

**Nachweis und Charakterisierung der
Ketocarotinoidakkumulation in Zygosporien des
Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii***

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sonja Werner
geb. am 09.01.1980 in Bad Schwalbach
Mainz, 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10. August 2011

Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.

Albert Einstein

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.	Carotinoide	1
1.1.	Primär- und Sekundär-carotinoide.....	1
1.2.	Carotinoidfunktionen.....	2
2.	Carotinoidbiosynthese	4
2.1.	Ketocarotinoidakkumulation bei Grünalgen und Pilzen.....	6
2.2.	Die Ketocarotinoidbiosynthese.....	8
2.3.	Das Gen der BKT in dem Modellorganismus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10
3.	Die orangefarbenen Zygosporien von <i>C. reinhardtii</i> als potentiell ketocarotinoidakkumulierendes Zellstadium	11
4.	Zielsetzung dieser Forschungsarbeit	13
II.	MATERIAL UND METHODE	15
1.	Chemikalien	15
2.	Zellbiologische Arbeiten	15
2.1.	Steriles Arbeiten.....	15
2.2.	Algenkulturen und Anzuchtbedingungen.....	15
2.3.	Bestimmung der Zellzahl.....	17
2.4.	Medien.....	17
2.5.	Zygotenherstellung.....	18
2.5.1.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	18
2.5.1.1.	Gameteninduktion.....	18
2.5.1.2.	Paarung.....	18
2.5.1.3.	Zygotenreifung durch Lagerung.....	20
2.5.1.4.	Ernten: Trennung von Zygoten und ungepaarten Gameten.....	20
2.5.1.5.	Besonderheiten bei der Paarung auf Minimalmedium.....	21
2.5.1.6.	Untersuchung der Zygosporienreifung.....	21
2.5.1.7.	Versuche mit dem Carotinoidbiosynthese-Inhibitor Norflurazon.....	22
2.5.1.8.	Besonderheiten bei der Paarung von <i>lor1</i> -Mutanten.....	22
2.5.1.9.	Gametenuntersuchungen.....	23
2.5.1.10.	Bestimmung der Paarungseffizienzen.....	23
2.5.1.11.	Tetradenanalyse mit Zygoten von <i>C. reinhardtii</i>	24
2.5.2.	<i>Chlamydomonas moewusii</i>	26
2.5.2.1.	Paarung.....	26
2.5.2.2.	Zygotenreifung durch Lagerung.....	27
2.5.2.3.	Ernten: Trennung von Zygoten und ungepaarten Gameten.....	27
2.6.	Mikroskopische Untersuchungen.....	27
2.6.1.	Lichtmikroskopische Untersuchungen.....	27
2.6.1.1.	Lipidanfärbung mittels Sudanschwarz B.....	28
2.6.2.	Untersuchungen mit dem Differentialinterferenzkontrast-Mikroskop.....	28
2.6.3.	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie.....	28
2.6.3.1.	Probenvorbereitung.....	28
2.6.3.2.	Untersuchung mittels TEM.....	29

3.	Chromatographische Verfahren.....	30
3.1.	HPLC.....	30
3.1.1.	Säulen.....	30
3.1.2.	Gradienten und Methoden.....	30
3.1.3.	Quantifizierung der Pigmentmengen.....	31
3.1.4.	Probennahme.....	31
3.1.5.	Extraktionen der Proben.....	32
3.1.6.	Extraktion von Pigmenten.....	32
3.1.6.1.	Extraktion mittels Diethylether.....	32
3.1.6.2.	Extraktion mittels Butanol.....	33
3.1.7.	Trennung von Gameten und Zygosporen für Pigmentanalysen.....	33
3.1.8.	Reduktion von Ketocarotinoiden.....	33
3.2.	Massenspektrometrische Untersuchungen.....	34
3.2.1.	Aufarbeiten der Proben.....	34
3.2.2.	MS-Methode.....	34
3.3.	Dünnschichtchromatographie (DC).....	34
3.3.1.	DC zur Auftrennung von Ketocarotinoiden.....	34
3.3.2.	DC zur Auftrennung von Lipiden.....	35
4.	Separierung und Identifikation verschiedener zellulärer Lipidphasen mittels Ultrazentrifugation.....	36
5.	Photometrie.....	37
5.1.	Photometrische Untersuchung von Pigmenten.....	37
5.2.	Photometrische Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von DNA und RNA.....	37
6.	Molekularbiologische Arbeiten.....	37
6.1.	Isolierung von DNA aus <i>Chlamydomonas</i>	37
6.2.	Isolierung von RNA aus <i>Chlamydomonas</i>	38
6.2.1.	RNA-Isolierung aus vegetative Zellen.....	39
6.2.2.	RNA-Isolierung aus Zygosporen und ungepaarten Gameten.....	39
6.3.	Reverse Transkription.....	39
6.4.	PCR.....	40
6.4.1.	Amplifikation verschiedener Gene aus <i>C. reinhardtii</i>	41
6.4.2.	Bestimmung des Paarungstypes (Matingtype-PCR).....	41
6.5.	Agarosegele.....	42
6.6.	Sequenzierungen.....	42
7.	Verwendete Bioinformatik-Programme und Datenbanken.....	42

III.	ERGEBNISSE	45
1.	Herstellung und erste Charakterisierung der Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i>	45
1.1.	Paarung von Gameten verschiedener Stämme	45
1.1.1.	Paarung der Stämme CLS 31-8 x CLS 31-10.....	45
1.1.2.	Paarung der Stämme cc620 x cc621.....	48
1.2.	Lichtmikroskopische Untersuchungen der verschiedenen Zellstadien.....	51
1.3.	HPLC-Untersuchungen der Pigmente verschiedener Zellstadien.....	53
1.3.1.	Vegetative Zellen und Zygosporen der Stämme CLS 31-8 x CLS 31-10	53
1.3.2.	Vegetative Zellen, Gameten und Zygosporen der Stämme cc620 x cc621	54
2.	Nachweis der Identität der Ketocarotinoide aus Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i>	56
2.1.	Die vorläufige Identifizierung von Astaxanthin und Canthaxanthin anhand Referenzpigmenten	56
2.1.1.	Retentionszeiten als erstes Nachweiskriterium.....	56
2.1.2.	Zygoten- und Referenzpigmente besitzen die gleichen Absorptionseigenschaften.....	57
2.2.	Vorläufige Identifizierung des 4-Ketoluteins.....	58
2.3.	Die Ketocarotinoide liegen sowohl in der <i>all-trans</i> - als auch in der <i>cis</i> -Konformation vor.....	59
2.4.	Chemische Reduktion der Pigmente	61
2.5.	Massenspektroskopische Untersuchung der unbekanntenen Pigmente.....	65
2.6.	Ketocarotinoidvorkommen in <i>Haematococcus pluvialis</i>	66
2.7.	Untersuchung der Monoacyl- und Diacyl-Ketocarotinoidester in Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i>	69
2.8.	Identifizierung des 4-Ketolutein und dessen Acylester mit Hilfe der Pigmentmutante <i>lor1</i>	72
2.8.1.	Untersuchungen der <i>lor1</i> -Stämme cc3873 und cc2420	72
2.8.2.	Gewinnung eines <i>lor1</i> -Stammes mit dem Paarungstyp mt- (cc2420 C12).....	74
2.8.3.	Paarung der <i>lor1</i> -Stämme von cc2420 E3.6 mit cc2420 C12.....	76
2.8.4.	Paarung der <i>lor1</i> -Stämme ASX1-1b und ASX2-11d	79
3.	Änderung der Pigmentgehalte in Gameten und Zygoten von <i>C. reinhardtii</i> unter mehrwöchiger Dunkelinkubation	85
3.1.	Vegetative Zellen und Gameten.....	85
3.1.1.	Die Pigmentgehalte der vegetative Zellen	85
3.1.2.	Die Pigmentgehalte in den Gameten ändern sich infolge der Lagerung	86
3.1.2.1.	Die Änderung in den absoluten Pigmentgehalten	86
3.1.2.2.	Die prozentuale Pigmentverteilung in unterschiedlich lang gelagerten Gameten.....	88
3.1.2.3.	Luteinester in gealterten Gameten von <i>C. reinhardtii</i>	89
3.2.	Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i>	91
3.2.1.	Der zeitliche Verlauf der Zygotenreifung.....	92
3.2.1.1.	Zellmorphologische Änderungen während der Zygotenreifung	93
3.2.1.2.	Die Änderung der Pigmentzusammensetzung und -menge während der Zygotenreifung....	94
3.2.1.2.1.	Änderungen im Pigmentmuster.....	94
3.2.1.2.2.	Änderungen in der Ketocarotinoidzusammensetzung	97
3.2.1.2.3.	Änderungen in den Pigmentverhältnissen	99
3.3.	Übersicht über die Pigmentzusammensetzung verschiedener Zellstadien von <i>C. reinhardtii</i> sowie der Aplanosporen von <i>H. pluvialis</i>	102
4.	Der Einfluss des Inhibitors Norflurazon auf die Zygotenentwicklung von <i>C. reinhardtii</i>	104
4.1.	Der Einfluss von Norflurazon auf die Pigmentzusammensetzung während der Zygotenreifung.....	104
5.	Einfluss des Nährmediums auf die Zygotenreife von <i>C. reinhardtii</i>	108
5.1.	Morphologische Besonderheiten von auf Minimalmedium gereiften Zygoten	108
5.2.	Pigmentzusammensetzung von auf Minimalmedium gereiften Zygoten	109

