence for Large Upward Trends of Ultraviolet-B Radiation Linked to Ozone Depletion. *Science* 262: 1032-1034

Khodakovskaya M, Mc Avoy R, Peters J, Wu H, Li Y (2006): Enhanced cold tolerance in transgenic tobacco expressing a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene under the control of a cold-inducible promoter. *Planta* 223: 1090-1100

Kirsch C, Takamiya-Wik M, Reinold S, Hahlbrock K, Somssich IE (1997): Rapid, transient, and highly localized induction of plastidial omega-3 fatty acid desaturase mRNA at fungal infection sites in *Petroselinum crispum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2079-2084

Kujat SL, Owttrim GW (2000): Redox-regulated RNA helicase expression. *Plant Physiol* 124: 703-713

Langer J (1999): Messungen des arktischen stratosphärischen Ozons: Vergleich der Ozonmessungen in Ny Álesund, Spitzbergen, 1997 und 1998. *Ber Polarforschung* 322: 1-222

Laternus F, Giese B, Wiencke C, Adams FC (2000): Low-molecular-weight organoiodine and organobromine compounds released by polar macroalgae – the influence of abiotic factors. *Fresenius J Anal Chem* 368: 297-302

Larkum AWD, Wood WF (1993): The effect of UV-B radiation on photosynthesis and respiration of phytoplankton, benthic macroalgae and seagrasses. *Photosynth Res* 36: 17-23

LaRoche J, Mortain-Bertrand A, Falkowski PG (1991): Light Intensity-Induced Changes in *cab* mRNA and Light Harvesting Complex II Apoprotein Levels in the Unicellular Chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol* 97: 147-153

Levesque V, Fayad T, Ndiaye K, Nahe Diouf M, Lussier JG (2003): Size-selection of cDNA libraries for the cloning of cDNAs after suppression subtractive hybridization. *Biotechniques* 35: 72-78

Lewis S, Donkin ME, Depledge MH (2001): Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquatic Tox* 51: 277-291

Lilly JW, Maul JE, Stern DB (2002): The *Chlamydomonas reinhardtii* organellar genomes respond transcriptionally and post-transcriptionally to abiotic stimuli. *Plant Cell* 14(11): 2681-2706

Liu Y-B, Wei Z-X, Li L, Li H-S, Chen H, Li, X-W (2003): Construction and analysis of SSH cDNA library of human vascular endothelial cells related to gastroduodenal carcinoma. *World J Gastroenterol* 9: 2419-2423

Löw D, Brändle K, Nover L, Forreiter C (2000): Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperons in vivo. *Planta* 211: 575-582

Löwe J, Amos LA (1998): Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391: 203-206

Lüning K (1985): Meeresbotanik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York

- Mackerness A-H, Jordan BR (1999): Changes in Gene Expression in Response to Ultraviolet B-Induced Stress. In: Pessaraki M (ed) Handbook of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp749-768
- Maegawa M, Kunieda M, Kida W (1993): The influence of ultraviolet radiation on the photosynthetic activity of several red algae from different depths. *Jpn J Phycol* 41: 207-214
- Madronich S, McKenzie RL, Björn LO, Caldwell MM (1998): Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J Photochem Photobiol B: Biology* 46: 5-19
- Marri L, Sparla F, Pupillo P, Trost P (2005): Co-ordinated gene expression of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoribulokinase, and CP12 in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 56: 73-80
- Mayfield SP, Bennoun P, Rochaix D (1987): Expression of the nuclear encoded OEE1 protein is required for oxygen evolution and stability of photosystem II particles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* 6: 313-318
- Michal G (1999): Biochemical pathways. Spektrum Akademischer Verlag
- Michler T, Aguilera J, Hanelt D, Bischof K, Wiencke C (2002): Long-term effects of ultraviolet radiation on growth and photosynthetic performance of polar and cold-temperate macroalgae. *Mar Biol* 140: 1117-1127
- Miernyk JA (1999): Protein folding in the plant cell. *Plant Physiol* 121: 695-703
- Minagawa J, Han K-C, Dohmae N, Takio K, Inoue Y (2001): Molecular characterization and gene expression of *lhcb5* gene encoding CP26 in the light-harvesting complex II of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 46: 277-287
- Mittler R (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7, 405-410
- Mock H-P, Grimm B (1997): Reduction of Uroporphyrinogen Decarboxylase by antisense RNA expression affects activities of other enzymes involved in tetrapyrrole biosynthesis and leads to light-dependent necrosis. *Plant Physiol* 113: 1101-1112
- Montané M-H, Dreyer S, Triantaphylides C, Kloppstech K (1997): Early-light-inducible proteins during long-term acclimation of barley to photooxidative stress caused by light and cold: high level of accumulation by posttranscriptional regulation. *Planta* 202: 293-302
- Müller R, Crutzen PJ, Groß JU, Brühl C, Russel JM, Gernandt H, McKenna DS, Tuck AF (1997): Severe ozone loss in the Arctic during the winter of 1995-96. *Nature* 389: 709-712
- Mukherjee A, Dai K, Lutkenhaus J (1993): *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc atl Acad Sci USA* 90: 1053-1057
- Okanami M, Meshi T, Iwabuchi M (1998): Characterization of a DEAD box ATPase/RNA helicase protein of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 26: 2638-2643