6.	Der Einfluss verschiedener Lagerungstemperaturen auf die Zygoten von <i>C. reinhardtii</i>	111
6.1.	Die Lagerung bei 9 °C.....	111
6.1.1.	Der Einfluss auf die Zellmorphologie	111
6.1.2.	Der Einfluss auf die Pigmentzusammensetzung.....	113
6.1.3.	Der zeitliche Verlauf der Änderung im Pigmentgehalt.....	115
6.1.4.	Ketocarotinoide werden nicht bei allen 9 °C-Zygoten gebildet.....	117
6.2.	Die Lagerung bei 30 °C.....	119
6.3.	Weitere Lagerungstemperaturen.....	120
7.	Lipidakkumulation in vegetativen Zellen, Zygoten und 9°C Zygoten sowie <i>lor1</i>-Zygoten	121
7.1.	Übersicht über Lipidvorkommen in vegetativen Zellen und Zygosporen.....	121
7.2.	Akkumulation von Lipiden während der Zygosporenreifung von <i>C. reinhardtii</i> bei 22°C.....	122
7.3.	Akkumulation von Lipiden während der Zygosporenreifung bei 9°C.....	123
7.4.	Identifizierung der unterschiedlichen Lipidklassen mittels Dünnschichtchromatographie....	125
7.5.	Akkumulation von Lipiden während der Zygosporenreifung der <i>lor1</i> -Mutante von <i>C. reinhardtii</i> bei 22°C.....	127
7.6.	Auftrennung der Lipidfraktionen mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation.....	128
7.6.1.	Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i>	128
7.6.2.	Aplanosporen von <i>H. pluvialis</i>	130
8.	9 °C-Zygoten können Ketocarotinoide synthetisieren, wenn man sie in eine 30 °C warme Umgebung transferiert	131
8.1.	Mikroskopische Beobachtungen dieser Zygosporen.....	131
8.2.	Die Pigmentzusammensetzung in den kalt gelagerten Zygosporen ändert sich durch die Lagerung unter warmen Bedingungen deutlich.....	132
9.	Untersuchungen der BKT und Vergleichsgenen in verschiedenen Zellstadien	134
9.1.	Nachweis der BKT und Kontrollgenen in vegetativen Zellen mittels RT-PCR.....	134
9.2.	Nachweis der Expression der BKT und Kontrollgenen in Zygoten mittels RT-PCR.....	136
9.3.	Nachweis von zygotenspezifischen Transkripten: Das Gen <i>Zym C</i>	138
9.4.	Nachweis von frühen Zygotengenen: Das Gen <i>EZY 15</i>	139
10.	Untersuchung der Zygoten von <i>Chlamydomonas moewusii</i>	141
10.1.	Zygotenbildung von <i>C. moewusii</i>	141
10.2.	Der Einfluss von Stickstoffmangel auf die Zygotenbildung von <i>C. moewusii</i>	143
10.3.	Der Einfluss von Licht und Stickstoffmangel.....	144

IV.	DISKUSSION	147
1.	Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i> akkumulieren große Mengen an Ketocarotinoiden....	147
1.1.	Der Pigmentgehalt in vegetativen Zellen und Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i>	147
2.	Die Pigmentzusammensetzung in den Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i> wird wahrscheinlich nicht durch die Substratspezifität der BKT, sondern durch die Substratbereitstellung bestimmt.....	151
2.1.	Die Synthese von Ketocarotinoiden mittels BKT	151
2.2.	Die Regulation der BKT vermittelten Ketocarotinoidakkumulation.....	153
2.3.	PS-Carotinoide könnten bei <i>C. reinhardtii</i> als Substrate der Ketocarotinoidsynthese dienen	156
2.3.1.	Inhibitorexperimente deuten auf eine Ketocarotinoidsynthese, die unabhängig von der Bildung neuer Carotinoide ist	158
2.3.2.	Mögliche Versuchsansätze zur Festigung diese Hypothese	161
3.	Zygosporen akkumulieren neben den Ketocarotinoiden große Mengen an Lipiden..	163
3.1.	Unterschiede im Lipidmuster bei vegetativen Zellen und Zygosporen	163
3.2.	Die Akkumulation von Lipiden und Ketocarotinoiden stehen miteinander in Verbindung ...	166
3.2.1.	Cytosolische Lipidtröpfchen als Orte der Ketocarotinoidakkumulation.....	166
3.2.2.	Die Verbindung von Ketocarotinoid- und Lipidsynthese	168
3.2.3.	Die Veresterung der Ketocarotinoide mit Fettsäuren	169
4.	Die Akkumulation von Ketocarotinoiden und Lipiden in Zygosporen wird von einer Reorganisation der Zelle begleitet.....	171
4.1.	Die Akkumulation von Stärkekörnern	171
4.2.	Die Reduktion des Chloroplasten	172
4.3.	Die Bildung einer sekundären Zellwand	173
4.3.1.	Der Aufbau der sekundären Zellwand bei den Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i>	173
4.3.2.	Die besonderen Eigenschaften von sekundären Zellwänden der algalen Dauerstadien	173
5.	Die physiologische Bedeutung der Ketocarotinoidakkumulation für die Zygosporen.....	177
6.	Die Energieversorgung entscheidet über die Entwicklung der Zygosporen	182
6.1.	Die Zygosporenentwicklung bei <i>C. reinhardtii</i> ist abhängig von einer Energiezufuhr	182
6.2.	Die Energieversorgung der Aplanosporen von <i>H. pluvialis</i>	182
6.3.	Mögliche Energiegewinnung der Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i> unter natürlichen Bedingungen	184
7.	Die Bildung der Ketocarotinoide in den Zygosporen ist temperaturabhängig	186
8.	<i>Chlamydomonas</i> als neues Modellsystem der Ketocarotinoidbiosynthese in Grünalgen	189
8.1	Die Bedeutung der <i>lor1</i> -Zygote	190
8.2	Die Bedeutung der 9 °C-Zygote	192
8.3	Grenzen eines Modellsystems: Untersuchungen zur Ketocarotinoidsynthese in <i>C. reinhardtii</i> mittels heterologer Expression	193
9.	Zusammenfassendes Modell zu Ketocarotinoidsynthese und Lipidakkumulation in den Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i>	195

V.	ZUSAMMENFASSUNG	199
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	201
VII.	ANHANG	
ANHANG 1:	Abkürzungsverzeichnis	A-01
ANHANG 2:	Material und Methoden	A-04
ANHANG 3:	Ergebnisse	A-22

I. EINLEITUNG

1. Carotinoide

Als Carotinoide bezeichnet man gelbe, orangefarbene oder rote Pigmente, die aus acht Isopreneinheiten bestehen und folglich einen sehr lipophilen C_{40} -Körper besitzen. Die Farbe der Pigmente wird von der unterschiedlichen Länge des konjugierten Doppelbindungssystems bestimmt. Sie werden in reine Kohlenwasserstoffverbindungen, die Carotine, sowie in sauerstoffhaltige Kohlenwasserstoffverbindungen, die Xanthophylle, eingeteilt (Britton 2004). Carotinoide findet man in großen Mengen in den Chloroplasten und Chromoplasten von pflanzlichen Zellen, aber auch in vielen Tieren, Pilzen und Bakterien. Bis auf wenige Ausnahmen ist ihre Synthese auf pflanzliche Organismen, Bakterien und Pilze beschränkt, so dass sie von Tieren und Menschen als essentielle Nahrungskomponenten aufgenommen werden müssen. Diese können sie allerdings strukturell modifiziert (Britton 2004).

1.1. Primär- und Sekundärcarotinoide

Die pflanzlichen Carotinoide werden aufgrund ihrer Funktion in zwei Gruppen unterteilt (Richter 1998). Als Primärcarotinoide werden alle Carotinoide bezeichnet, die direkt an der Photosynthese beteiligt sind. Sie werden auch Photosynthesecarotinoide (PS-Carotinoide) genannt. Dazu zählen in Gefäßpflanzen und Grünalgen neben β -Carotin und Lutein auch Neoxanthin, die Pigmente des Violaxanthin-Antheraxanthin-Zeaxanthin-Zyklus und das in einer Reihe von Grünalgen anzutreffende Loroxanthin (Abb. I.1).

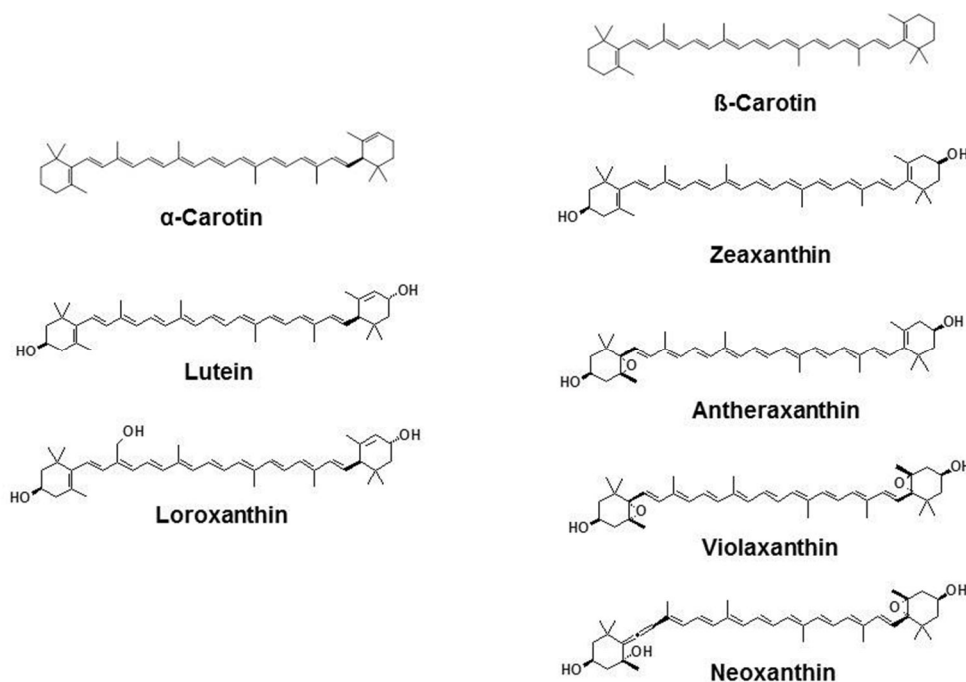


Abbildung I.1) Strukturformeln der Primärcarotinoide von Grünalgen, links: α -Carotin und alle von ihm abgeleiteten PS-Carotinoide, rechts β -Carotin und alle von ihm abgeleiteten PS-Carotinoide.

Als Sekundärkarotinoide werden folglich alle anderen Carotinoide der Zelle bezeichnet, die z.B. an der Farbgebung von Blüten oder Früchten beteiligt oder in Speichergeweben lokalisiert sind. Dazu zählen z.B. Capsorubin und β -Cryptoxanthin in den Früchten von Paprika, aber auch β -Carotin, wenn es nicht an der Photosynthese beteiligt, sondern z.B. in der Wurzel der Karotte gespeichert ist (Britton 2009). In algalen Zellen bezeichnet man als Sekundärkarotinoide solche Pigmente, die gegen Ende der Entwicklungsperiode anstelle oder in Ergänzung zu den primären Carotinoiden gebildet werden (Czygan 1968). Dazu zählen auch die im Rahmen dieser Forschungsarbeit untersuchten Ketocarotinoide.

1.2. Carotinoidfunktionen

Die primären Carotinoide sind in den Photosystemen von pflanzlichen Zellen vor allem an der Lichtsammlung beteiligt. Aufgrund ihres im Vergleich zu den Chlorophyllen leicht in den grünen Wellenlängenbereich verschobenen Absorptionsspektrums verringern sie die Grünlücke der Lichtsammelkomplexe und ermöglichen so eine effektivere Absorption der Lichtenergie, die für die Photosyntheseleistung der Zellen genutzt werden kann (Schopfer und Brennicke 2006).

Daneben sind die primären Carotinoide am nicht-photochemischen Quenching (NPQ) der Chlorophyllfluoreszenz beteiligt, das in den Lichtsammelantennen eine Umwandlung von überschüssiger Energie in Wärme ermöglicht. Bei einer Überanregung der Photosysteme kommt es zu einer Auslastung der Elektronentransportkette, die dazu führt, dass die Energie von den angeregten Chlorophyllen nicht mehr zur Ladungstrennung genutzt werden kann. Folglich verbleibt die Anregungsenergie in den Chlorophyllen länger, so dass sich die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Triplett-Chlorophyllen erhöht. Dieser Triplett-Chlorophyll-Zustand ist sehr langlebig. Durch die Übertragung seiner Energie auf Sauerstoff kann sehr reaktiver Singulett-Sauerstoff entstehen, der durch weitere Reaktionen zur Bildung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt, die schwerwiegende Schädigungen innerhalb der Zelle und den Photosynthesekomplexen hervorrufen (Richter 1998).

Die sekundären Carotinoide sind z.B. an der Farbgebung von Blüten und Früchten beteiligt. Sie ermöglichen folglich eine für Tiere gesteigerte Attraktivität der Pflanzen, die zu einer vermehrten Bestäubung von Blüten oder einem verstärktem Fressen der Früchte und damit zu einer Verbreitung der Samen führen (Zhu et al. 2010).

In tierischen Organismen sind die Carotinoide u.a. essentiell am Farbsehen (β -Carotin als Provitamin A in allen Säugern), an der Farbgebung (Canthaxanthin beim Flamingo) oder als Antioxidans am Zellschutz (Astaxanthin bei Lachsen) beteiligt (Britton 2004, Britton 2009).

Medizinisches Interesse erlangten die Carotinoide vor allem aufgrund ihres großen antioxidativen Potentials. In verschiedenen Experimenten an tierischen und menschlichen

Zellen konnte nachgewiesen werden, dass sie die Zellen, u.a. die des Immunsystems, vor oxidativen Schäden schützen. Dabei spielen vor allem die Carotinoide Lutein, β -Carotin, Astaxanthin und Lycopin eine große Rolle (Britton 2009). Daneben haben alle Carotinoide mit Provitamin A-Wirkung essentielle Bedeutung für die Sehfähigkeit (Britton 2009). Aber auch Lutein und Zeaxanthin sind durch ihre Präsenz im gelben Augenfleck daran beteiligt. Sie schützen vor einer Degeneration des Augenflecks und können folglich eine Erblindung verhindern (Farré et al. 2010). Für das vor allem in Tomaten enthaltene Lycopin wurde eine Prävention gegenüber verschiedener Krebsarten sowie koronarer Herzkrankheiten nachgewiesen (Farré et al. 2010).

Wirtschaftliches Interesse finden Carotinoide vor allem als Farbstoffe in der Lebensmittelindustrie. Neben β -Carotin besitzen Lycopin, Zeaxanthin und Astaxanthin die größte Bedeutung (Britton 2009). In den vergangenen Jahren wurden sie aufgrund ihrer Hydrophobizität vor allem bei der Färbung von fetthaltigen Lebensmitteln eingesetzt. In den letzten Jahren wurden die Farbstoffe technologisch allerdings so verändert, dass sie auch in wässrigen Lösungen eingesetzt werden können. Bekanntestes Beispiel ist das β -Carotin, das z.B. in pflanzlichem Öl dispergiert und dann in Form feinsten Tröpfchen in eine Matrix aus Dextrin und Glucose eingebettet wird (BASF 1995). Dadurch ist es auch in kaltem Wasser unter Bildung einer feinperligen Dispersion löslich und kann folglich in vielen Getränken, wie z.B. Limonade, verwendet werden.

Auch die im Rahmen dieser Forschungsarbeit untersuchten Ketocarotinoide sind von großem ökonomischem Interesse. Sie stellen essentielle Nahrungsbestandteile verschiedener Krustentiere und Fische dar. Folglich müssen sie den Aquakulturen von Shrimps, Lachsen und Hummern in großen Mengen zugesetzt werden. Zwar sind synthetische Ketocarotinoide erhältlich, aber die biotechnologische Herstellung ist weiterhin von großem wirtschaftlichem Interesse (Jin et al. 2006, Britton 2009). Zusätzlich wurden sie in den letzten Jahren als Antioxidantien in der Medizin eingesetzt, da man eine protektive Wirkung vor Krebs diskutiert. Die Nahrungsmittelindustrie setzt sie zusätzlich als Farbstoff, z.B. in Wurstwaren und Eiern ein (Britton 2009).

2. Carotinoidbiosynthese

Carotinoide zählen zu den Isoprenoiden, langkettigen Kohlenstoffkörpern, die aus der Verknüpfung von Isoprenen, C₅-Körpern, entstehen und in vielen Bereichen der pflanzlichen Zelle eine Rolle spielen. Aufgrund ihres C₄₀-Grundgerüsts werden Carotinoide auch den Tetraterpenen zugeordnet. Daneben findet man Isoprenoide z.B. in Form von C₁₀-Körpern als Monoterpene, zu denen verschiedene flüchtige Aromen verschiedener Pflanzen gehören, als C₁₅-Körper in Form von Sesquiterpenen, die als Ausgangsverbindung für die Bildung des Polyprenylschwanzes von Ubichinon und Plastochinon dienen, als C₂₀-Körper (Diterpene) in Form des Phytols und u.a. auch als C₃₀-Körper (Triterpene), zu denen die Sterole und Steroide gehören (Schopfer und Brennicke 2006).

Die Bildung der pflanzlichen Carotinoide kann in vier wesentliche Abschnitte eingeteilt werden:

- 1.) Die Bildung des aktiven Isoprens,
- 2.) die Verknüpfung der Isopreneinheiten zum C₄₀-Körper Phytoen,
- 3.) Desaturierung des Phytoens zum Lycopin,
- 4.) die Zyklisierung und ggf. Hydroxylierung sowie weitere Modifikation des C₄₀-Körpers.

Die Synthese des Isoprens erfolgt für die Carotinoidbiosynthese über den Methyl-Erythritol-Phosphatweg (MEP-Weg) im Chloroplasten (Rodriguez-Concepcion 2010). Dort entsteht aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat in einem sieben Schritte enthaltenden Reaktionsweg über das Zwischenprodukt 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (MEP) das Produkt Isopentenylidiphosphat (IPP). Schlüsselenzym ist dabei das Enzym 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS), das den Fluss dieses Reaktionswegs limitiert (Estévez et al. 2001). Neben der Synthese des IPP über den MEP-Weg wurde auch die Bildung über den Mevalonatweg (MVA-Weg) beschrieben. Dabei entsteht aus drei Molekülen Acetyl-CoA über das Zwischenprodukt Mevalonsäure (MVA) das IPP. Dieser Syntheseweg findet sich in vielen Organismen und ist im Cytosol lokalisiert. Für Gefäßpflanzen diskutiert man, dass die Isoprene des MVA-Wegs für die Sterolsynthese in den Membranen des Endoplasmatischen Reticulums und die Synthesereaktionen in den Mitochondrien zur Verfügung stehen. Das im Plastiden gebildete IPP dient als Vorstufe für Carotinoide sowie z.B. für Monoterpene und Gibberelline (Rodriguez-Concepcion 2010). Allerdings wurde auch beschrieben, dass Interaktionen der beiden Wege und ihrer Produkte möglich sind (Skorupinska-Tudek et al. 2008). In Grünalgen und somit auch in *Chlamydomonas* wurden aufgrund biochemischer als auch genomischer Untersuchungen gezeigt, dass dort der cytosolische MVA-Weg nicht existiert (Schwender et al. 2001, Grossman et al. 2004).

Das aktive Isopren besteht aus den beiden Isomeren IPP und Dimethylallyl-diphosphat (DMAPP), die durch das Enzym Isopentenylidiphosphat-Isomerase (IPI) ineinander

umgewandelt werden. Von ihnen gehen 6 Moleküle IPP und 2 Moleküle DMAPP in die Kondensationsreaktion über Geranylgeranyldiphosphat zum Phytoen ein. Verantwortlich dafür sind die Enzyme Geranylgeranyl-Diphosphat-Synthase (GGPS) und Phytoensynthase (PSY) (Lohr 2009). Bei der Synthese der Carotinoide stellt die durch das Enzym PSY katalysierte Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Welsch et al. 2010).

Ab der Bildung von Phytoen werden die Moleküle als Carotinoide bezeichnet (Cunningham und Gantt 1998). Dies ist der erste C_{40} -Körper in diesem Biosyntheseweg, der allerdings nur drei konjugierte Doppelbindungen besitzt und folglich nur im UV-Bereich absorbiert. Durch die Desaturierung des Phytoens zum Lycopin durch die Enzyme Phytoen-Desaturase (PDS) und ζ -Carotin-Desaturase (ZDS) entsteht ein langes konjugiertes Doppelbindungssystem, das eine sichtbare Färbung hervorruft. Lycopin besitzt eine kräftig rote Farbe (Cunningham und Gantt 1998).

Das lineare Lycopinmolekül kann durch die beiden Enzyme Lycopin- β -Zyklase (LCYB) und Lycopin- ϵ -Zyklase (LCYE) an den Enden zu β - bzw. α -Carotin zyklisiert werden (Abb. I.2). Im Anschluss daran können mittels verschiedener Hydroxylasen Hydroxygruppen eingeführt werden oder Epoxidierungen durch Epoxidasen erfolgen (Cunningham und Gantt 1998).

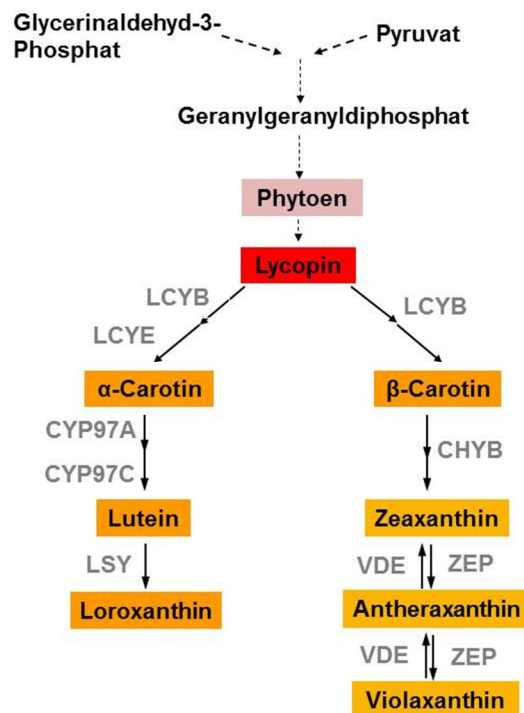


Abbildung I.2) Übersicht über die Carotinoidbiosynthese in *C. reinhardtii*. Die Farbe des jeweiligen Carotinoide ist durch den farbigen Hintergrund angedeutet (basierend auf Grossman et al. 2004 und Kim et al. 2009).