- Park SM, Kim JH, Lee YK, Pyee JH, Cheon CI, Hong CB (1997): Nucleotide sequence of a ubiquitin-extension protein gene in *Nicotiana tabacum* and its expression pattern upon heat shock. *Mol Cells* 7: 125-130
- Patel-King RS, Benashski SE, Harrison A, King SM (1997): A *Chlamydomonas* homologue of the putative murine t complex distorter Tctex-2 is an outer arm dynein light chain. *J Cell Biol* 137: 1081-1090
- Pérez-Rodríguez E, Aguilera J, Gomez I, Figueroa FL (2001): Excretion of coumarins by the Mediterranean green alga *Dasycladus vermicularis* in response to environmental stress. *Mar Biol* 139: 633-639
- Pérez-Rodríguez E, Aguilera J, Figueroa FL (2003): Tissue localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser: a photoprotective role? *J Exp Bot* 54: 1093-1100
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e36
- Porankiewicz J, Schelin J, Clarke AK (1998): The ATP-dependent Clp protease is essential for acclimation to UV-B and low temperature in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol Microbiol* 29: 275-283
- Ragan MA, Glombitza KW (1986): Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Phycological Research* 4: 129-241
- Ray S, Anderson JM, Urmeev FI, Goodwin SB (2003): Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Mol Biol* 53: 701-714
- Remacle C, Baurain D, Cardol P, Matagne RF (2001): Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I: characterization of two mutations affecting the nd1 coding sequence. *Genetics* 158: 1051-1060
- Rex M, Harris NRP, Gathen P von der, Lehmann R, Braathen GO, Reimer E, Beck A, Chipperfield MP, Alfieri R, Allaart M, O'Connor F, Dier H, Dorokhov V, Fast H, Gil M, Kyrö E, Litynska Z, Mikkelsen IS, Molyneux MG, Nakane H, Notholt J, Rummukainen M, Viatte P, Wenger J (1997): Prolonged stratospheric ozone loss in the 1995-96 Arctic winter. *Nature* 389: 835-838
- Richter M: Rolle der mitochondrialen Respiration im Licht. (In: <http://iabserv.biologie.uni-mainz.de/iab/Richter/forschung/forschung.htm>)
- Richter M (2000): The efficiency of proton pumping across the thylakoid membrane is affected by light through redox regulation. *Plant Physiol Biochem* 38: 112
- Rikin A, Dillwith JW, Bergman DK (1993): Correlation between the circadian rhythm of resistance to extreme temperatures and changes in fatty acid composition in cotton seedlings. *Plant Physiol* 101: 31-36

- Roleda MY, van de Poll WH, Hanelt D, Wiencke C (2004): PAR and UVBR effects on photosynthesis, viability, growth and DNA in different life stages of two coexisting Gigartinales: implications for recruitment and zonation pattern. *Mar Ecol Progr Ser* 281: 37-50
- Roleda MY, Hanelt D, Wiencke C (2005a): Growth kinetics related to physiological parameters in young *Saccorhiza dermatodea* and *Alaria esculenta* sporophytes exposed to UV radiation. *Pol Biol* 28: 466-479
- Roleda MY, Wiencke C, Hanelt D, van de Poll WH, Gruber A (2005b): Sensitivity of Laminariales zoospores from Helgoland (North Sea) to ultraviolet and photosynthetically active radiation: implications for depth distribution and seasonal reproduction. *Plant Cell Environ* 28: 466-479
- Roleda MY (2006a): Effects of ultraviolet radiation on early life stages of cold temperate and Arctic macroalgae: implication for recruitment and vertical depth distribution. *Ber Polar Meeresforsch* 526: 1-176
- Roleda MY, Hanelt D, Wiencke C (2006b): Growth and DNA damage in young *Laminaria* sporophytes exposed to ultraviolet radiation: Implication for depth zonation of kelps on Helgoland (North Sea). *Mar Biol* 148: 1201-1211
- Roleda MY, Clayton MN, Wiencke C (2006c): Screening capacity of UV-absorbing compounds in spores of Arctic Laminariales. *J Exper Mar Biol Ecol* (subm.)
- Rozema J, Bjorn LO, Bornman JF, Gaberscik A, Häder DP, Trost T, Germ M, Klisch M, Groniger A, Sinha RP, Lebert M, He YY, Buffoni-Hall R, de Bakker NV, van de Staaij J, Meijkamp BB (2002): The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems--an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J Photochem Photobiol B* 66: 2-12
- Salin ML (1991): Chloroplast and mitochondrial mechanisms for protection against oxygen toxicity. *Free Radic Res Commun* 12-13: 851-858
- Savard F, Richard C, Guertin M (1996): The *Chlamydomonas reinhardtii* LI818 gene represents a distant relative to the cabI/II genes that is regulated during the cell cycle and in response to illumination. *Plant Mol Biol* 32: 461-473
- Sävenstrand H, Brosché M, Ängelsten M, Strid A (2000): Molecular markers for ozone stress isolated by suppression subtractive hybridisation: specificity of gene expression and identification of a novel stress-regulated gene. *Plant Cell Environ* 23: 689-700
- Schäfer C, Schmid V, Roos M (1994): Characterization of high-light-induced increases in xanthophylls cycle pigment and lutein contents in photoautotrophic cell cultures. *J Photochem Photobiol B: Biol* 22: 67-75
- Schoenwaelder MEA, Clayton MN (1999): The presence of phenolic compounds in isolated cell walls of brown algae. *Phycologia* 38: 161-166
- Schoenwaelder MEA, Clayton MN (2000): Physode formation in embryos of *Phyllospora comosa* and *Hormosira banksii* (Phaeophyceae). *Phycologia* 39: 1-9