Enzyme: Lycopin- β -Zyklase (LCYB), Lycopin- ϵ -Zyklase (LCYE), β -Carotin-Hydroxylase (CHYB und CYP97), Violaxanthindeepoxidase (VDE), Zeaxanthinepoxidase (ZEP), Loroxanthinsynthase (LSY).

Die photosynthetisch aktiven Carotinoide werden bei allen Gefäßpflanzen und Grünalgen im Plastiden synthetisiert (Lohr 2009). Obwohl die verantwortlichen Enzyme alle kernkodiert sind und im Cytosol translatiert werden, sind sie erst im Plastiden aktiv. Um ihnen das Überqueren der Plastidenmembran zu ermöglichen, besitzen die Proteine eine Transitsequenz (Lohr et al. 2005). In den Plastiden werden sie zu aktiven Enzymen gefaltet. Einige Autoren spekulieren über einen Carotinoid synthetisierenden Multifunktionskomplex, der möglicherweise auch aus zwei Unterkomplexen gebildet wird: einem Komplex aus IPI, GGPS und PSY zur Synthese des Phytoens und einem weiteren Komplex aus PDS, ZDS und den LCY zur Synthese von α - und β -Carotin (Cunningham und Gantt 1998). Die Komplexe sind an die Thylakoidmembranen assoziiert. Dort werden die Produkte des einen Enzyms direkt als Substrat an das nächste Enzym weitergeleitet. Solche Komplexe minimieren vor allem die Diffusionswege sowie die Akkumulation von Zwischenprodukten. Dieses bekannte Phänomen wird auch als Substratchannelling bezeichnet (Candau et al. 1991).

2.1. Ketocarotinoidakkumulation bei Grünalgen und Pilzen

Als Ketocarotinoide werden Carotinoide bezeichnet, die eine Ketogruppe an mindestens einem Iononring besitzen. Sie werden meist unter Stressbedingungen bei Algen und verschiedenen Pilzen, aber auch bei Bakterien gebildet. Die algalen Ketocarotinoide sind nicht an der Photosynthese beteiligt (Czygan 1968) und ihr Vorkommen ist meist auf Dauerstadien beschränkt, die das Überleben während ungünstiger Umweltbedingungen sichern.

Die bekanntesten Ketocarotinoide stellen Astaxanthin (3,3'-Dihydroxy-4,4'-diketo- β -Carotin) und Canthaxanthin (4,4'-Diketo- β -Carotin) dar (Abb. I.3). Daneben finden man die Pigmente Echinenon (4-Keto- β -Carotin), 4-Ketolutein bzw. Fritschiellaxanthin (3,3'-Dihydroxy-4-keto- α -Carotin) und Adonirubin (3-Hydroxy-4,4'-diketo- β -Carotin) (Buchecker et al. 1978, Fraser et al. 1997, Boussiba 2000).

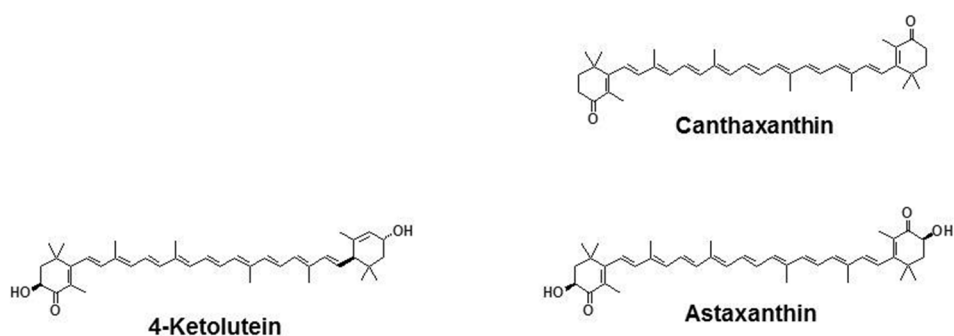


Abbildung I.3) Strukturformeln der wichtigsten algalen Ketocarotinoide: Canthaxanthin, Astaxanthin und 4-Ketolutein.

Auffällig ist, dass bei den verschiedenen ketocarotinoidakkumulierenden Organismen kein festes Muster der Ketocarotinoidzusammensetzung sowie der Menge der gebildeten Pigmente zu erkennen ist. So akkumuliert die zu den Chlorophyceae gehörende Alge *Haematococcus pluvialis* unter verschiedenen Stressbedingungen, wie z.B. Nährstoffmangel und Starklicht, bis zu 4% ihres Trockengewichtes an Ketocarotinoiden (Van den Hoek 1995, Boussiba 2000). Dabei stellt Astaxanthin mit einem Anteil von über 90 % das dominierende Ketocarotinoid dar und liegt meist in Form von Pigment-Fettsäure-Estern vor (Yuang und Chen 1998). Diese sind in cytosolischen Lipidtröpfchen in den Aplanosporen dieser Alge lokalisiert (Czygan 1968, Santos und Mesquita 1984). *H. pluvialis* ist der bekannteste ketocarotinoidakkumulierende Organismus und die rote Färbung verlieh dieser Alge auch den Namen „Blutregenalge“. *H. pluvialis* wird seit vielen Jahrzehnten untersucht und ist auch von großem ökonomischen Interesse (Boussiba 2000). Sie wird in großen Tanks angezogen, zur Ketocarotinoidsynthese initiiert, getrocknet und Fischfuttermittel zugesetzt oder in der Nahrungsmittelindustrie verwendet (Jin et al. 2006). In der Literatur wurden bis zu Beginn der 1990er Jahre zwei Arten beschrieben: *Haematococcus lacustris* (Girod) Rostafinski und *Haematococcus pluvialis* Flotow. Hagen und Mitarbeiter zeigten, dass es sich dabei um eine identische Art handelt, die ab diesem Zeitpunkt als *H. pluvialis* bezeichnet wurde (Hagen et al. 1993).

Auch die Grünalge *Muriella (Chlorella) zofingiensis* akkumuliert Ketocarotinoide unter wachstumslimitierenden Umweltbedingungen (Rise et al. 1994, Bar et al. 1995). In dieser Alge finden sich aber neben Astaxanthin auch größere Mengen an Canthaxanthin; letzteres stellt einen Anteil von etwa 25 % am Ketocarotinoidgehalt (Bar et al. 1995). Hier sind die Ketocarotinoide ebenfalls in Lipidtröpfchen im Cytosol lokalisiert. Die Schneevalgen *Chlamydomonas nivalis* und *Chloromonas nivalis* akkumulieren dagegen ausschließlich das Ketocarotinoid Astaxanthin und schirmen damit den im Zentrum der Zelle lokalisierten Chloroplasten vor einer hohen UV-Strahlung ab (Remias et al. 2005, 2010).

In der Grünalge *Fritschiella tuberosa* wurden neben Astaxanthin auch andere Ketocarotinoide detektiert, u.a. 4-Ketolutein, das auch als Fritschiellaxanthin bezeichnet wird (Weber 1975, Buchecker et al. 1978). 4-Ketolutein stellt ein Carotinoid des α -Carotinoid-Zweigs dar und wurde als natürlich vorkommendes Ketocarotinoid bisher nur in *F. tuberosa* nachgewiesen. *F. tuberosa* akkumuliert etwa 0,3 % ihres Trockengewichtes an Ketocarotinoiden, von denen Fritschiellaxanthin 10 % am Ketocarotinoidgehalt darstellt. Auch hier bildet Astaxanthin mit mehr als 50 % den Hauptanteil der Ketocarotinoide (Weber 1975). 4-Ketolutein wurde in diesen Untersuchungen nur als freies Pigment beschrieben. Untersuchungen mit neueren Analysemethoden (HPLC) zeigten aber, dass auch diese Alge 4-Ketoluteinacyl ester akkumuliert (Köhler 2008).

Die Ketocarotinoidsynthesefähigkeit ist nicht auf Grünalgen beschränkt. So finden sich auch Ketocarotinoide bei dem Hefepilz *Xanthophyllomyces dendrorhous* (früher: *Phaffia rhodozyma*). Dieser Pilz kann bis zu 0,1 % seines Trockengewichtes an Carotinoiden einlagern, von denen das Ketocarotinoid Astaxanthin mit einem Anteil von bis zu 90 % dominiert (Andrewes et al. 1976). Allerdings besitzt das Astaxanthin aus *X. dendrorhous* die Konfiguration 3R,3'R, im Gegensatz zu Astaxanthin aus *H. pluvialis*, das die 3S,3'S Konfiguration besitzt (Lemoine und Schoefs 2010).

2.2. Die Ketocarotinoidbiosynthese

Bei Grünalgen wie *H. pluvialis* und *M. zofingiensis* werden die Ketocarotinoide in cytosolischen Lipidtröpfchen lokalisiert (Grünewald et al. 2001, Bar et al. 1995). Dies unterscheidet sie von den meisten anderen Primär- und Sekundärcarotinoiden, die in den Chloroplasten bzw. Chromoplasten lokalisiert sind.

Die Einführung der Ketogruppen wird durch das Enzym β -Carotin-Ketolase (BKT) vermittelt (Lotan und Hirschberg 1995). Die Identifikation dieser BKT erfolgte mittels heterologer Expression in carotinogenen *E. coli*-Zellen. Parallel zeigten Versuche einer japanischen Arbeitsgruppe um Kajiwara und Kollegen, dass die BKT das ketolierende Enzym in *H. pluvialis* darstellt (Kajiwara et al. 1995). Auch postulierten sie, dass das ketolierte Produkt Canthaxanthin mittels eines weiteren Enzyms, einer Hydroxylase, in einem zweiten Schritt zu Astaxanthin hydroxyliert wird. Aufgrund nachfolgender heterologer Expressionsstudien wurde bezüglich des Reaktionswegs postuliert, dass zunächst eine Ketolierung des β -Carotin erfolgt und erst anschließend eine Hydroxylierung (Breitenbach et al. 1996, Fraser et al. 1997, 1998).

In *H. pluvialis* wurde die Existenz von drei Isoformen der BKT nachgewiesen, die zum Teil in unterschiedlichen Stämmen auftreten (Huang et al. 2006b). Diese drei Isoformen können von unterschiedlichen Umweltfaktoren reguliert werden. So wird z.B. die BKT 1 (erstmals erwähnt in: Lotan und Hirschberg 1995) deutlich stärker durch Starklicht aktiviert als die Enzyme BKT 2 und 3. Letztere beiden zeigten in den Untersuchungen aber eine höhere Basalexpression. Huang und Kollegen (Huang et al. 2006b) vermuteten, dass Regulation durch verschiedene Umweltfaktoren und zusätzlich die starke Erhöhung des Expressionslevels der Enzyme die Grundlage bilden, dass die Astaxanthinproduktion in vivo effektiv erfolgen kann.

Des Weiteren wurde das ketolierende Enzym aus *M. zofingiensis* untersucht (Huang et al. 2006a). Mittels heterologer Expressionsstudien, bei denen die BKT aus *M. zofingiensis* in carotinogenen Bakterien exprimiert wurde, konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym prinzipiell nicht nur β -Carotin, sondern auch die hydroxylierte Form Zeaxanthin ketolieren kann. Allerdings kann aufgrund dieser Daten nicht auf die native Enzymaktivität für die BKT

aus *M. zofingiensis* rückgeschlossen werden, so dass weiter unklar bleibt, ob in der Alge größere Mengen an Astaxanthin über die Ketolierung von Zeaxanthin gebildet werden oder ob dieser Syntheseweg in-vivo nur wenig aktiv ist.

Der Ort der Astaxanthinsynthese in *H. pluvialis* war lange Zeit unklar (Boussiba 2000). Dann konnte allerdings gezeigt werden, dass das Cytosol nicht nur der Speicherort, sondern auch der Bildungsort der Ketocarotinoide ist (Grünewald et al. 2001). Besonderes Interesse fand dabei die Beobachtung, dass die BKT sowohl im Chloroplasten als auch im Cytosol lokalisiert ist. Aktivität wurde allerdings nur im Cytosol nachgewiesen. Dort waren die Enzyme an den Rändern der cytosolischen Lipidtröpfchen lokalisiert (Grünewald et al. 2001). Möglicherweise inserieren sie dort aufgrund mehrerer vorhergesagten Transmembrandomänen (Lohr et al. 2005). Grünewald und Mitarbeiter (2001) vermuteten, dass die BKT spezielle Cofaktoren benötigt, die dem Enzym dort aufgrund der räumlichen Nähe zu Endoplasmatischem Reticulum (ER) und Golgi-Apparat zur Verfügung stehen. Zu dieser Hypothese passten die weiteren Ergebnisse dieser Autoren, die zeigten, dass β -Carotin aus dem Chloroplasten exportiert wird. Es dient somit als unmittelbares Substrat für die BKT. Dies demonstrierte, dass keine zur Synthese des β -Carotins benötigten Enzyme außerhalb des Chloroplasten benötigt werden. Allerdings ist ein hydroxylierendes Enzym für die Einführung der Hydroxygruppen am Canthaxanthin für die Synthese des Astaxanthins essentiell. Die Autoren vermuteten, dass diese Hydroxylase, zusammen mit dem Substrat und Fettsäuren aus dem Chloroplasten geschleust wird, indem oleosom-ähnliche Strukturen gebildet werden. Als mögliches Enzym wurde die Hydroxylase CHYB beschrieben (Linden 1999, Sun et al. 2010).

Die Bildung der Ketocarotinoide in Grünalgen erfolgt somit bis zur Synthese des β -Carotins identisch zur Synthese der anderen PS-Carotinoide. Erst der Export aus dem Plastiden ermöglicht die Bildung dieser neuen Pigmentgruppe.

2.3. Das Gen der BKT in dem Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gehört zur Klasse der Chlorophyceae und ist ein im Boden und Süßwasser lebender Organismus mit einer Zelllänge von ca. 10 µm. Sie besitzt einen becherförmigen Chloroplasten (Abb. I.4), der etwa die Hälfte des Zelllumens der vegetativen Zelle ausfüllt (Harris 2009).

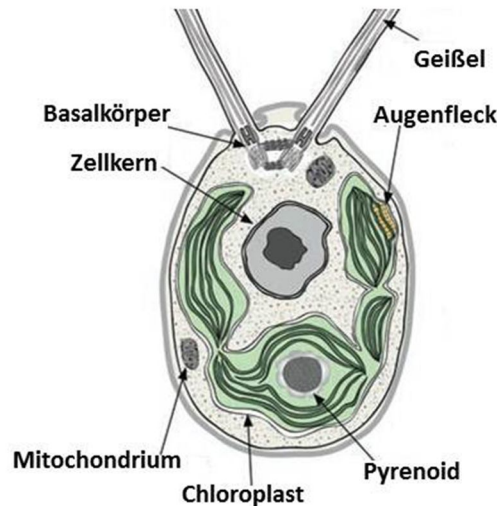


Abbildung I.4) Schematische Darstellung der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Quelle: Merchant et al. 2007, verändert).

C. reinhardtii entwickelte sich innerhalb der letzten 50 Jahre zu einem der wichtigsten Modellorganismen der botanischen Forschung. *C. reinhardtii* war auch die erste Grünalge, deren Genom vollständig sequenziert wurde (Merchant et al. 2007).

C. reinhardtii wird seit vielen Jahrzehnten als Forschungsobjekt vorwiegend in der Photosyntheseforschung verwendet. Während dieser Untersuchungen wurde der Pigmentgehalt dieses Organismus im Detail untersucht. Dabei wurden nicht nur vegetative Zellen sondern auch Gameten intensiv beforscht und lediglich die auch bei Gefäßpflanzen und anderen Grünalgen bekannten, an der Photosynthese beteiligten Carotinoide Lutein, β -Carotin, Violaxanthin, Antheraxanthin, Zeaxanthin und Neoxanthin sowie Loroaxanthin detektiert. Die Akkumulation an Sekundärcarotinoiden, wie z.B. Ketocarotinoiden konnte nicht beobachtet werden (Czygan 1968, Leòn et al. 2007), obwohl diese Alge nah mit dem ketocarotinoidakkumulierenden Organismus *H. pluvialis* verwandt ist. Interesse fand lediglich das Xanthophyll Loroaxanthin, ein Luteinderivat, das in einer Reihe von Grünalgen zu finden ist (Lohr 2009). Aufgrund seiner Präsenz in photosynthetisch aktiven Zellen im Lichtsammelkomplex (LHC2) und der sehr großen strukturellen Ähnlichkeit zu Lutein wird es aber der Gruppe der PS-Carotinoide zugeschrieben (Pineau et al. 2001).

Kürzlich zeigten allerdings Lohr und Mitarbeiter (2005), dass *C. reinhardtii* ein Gen besitzt, das den BKT-Genen aus *H. pluvialis* und *M. zofingiensis* homolog ist. Basis für die

genetischen Untersuchungen von *C. reinhardtii* waren EST-Sequenzen. Diese wurden von Sequenzierungen aus cDNA-Banken gewonnen, so dass nur alle aktiven bzw. transkribierten Gene untersucht wurden. Lohr und Kollegen (2005) spekulierten, dass die BKT in *C. reinhardtii* eine andere Funktion erlangt haben könnte. Alternativ bestand die Möglichkeit, dass die Ketocarotinoidakkumulation auf ein spezielles Zellstadium beschränkt ist, das bisher noch nicht untersucht wurde.

3. Die orangefarbenen Zygosporen von *C. reinhardtii* als potentiell ketocarotinoidakkumulierendes Zellstadium

Einen vielversprechenden Kandidaten für ein mögliches ketocarotinoidakkumulierendes Zellstadium stellten die Zygosporen von *C. reinhardtii* dar, da ausschließlich dieses Zellstadium eine intensiv orange-rote Färbung aufweist (Cavalier-Smith 1976).

C. reinhardtii vermehrt sich unter günstigen Umweltbedingungen vegetativ. Dabei zeichnen sich die haploiden vegetativen Zellen durch ein ovales Aussehen und den Besitz von zwei Flagellen aus. Diese Zellen können aber auch in ein immobiles Zellstadium übergehen, das Palmellastadium genannt wird. Meist formen sie dann kleine Kolonien aus 4 bis 8 Zellen (Harris 2009). Unter Nährstoffmangel wird eine Gametenbildung der vegetativen Zellen induziert. Gameten besitzen in jedem Fall Flagellen, über die die Kontaktaufnahme der beiden Paarungspartner stattfindet. Bei der Paarung agglutinieren zunächst mehrere Zellen der beiden Paarungstypen, woraus dann Paare mit entgegengesetzten Paarungstypen entstehen. Deren Flagellen umschlingen sich gegenseitig. Entscheidend sind dabei hydroxyprolinreiche Proteine an der Oberfläche der Flagellen, die den ersten Kontakt steuern. Diese Proteine werden von für jeden Paarungstyp spezifischen Genen in den Paarungstyploci der beiden Gameten codiert (Goodenough et al. 1995). Nach Interaktion dieser beiden Proteine kommt es zur eigentlichen Paarung der beiden Zellen. Dabei wird im „plus“-Gameten ein mit Actin gefüllter Microvillus ausgebildet, der als „Fertilization Tubule“ bezeichnet wird. Tritt dieser mit der Paarungsstruktur des „minus“-Gameten in Kontakt, so startet die Fusion der beiden Paarungspartner (Goodenough et al. 1995). Essentiell ist dabei die von den Gameten synthetisierte Substanz Autolysin, die eine Lyse der Zellwand bewirkt und folglich ein Verschmelzen der beiden Zellen. Dabei entstehen Zellen mit vier Flagellen. Im Anschluss erfolgt die Verschmelzung der beiden Zellkerne und danach die der beiden Chloroplasten (Harris 2009). Dabei wird die DNA des Chloroplasten des „minus“-Gameten abgebaut (Kubo et al. 2008).

Die diploide Zygote kann die Entwicklung zur Zygospore vollziehen (Abb. I.5). Letztere stellt das Dauerstadium dar. Unter günstigen Umweltbedingungen (zu denen u.a. Licht und

ausreichende Nährstoffversorgung gehören) kann die Zygospore durch meiotische Teilung wieder zu haploiden vegetativen Zellen auskeimen. Dabei werden vier (Tetrade) bis acht Tochterzellen gebildet (Harris 2009).