- Schroda M, Vallon O, Wollman F-A, Beck CF (1999): A chloroplast-targeted Heat Shock Protein 60 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell* 11: 1165-1178
- Schürmann P, Jacquot J-P (2000): Plant thioredoxin systems revisited. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 371-400
- Schwechheimer C, Calderon Villalobos LI (2004): Cullin-containing E3 ubiquitin ligases in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 7: 677-686
- Shapira AK, Lers A, Heifetz PB, Irihimovitz V, Osmond CB, Gillham NW, Boynton JE (1997): Differential regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* during photoacclimation: light stress transiently suppresses synthesis of the Rubisco LSU protein while enhancing synthesis of the PS II D1 protein. *Plant Mol Biol* 33: 1001
- Smart CC, Fleming AJ (1996): Hormonal and environmental regulation of a plant PDR5-like ABC transporter. *J Biol Chem* 271: 19351-19357
- Somanachi A, Moroney V (1999): As *Chlamydomonas reinhardtii* acclimates to low-CO<sub>2</sub> conditions there is an increase in cyclophilin expression. *Plant Mol Biol* 40: 1055-1062
- Song JJ, Rhee JG, Suntharalingam M, Walsh SA, Spitz DR, Lee YJ (2002): Role of Glutaredoxin in metabolic oxidative stress. *J Biol Chem* 277: 46566-46575
- Swanson AK, Druehl LD (2002): Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquat Bot* 73: 241-253
- Sweetlove LJ, Heazlewood JL, Herald VH, Holtzapffel R, Day DA, Leaver CJ, Millar AH (2002): The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. *Plant J* 32: 891-904
- Taniguchi M, Sugiyama T (1997): The Expression of 2-Oxoglutarate/Malate Translocator in the Bundle-Sheath Mitochondria of *Panicum miliaceum*, a NAD-Malic Enzyme-Type C4 Plant, Is Regulated by Light and Development. *Plant Physiol* 114: 285-293
- Teramura AH, Sullivan JH (1994): Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynth Res* 39: 463-473
- Turunen M, Heller W, Stich S, Sandermann H, Sutinen ML, Norokorpi Y (1999): The effects of UV exclusion on the soluble phenolics of young Scots pine seedlings in the subarctic. *Environ Pollut* 106: 219-228
- Unkles SE, Hawker KL, Grieve C, Campbell EI, Montague P, Kinghorn R (1991): crnA encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 204-208
- Valentini SR, Casolari JM, Oliviera CC, Silver PA, McBride AE (2002): Genetic interactions of Yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to Poly(A)-binding protein and protein kinase C signalling. *Genetics* 160: 393-405
- Van den Hoek C, Jahns HM, Mann DG (1993): *Algen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York