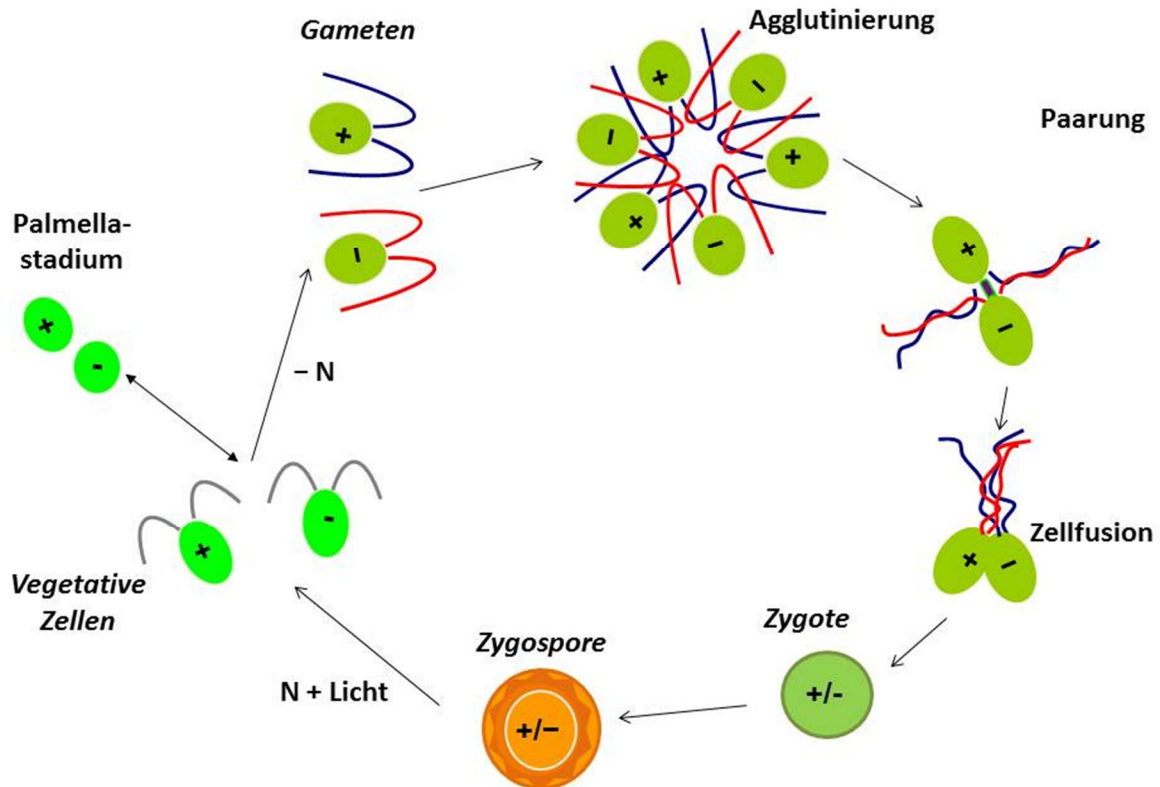


Abbildung I.5) Schematischer Überblick über den Zellzyklus von *C. reinhardtii* (Harris 2009, verändert)

Die Zygosporen der Grünalge *C. reinhardtii* stellen ein besonders widerstandsfähiges Zellstadium dar, das das Überleben der Alge unter ungünstigen Umweltbedingungen sichert (Harris 2009). Sie zeichnen sich vor allem durch eine besonders dicke sekundäre Zygotenzellwand aus. Zusätzlich enthalten sie große Mengen an Speicherstoffen wie Stärke. Des Weiteren detektierte man große Mengen an globulären Strukturen, von denen man vermutete, dass sie Lipidvorkommen darstellten. Die Farbe der Zygoten ändert sich im Zuge einer Alterung von anfangs intensiv grün zu einem kräftigen orange-rot (Cavalier-Smith 1976). Über die Identität der färbenden Substanzen in den Zygosporen finden sich in der Literatur keine Hinweise.

4. Zielsetzung dieser Forschungsarbeit

Nachdem das BKT-Gen in *C. reinhardtii* detektiert wurde, war dessen Bedeutung für den Organismus allerdings unklar. Denkbar war, dass das Gen weiterhin für ein ketocarotinoid-synthetisierendes Enzym codierte, das allerdings nur in einem bestimmten Zellstadium aktiv ist und dessen Pigmentzusammensetzung noch nicht untersucht wurde. Alternativ war eine veränderte Funktion des Proteins in diesem Organismus möglich (Lohr et al. 2005).

Da reife Zygosporen von *C. reinhardtii* in frühen Literaturwerken als orange-rot beschrieben worden waren (Cavalier-Smith 1976), versprachen diese Zellen ein interessantes Untersuchungsobjekt für die erste Theorie zu sein. Folglich sollten im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit Zygosporen von *C. reinhardtii* hergestellt und mittels geeigneter chromatographischer Methoden auf das Vorkommen von Ketocarotinoiden hin untersucht werden. Möglicherweise detektierte Ketocarotinoide sollten eindeutig identifiziert sowie quantifiziert und der zeitliche Verlauf ihrer Bildung untersucht werden. Weiterhin war von Interesse, inwieweit auch in Zygosporen von *C. reinhardtii* ein Zusammenhang zwischen der Bildung von Speicherlipiden und der Akkumulation von Ketocarotinoiden besteht.

II. MATERIAL UND METHODE

1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma Carl Roth bezogen.

2. Zellbiologische Arbeiten

2.1. Steriles Arbeiten

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden, soweit nötig, unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die Arbeiten mit sterilisierten Laborgeräten und Medien sowie unter einer Laminarflow Workstation (Microflow, Nunc) ausgeführt. Die Medien und Laborutensilien wurden, soweit möglich, im Autoklaven (Systec) für 20 min bei 1 bar dampfsterilisiert. Falls dies nicht möglich war, wurden die Materialien mit Ethanol oberflächensterilisiert oder die Medien mittels Sterilfilter (Maschenbreite 0,2 µm, Sartorius) filtriert.

2.2. Algenkulturen und Anzuchsbedingungen

Als algale Versuchsobjekte wurden im Rahmen dieser Arbeit die folgenden Arten verwendet:

Chlamydomonas reinhardtii

Chlamydomonas moewusii

Haematococcus pluvialis

Zu Vergleichszwecken wurden zusätzlich die folgenden Arten herangezogen:

Fritschiella tuberosa

Muriella (Chlorella) zofingiensis

Scenedesmus rubescens

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit am häufigsten verwendeten Stämme stellten die Wildtyp (WT) - Stämme *C. reinhardtii* cc620 und cc621 dar. Diese sind Subklone des Stammes 137c (anderer Name: cc124) und wurden im Labor von Ursula Goodenough, Washington University, St. Louis, USA isoliert. Sie wurden für ihre hohe Paarungsbereitschaft selektiert. Die Stämme werden nicht für genetische Analysen von Kreuzungsexperimenten empfohlen, da dabei letale Defekte entstehen können (Chlamydomonas Center, www.chlamy.org).

Organismus	Stamm	mt	Zusatz	Erhalten von
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	cc621	-	WT Mating effizient	Georg Kreimer
	cc620	+	WT Mating effizient	Georg Kreimer
	KS 6115			intern
	CLS 31-8	-	erste Matingstämme	Maria Mittag
	CLS 31-10	+	erste Matingstämme	Maria Mittag
	SAG 11-32 A			intern
	SAG 11-32 B			intern
	cc124			intern
	4 A	+	WT für Kris Stämme	Kris Niyogi
	4 A	-	WT für Kris Stämme	Kris Niyogi
	ASX1-1b	+	<i>lor1</i>	Kris Niyogi
	ASX2-11d	-	<i>lor1</i>	Kris Niyogi
	cc2420-C12	-	<i>lor1</i>	Judith Kohler
	cc2420-E3.6	+	<i>lor1</i>	Sonja Werner
	cc3873	(+)	<i>lor1</i> , nicht matable	CC
	cc2420	+	<i>lor1</i>	CC
	cc400	+	<i>cw15</i>	CC
	cc406	-	<i>cw15</i>	CC
	cc3491	-	<i>cw15</i>	CC
	cw15 325arg 7-		<i>cw15</i>	Michael Schroda
<i>Chlamydomonas moewusii</i>	SAG 1.98			SAG
	SAG 2.98			SAG
<i>Muriella zofingiensis</i>	SAG 211-14			SAG
<i>Fritschiella tuberosa</i>	SAG 112-80			SAG
<i>Scenedesmus rubescens</i>	SAG 5.95			SAG
<i>Haematococcus pluvialis</i>	SAG 192-80			SAG

Tabelle II-1) Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Algenstämme und die Bezugsquelle.

Die wildtypischen Algenstämme wurden meist sowohl auf Festmedium als auch in Flüssigmedium angezogen. Eine Ausnahme bildete die Alge *Chlamydomonas moewusii*, die ausschließlich auf Festmedium inkubiert wurde. Für die Anzucht auf Festmedium wurden die Algen mittels Impföse auf mit Agar verfestigtes Medium in Petrischalen übertragen. Die Standardanzucht in Flüssigmedium erfolgte in Schüttelkulturen (120 rpm) in 500 ml-Erlenmeyerkolben, die rund 200 ml Medium enthielten und mit einem luftdurchlässigen Filterstopfen verschlossen waren. Die Kulturen wurden bei $60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ im Klimaraum bei $18 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 Stunden für 5 Tage angezogen.

Die Mutantenstämme wurden je nach Zelldefekt bei 20-40 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf Agarmedium kultiviert und ggf. für die Experimente in Flüssigkulturen wie die WT-Stämme angezogen.

Die zellwandlosen Stämme wurden ausschließlich in Flüssigstandkulturen kultiviert; aufgrund der fehlenden Zellwand sind diese Zellen anfälliger für mechanischen Stress infolge einer Anzucht als Schüttelkultur.

2.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Neubauer-improved-Einmalzählkammern (peqlab). Dazu wurden die Flüssigkulturen mit einer 1%igen Lugol'schen-Lösung versetzt (10 μl Lugol'sche Lösung auf 1,5 ml Algenkultur), um die mobilen Zellen zu immobilisieren. Ggf. wurden die Zellen 1:2 verdünnt und 10 μl dieser Lösung in die Zählkammer gegeben. Die Auszählung erfolgte unter dem Mikroskop Axioplan (Zeiss) bei 200facher Vergrößerung.

2.4. Medien

C. reinhardtii wurde im Standardprotokoll in TAP-Medium kultiviert. Durch das im TAP-Medium enthaltene Acetat wuchsen die Algen mixotroph (Harris 2009). Dies ermöglichte eine schnellere Anzucht bei weniger intensiven Lichtverhältnissen. Dabei kamen Flüssigkulturen und Agarkulturen zum Einsatz. Für Agarkulturen wurde das TAP-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar (Otto Nordwald) versetzt. Viele Bakterien können das in TAP-Medium enthaltene Acetat verstoffwechseln (Schlegel 1992). Daher wurden Plattenkulturen zusätzlich 100 μmolar Ampicillin (Roth) zugegeben, um eine Kontamination mit Bakterien zu verhindern. Da dieses Antibiotikum als Wirkungsort die Mureinschicht der Bakterien besitzt, indem es über Peptido-Glycan-Crosslinking inhibitorisch auf die Biosynthese der Mureinschicht wirkt (Sambrook und Russell 2001), kann es unbedenklich den Algenkulturen zugesetzt werden (Harris 2009). Das Ampicillin hatte keinen Einfluss auf die Pigmentzusammensetzung der Zygosporien (siehe Anhang 3.3.2). Einige *C. reinhardtii*-Mutanten benötigten als Wachstumszusatz Arginin, da sie diese Aminosäure nicht mehr selbst synthetisieren konnten. Diesen Algen wurde steril filtrierte Arginin (Roth) mit einer Endkonzentration von 50 μmolar zugesetzt.

Für verschiedene Experimente wurden *C. reinhardtii* und *C. moewusii* auf Minimalmedium angezogen. Dieses bedingte ein rein autotrophes Wachstum. Eine Kultur auf Minimalmedium wurde auch durchgeführt, wenn ein *C. reinhardtii*-Stamm mit Bakterien verunreinigt war. Aufgrund des fehlenden Acetats wuchsen die Bakterien meist deutlich langsamer und konnten so von den Algenkulturen getrennt werden. Die Anzucht auf Minimalmedium erfolgte sowohl in Flüssig- als auch auf Festmedium, in dem es durch Zugabe von 1,5 % Agar

verfestigt wurde. Ebenso wie dem TAP-Medium wurde auch dem Minimalmedium, soweit erforderlich, Ampicillin zugesetzt.

Für die Paarung wurden die Medien TAP-N und Minimalmedium-N verwendet, die keine Stickstoffverbindungen enthielten.

Eine Übersicht über alle Medien und deren Herstellung findet sich im Anhang 2.1 und 2.2.

Für die Erhaltungskulturen von *C. moewusii* wurde mit Agar verfestigtes Basalmedium verwendet und die Kulturen bei $40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 Stunden bei 18°C gelagert.

Die Anzucht von *H. pluvialis* erfolgte in Desmidiaceenmedium (Schlösser 1994) als Standkultur bei $30 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 Stunden bei 18°C .

Alle anderen Algen wurden in TAP-Medium als Schüttelkulturen (120 rpm) oder Festmedium bei $40\text{-}60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 Stunden bei 18°C angezogen.

2.5. Zygotenherstellung

2.5.1. *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Paarung von *C. reinhardtii* und die folgende Zygosporientwicklung war zentraler Bestandteil dieser Forschungsarbeit. Das Protokoll wurde im Laufe der Arbeit mehrfach modifiziert. Im Folgenden ist die Variante dargestellt, die sich als effektivste Art der Gameteninduktion erwies. Im Anhang 2.3 ist das Laborprotokoll für die Paarungen dargestellt.

2.5.1.1. Gameteninduktion

Die Induktion der Gametenbildung erfolgte durch Übertragung der Zellen in stickstoffreies Medium. Dazu wurden ca. 4 Tage alte Flüssigkulturen in sterilen Zentrifugengefäßen abzentrifugiert ($1.500 \times g$, 4°C , 10 min) und in Nährmedium ohne Stickstoff, meist TAP-N, resuspendiert. Nach 16-24 Stunden Inkubation im Licht ($60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $18\text{-}22^\circ\text{C}$) war eine Gametenbildung erfolgt.

2.5.1.2. Paarung

Für die Paarung wurden die mobilen Gameten abzentrifugiert ($1.500 \times g$, 4°C , 10 min) und so resuspendiert, dass beide Stämme eine Zellzahl von 1×10^8 besaßen. Beide Stämme wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und für 2 Stunden im Licht ($60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bei 22°C inkubiert. Danach wurde die Paarungssuspension auf TAP-N (+Amp)-Agarplatten (3 %

Agar) ausplattiert. Dabei stellten sich Volumina von 1,2 ml bei einer Petrischale mit 140 mm Durchmesser, bzw. 0,8 ml bei einem Durchmesser von 92 mm als am besten geeignet heraus. Die Suspension wurde gleichmäßig über das Nährmedium verteilt und unter einem konstanten Luftstrom in der Sterilbank eingetrocknet.

Dann wurden die Platten für 24 Stunden im Licht ($60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend in Alufolie eingeschlagen, so dass kein Licht mehr an die Algen gelangen konnte.

Entscheidende Faktoren für einen Paarungserfolg:

Die folgenden Parameter erwiesen sich im Rahmen der eigenen Experimente als kritisch für eine erfolgreiche Gameteninduktion und anschließende Paarung. Diese Parameter wurden in keinem der verwendeten Protokolle explizit genannt und sind hier für zukünftige Experimente zusammengefasst. Zu den entscheidenden Faktoren zählten:

- *Das Animpfen der Startkultur mit Zellen aus einer Plattenkultur*
Eine hohe Mobilität der vegetativen Zellen war eine besonders gute Voraussetzung für eine Mobilität der Gameten. Es wurde beobachtet, dass Nachkommen vegetativer Zellen, die frisch von einer Kultur auf Festmedium in Flüssigmedium transferiert wurden, eine hohe Beweglichkeit zeigten. Daher wurden für alle Paarungsansätze die vegetativen Zellen nicht von Flüssigkultur, sondern frisch aus einer Agarkultur angeimpft. Die genaue Ursache hierfür ist unklar. Möglicherweise stimuliert der Wechsel der Medienart eine Ausbildung der Geißeln. Einige Paarungsprotokolle sehen sogar eine Gameteninduktion durch unmittelbare Überschichten einer Plattenkultur mit Flüssigmedium vor (Jiang und Stern 2009).
- *Die Erhöhung des Ansatzvolumens*
Zur Gewinnung großer Zygotenmengen wurde die Menge der eingesetzten Gameten erhöht. Dabei stellte sich eine Arbeitslösung von 1×10^8 Gameten pro ml Lösung als optimal heraus. Um die Gametenzahl zu erhöhen, wurde daher eine größere Menge der Gametenlösung angesetzt. Eine 1 Liter-Airliftkultur der Algen erwies sich als wenig praktikabel. Daher wurden durchschnittlich pro Stamm drei Ansätze mit je 200 ml Volumen in 500 ml-Erlenmeyerkolben angesetzt und nach der abschließenden Zentrifugation zur Aufkonzentrierung der Zellen zusammengeführt.
- *Ein zügiges Arbeiten mit pelletierten Algen*
Als kritischer Punkt erwies sich das Einengen der Algen mittels Zentrifugation. Obwohl die Zentrifugationsbedingungen sehr schonend gewählt wurden ($1200 \times g$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min), zeigte sich in einigen Fällen trotzdem eine geringe Paarungsbereitschaft der Zellen. Dies trat häufig auf, wenn die pelletierten Algen, denen das Medium weitgehend entzogen wurden, längere Zeit (ab etwa 10 min) nicht mit neuem Medium versorgt

wurden. Möglicherweise begannen dabei die Zellen auszutrocknen oder der Druck der Zellen aufeinander war durch die Pelletierung zu groß.

- *Die Anzucht der Gameten bei 20 °C*

Von Van Winkle-Swift (1977) wurde eine erfolgreiche Paarung nach Anzucht der Zellen bei Temperaturen deutlich über 20 °C berichtet. Daher wurde in einigen Versuchsansätzen die Anzuchtstemperatur auf 30 °C erhöht. Die Zellen wurden dazu in einem Wasserbad bei 60 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ angezogen. Die Paarung dieser Zellen war möglich, allerdings zeigte sich keine deutliche Mobilitätserhöhung oder gesteigerte Paarungseffizienz, so dass die Anzucht der Zellen standardmäßig bei 18-20 °C erfolgte.

- *Die Anzucht der Zellen im Tag-Nacht-Rhythmus*

Untersuchungen zeigten, dass Gameten, die vor der Paarung aus dem Dunklen ins Licht transferiert wurden, eine höhere Paarungsbereitschaft besaßen (Suzuki et al. 2002). In den vorliegenden Versuchen wurden die Gameten daher in einem Temperaturkonstantraum bei Lichtbedingungen von 16 h Licht / 8 h Dunkel bei 18 °C angezogen. Zwischenzeitlich hatte eine Anzucht im Dauerlicht stattgefunden; die aus diesen Zellen gebildeten Gameten zeigten aber weder gesteigerte Mobilität noch einen erhöhten Paarungserfolg. Wichtig war allerdings eine mindestens zweistündige Lichtinkubation der Gameten vor der Paarung.

2.5.1.3. Zygotenreifung durch Lagerung

Die Lagerung erfolgte beim Standardprotokoll bei 22 °C. Allerdings war es auch möglich, die Festkulturen bei 6 bzw. 9 °C im Kühlschrank oder bei 30 °C bzw. 37 °C im Wärmeschrank zu inkubieren. Bei der Lagerung im Wärmeschrank erfolgte allerdings eine starke Flüssigkeitskondensation an den Deckeln der Petrischalen.

2.5.1.4. Ernten: Trennung von Zygoten und ungepaarten Gameten

Zum Ernten der Zygosporen wurden die Platten mittels einer Pipette mit TAP-N-Medium gespült, wodurch die ungepaarten Gameten von der Platte entfernt werden konnten. Die resultierende grün-gelbliche Gametensuspension wurde verworfen oder für weitere Untersuchungen verwendet. Anschließend wurde die Platte mit TAP-N-Medium überschichtet und die auf der Agaroberfläche anhaftenden Zygoten mittel Zellschaber (Greiner Bio One) vom Agar geschabt. Die orangefarbene Zygotensuspension wurde gesammelt und anschließend von Agarresten befreit. Dazu wurden sie zunächst über einen Einmalfilter aus Baumwolle mit 400 μm Maschenbreite und anschließend über einen Baumwollfilter mit 120 μm Maschenbreite gegeben (Carl Roth). Dies führte zur Abtrennung der Zygosporen von Agarresten sowie großen Pelliculaaggregaten.

2.5.1.5. Besonderheiten bei der Paarung auf Minimalmedium

Für die Paarung der Gameten auf Minimalmedium wurden die Stämme cc620 und cc621 zunächst in TAP-Medium angezogen. Auch die Gameteninduktion erfolgte wie im Standardprotokoll in TAP-N-Medium für ca. 24 Stunden. Nach der Zentrifugation, die der Aufkonzentrierung der Gameten diente, wurden die Zellen in MIN-N-Medium resuspendiert und auf eine Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden gemäß Standardprotokoll für 2 Stunden im Licht gepaart und auf MIN-N+Amp-Agarplatten (3 % Agar) transferiert. Die weitere Kultur erfolgte gemäß Standardprotokoll.

Als Kontrolle wurden parallel induzierte Gametenkulturen in TAP-N-Medium aufkonzentriert und auf TAP-N-Agarplatten inkubiert. Diese Zellen zeigten eine erfolgreiche Gameteninduktion und dienten der Überprüfung, dass ausschließlich der Einfluss des Nährmediums auf die Zygotenentwicklung untersucht wurde.