- van de Poll WH, Hanelt D, Hoyer K, Buma AGJ, Breeman AM (2002): Ultraviolet-B-induced cyclobutane-pyrimidine dimer formation and repair in Arctic marine macrophytes. *Photochem Photobiol* 76(5): 493-500
- von Zglinicki T (2000): Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* 908: 99-110
- Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F (2002): Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathion S-transferase gene family. *Plant Mol Biol* 49: 515-532
- Weber A, Flügge UI (2002): Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *J Exp Bot* 53: 865-874
- Wedel N, Soll J (1998): Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase/CP12/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex dissociation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9699-9704
- Weissbach H, Etienne F, Hoshi T, Heinemann SH, Lowther WT, Matthews B, St John G, Nathan C, Brot N (2002): Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Arch Biochem Biophys* 397: 172-178
- Wentworth M, Ruban AV, Horton P (2003): Thermodynamic investigation into the mechanism of the chlorophyll fluorescence quenching in isolated photosystem II light-harvesting complexes. *K Biol Chem* 278: 21845-21850
- Wiencke C, Gomez I, Pakker H, Flores-Moya A, Altamirano M, Hanelt D, Bischof K, Figueroa FL (2000): Impact of UV-radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA of brown algal zoospores: implications for depth zonation. *Mar Ecol Progr Ser* 197: 217-229
- Wiencke C, Clayton MN, Schoenwaelder M (2004): Sensitivity and acclimation to UV radiation of zoospores from five species of Laminariales from the Arctic. *Mar Biol* 145: 31-39
- Wiencke C, Vögele B, Kovaltchouk NA, Hop H (2004a): Species composition and zonation of marine benthic macroalgae at Hansneset in Kongsfjorden, Svalbard. *Ber Polarforsch Meeresforsch* 492: 55-62
- Worrest RC, Häder D-P (1997): Overview of the effects of increased solar UV on aquatic microorganisms. *Photochem Photobiol* 65: 257-259
- Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ (1999): Combining SSH and cDNA microarray for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 27: 1517-1523

# Lebenslauf

Name: Stephan Georg Kremb

Geburtsdatum: 21. März 1975

Geburtsort: Wasserburg am Inn

Wohnort: Rauwagnerstrasse 3  
85560 Ebersberg

Telefon: 08092-863285  
0162-3673628

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung: September 1981 bis Juli 1985 Grundschule Wasserburg  
September 1985 bis Juli 1988 Gymnasium Gars am Inn  
September 1988 bis Juli 1995 Gymnasium Wasserburg

Schulabschluss: Allgemeines Abitur

Studium: November 1995 bis Oktober 1997  
Grundstudium der Biologie an der TU München

November 1997 bis Oktober 2001  
Hauptstudium der Biologie an der Universität Bremen  
mit den Schwerpunkten Mikrobiologie/Biotechnologie,  
Biochemie, Zoologie und Meereskunde

Februar bis Mai 1999  
Forschungspraktikum im Fachgebiet Biochemie  
Thema: „Untersuchungen zur Synchronisierung von Glioblastomzellen und Lungenfibroblasten in verschiedenen Phasen des Zellzyklus“

Oktober 1999 bis März 2000  
Projektpraktikum im Fachgebiet Virologie  
Thema: „Herstellung von MRC5-Transfektanten mittels RNase L Inhibitor-positiver und –negativer Plasmid-DNA“

Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität Bremen,  
Titel: „Etablierung einer Methode zum Nachweis der Negativstrang-RNA des Hepatitis C-Virus“



- Promotionsarbeit : Juni 2002 bis vorr. Oktober 2006  
Anfertigung einer Dissertation in einem Kooperationsprojekt des Alfred-Wegener-Institutes für Polar- und Meeresforschung (AWI Bremerhaven) und des GSF-Forschungszentrums (München)  
Thema: „UV-induzierte Veränderungen der Genexpression bei Marinen Makroalgen“
- Zusatzqualifikationen: Ausbildung zum staatl. geprüften Forschungstaucher an der TU München  
(Prüfung erfolgreich abgelegt am 16./17.09.1996)
- Berufsbezog. Erfahrungen: Juli – September 1999 und Mai – Juli 2000  
Einsatz als Forschungstaucher in der Arktis/Spitzbergen (Koldewey-Station / Alfred-Wegener-Institut)
- Juni und September 2001  
Einsatz als Forschungstaucher auf FS Heincke (im Rahmen des Projektes „Umsatzprozesse in permeablen Schelfsedimenten“ des MPI für Marine Mikrobiologie)
- November 2001 bis April 2002  
Molekularbiologische Charakterisierung von Bakterien-Gemeinschaften in Korallensedimenten (im Rahmen des eines Projektes des MPI für Marine Mikrobiologie mit Feldexkursion nach Heron Island / Great Barrier Reef, Australien)
- Juni – August 2003 und Mai – Juli 2004  
Teilnahme an Nordpolar-Expeditionen nach Spitzbergen im Rahmen der Doktorarbeit, dabei Übernahme der Expeditions-Leitung vom 04.07. – 07.08.2003 und der Taucheinsatzleitung
- Januar bis Juni 2006  
Mitarbeiter am Sea Life-Centre München, Tätigkeit als stellvertretender aquaristischer Leiter