2.5.1.6. Untersuchung der Zygosporereifung

Für die Untersuchung der Zygosporereifung wurden Zeitreihen-Experimente durchgeführt. Dazu wurde wie oben beschrieben die Paarung der Zygosporen initiiert, allerdings erfolgte die Paarung in einem großen Ansatz, so dass die Paarungssuspension für alle Plattenkulturen identisch war. Die Zygoten wurden für 2 Stunden bei 22 °C im Licht inkubiert ($60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und dann auf kleine Petrischalen mit TAP-N+Amp-Medium (Langzeituntersuchung) oder große Petrischalen (Kurzzeituntersuchung) verteilt. Die Kulturen wurden für 24 Stunden im Licht ($60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bei 22 °C belassen und anschließend bei 22 °C dunkel gestellt.

Weitere Details zur Kurzzeituntersuchung:

Dabei wurden zu den folgenden Zeitpunkten der Dunkelinkubation Proben genommen: 0 Tage (entsprach 24 Stunden Inkubation im Licht, keine Dunkelphase), 2 Tage, 4 Tage, 6 Tage, 8 Tage, 10 Tage und 12 Tage Dunkelphase.

Zu jedem Messzeitpunkt wurde eine Petrischale wie unter Kapitel II.2.5.1.4 beschrieben, geerntet und nach einer jeweils doppelten Zellzahlbestimmung eine kleine Menge auf einen Glasfaserfilter (GF6; Whatman) gezogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die restliche Zellsuspension wurde auf Eis im Kühlraum gelagert; am 6. und am 12. Tag der Zeitreihe wurde von den auf Eis gelagerten Proben die gleiche Menge Zellen wie am Erntetag auf einen GF6-Filter übertragen und ebenfalls bei -20 °C gelagert. Die verbliebenen Zygotenlösungen wurden eingeengt und für die TEM-Untersuchungen (Kap. II.2.6.3) verwendet. Ein kleiner Rest der Zellsuspensionen verblieb für mehrere Wochen auf Eis.

Weitere Details zur Langzeituntersuchung:

Dabei wurden zu den folgenden Zeitpunkten der Dunkelinkubation Proben genommen: 0 Tage (entsprach 24 Stunden Inkubation im Licht, keine Dunkelphase), 5 Tage, 12 Tage, 17 Tage, 24 Tage und 33 Tage Dunkelphase.

Zu jedem Messzeitpunkt wurden drei Petrischalen wie unter Kapitel II.2.5.1.4 beschrieben geerntet und nach einer jeweils doppelten Zellzahlbestimmung auf GF6-Filter (Whatman) gezogen. Anschließend wurden die Filter bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.1.7. Versuche mit dem Carotinoidbiosynthese-Inhibitor Norflurazon

Um die Bedeutung der Neusynthese von Carotinoiden zu untersuchen, wurden die Zygosporien mit dem Inhibitor Norflurazon behandelt. Norflurazon inhibiert die Phytoendesaturase nicht-kompetitiv, so dass kein Lycopin mehr gebildet werden kann (Sandmann et al. 1989).

Norflurazon (Sigma) wurde als 10 mM ethanolische Stammlösung angesetzt und steril filtriert. Um die Konzentration auf den Agarkulturen einzustellen, wurde steriles Ethanol (Lösungsmittel des Norflurazons) auf TAP-N-Platten vorgelegt, die entsprechende Menge ethanolische Norflurazonstammlösung hinzugegeben und die Lösung mit dem Drygalski-spatel ausplattiert. Dabei betrug die maximale Menge an Ethanol auf der kleinen Petrischale (92 mm) 50 µl. Dies führte zu einer maximalen Konzentration von 35 mM Ethanol auf der Plattenkultur.

Als Inhibitorkonzentrationen wurden 5 µM, 10 µM und 25 µM Norflurazon eingesetzt. Als Kontrolle wurden TAP-N-Platten mit 50 µl Ethanol bestrichen. Dies stellte die maximale Ethanolkonzentration auf der Platte in den Inhibitoransätzen dar und sollte den Effekt des Lösungsmittels aufzeigen.

2.5.1.8. Besonderheiten bei der Paarung von *lor1*-Mutanten

Für mehrere Experimente wurden die verschiedenen *lor1*-Mutanten mit WT-Stämmen oder untereinander gekreuzt. Es stellte sich heraus, dass beim Einsatz von *lor1*-Mutanten in Kreuzungsversuchen einige Parameter im Vergleich zum Standardpaarungsprotokoll des WT abgeändert werden mussten.

Zum einen wuchsen die *lor1*-Mutanten meist langsamer, so dass die Zellen teilweise bis zu sieben Tage alt waren, bevor eine Gameteninduktion erfolgte. Des Weiteren wurde die Paarungszeit aufgrund der weniger mobilen Zellen auf 4 Stunden erhöht. Teilweise wurde eine Paarung über Nacht durchgeführt und mit der Pellicula gearbeitet.

In einzelnen Fällen, u.a. bei der Paarung der Stämme ASX 1-1b mt+ und ASX 11-2d mt- wurde die Pellicula erst nach drei Tagen abgenommen, auf TAP-N-Platten übertragen,

weitere drei Tage im Licht inkubiert ($60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $22 \text{ }^\circ\text{C}$) und dann erst dunkel gestellt. Die Lagerung erfolgte sowohl bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ als auch bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.5.1.9. Gametenuntersuchungen

Die ungepaarten Gameten wurden auch bezüglich Ihres Pigmentspektrums und ihrer Morphologie untersucht. Soweit nicht anders beschrieben, wurden dazu die 24 Stunden lang induzierten Gameten abzentrifugiert, eingeengt und Proben vor der Paarung abgenommen. Diese ungepaarten Gametenproben wurden dann auf TAP-N-Platten in vergleichbarer Menge wie die Zygosporen ausgebracht. Sie wurden analog zu den Zygoten 24 Stunden im Licht belassen und anschließend bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ dunkel gestellt.

Um die Gameten zu ernten, wurden sie nach unterschiedlicher Lagerdauer mit TAP-N-Medium von der Platte gespült und gesammelt. Im Anschluss konnten sie für die Pigmentuntersuchungen auf GF6-Filter gezogen oder für mikroskopische Untersuchungen durch eine weitere Zentrifugation (max. $2.000 \times g$) eingeengt werden.

2.5.1.10. Bestimmung der Paarungseffizienzen

Die Paarungseffizienz der Stämme cc620 und cc621 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmt, um eine Aussage über die Effektivität der Paarung zu erhalten. Dazu wurde die theoretisch zu erwartende Zygotenmenge berechnet, indem die eingesetzte Gametenmenge der Hälfte der zu erwartenden Zygotenmenge entsprach, da jeweils ein Gamet des Paarungstyp „plus“ mit einem Gameten des Paarungstyp „minus“ verschmelzen konnte. Auf diese Weise wurde eine durchschnittliche Paarungseffizienz von etwa 26 % ermittelt. Dies bedeutet, dass rund ein Viertel der theoretisch zu erwartenden Zygoten entstanden und rückgewonnen wurden.

Diese Effizienz ist deutlich höher als bei der Paarung der Stämme CLS 31-10 und CLS 31-8, die rund 8 % betrug (Schmidt 2007). Allerdings scheint sie immer noch gering. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Effizienz deutlich höher war, aber aufgrund verschiedener Gründe unterschätzt wurde.

Zum einen wurde die Anzahl der in die Paarung eingesetzten Gameten anhand der Zellzahlbestimmung vor der Einengung der induzierten Gameten durch Zentrifugation berechnet. Die pelletierten Zellen wurden anschließend sofort im vorher berechneten Lösungsvolumen resuspendiert. Der Grund dafür lag in der Tatsache, dass, wie unter II.2.5.1.2 erwähnt, die Arbeiten mit pelletierten Arbeiten so kurz wie möglich gehalten werden mussten. Da Zellverluste infolge der Pelletierung und des Dekantierens des Überstandes unvermeidbar waren, wurde die Konzentration der eingesetzten Gameten leicht überschätzt.

Des Weiteren wurde die Zygotenernte auf ein möglichst einheitliches Zygotenmaterial hin optimiert. Wichtig war eine möglichst exakte Zellzahlbestimmung für die Auswertung der Pigmentdaten. Große Zygotenaggregate, die trotz kurzer Paarungszeit teilweise auftraten, hätten diese Zellzahlbestimmung deutlich verfälscht, da sie zum einen mehrlagig waren, zum anderen unregelmäßig verteilt in der Suspension vorlagen. Um diesen Fehler auszuschließen, wurden diese Aggregate wie unter Kapitel II.2.5.1.4 beschrieben durch eine zweistufige Filtration entfernt. Gewonnen wurde eine weitgehend agarfreie Lösung, die fast ausschließlich vereinzelte Zygoten enthielt. Die Agarreste und Zygotenaggregate wurden verworfen, was bei der anschließenden Zellzählung zu einer Unterbestimmung der Zahl an gebildeten Zygoten führte.

2.5.1.11. Tetradenanalyse mit Zygoten von *C. reinhardtii*

Die Tetradenanalyse ist eine Methode zur Vereinzelung der Nachkommen aus einer Paarung von *C. reinhardtii*. Dabei keimt die diploide Zygote nach einer Meiose in vier haploide Tochterzellen aus, bevor die Zygotenzellwand aufricht und die Nachkommen entlässt. Mit Hilfe von Glaskapillaren oder sehr feinen Wolframdrähten können diese Zellen voneinander getrennt und vereinzelt werden. Jede Tochterzelle kann somit zu einer reinerbigen Kolonie heranwachsen. Die vier Nachkommen können anschließend untersucht und ggf. als neue Stämme in Kultur genommen werden.

Die Tetradenanalyse wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um eine neue *lor1*-Mutante zu gewinnen. Zusätzlich diente sie als Nachweis für eine erfolgreiche Zygotenbildung beim Wildtyp. Besondere Bedeutung hat sie in der *C. reinhardtii*-Forschung, da mit ihr auch Crossing-over-Ereignisse und Chromatideninterferenzen bestimmt werden können. Mit Hilfe dieser Informationen wurden u.a. erste Genkarten von *Chlamydomonas* erstellt (Harris 2009).

Eine schematische Darstellung der Tetradenanalyse ist in Abb. II.1 zu sehen, das Laborprotokoll befindet sich in Anhang 2.5, ebenso wie Abbildungen der verwendeten Präparierwerkzeuge. Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank mit einem Auflichtmikroskop (Olympus) bei 200facher Vergrößerung durchgeführt.

Zwischen fünf und 14 Tage alte Zygosporen wurden von ungepaarten Gameten befreit, in dem die Gameten mit dem Zellschaber beiseitegeschoben wurden. Mit Hilfe eines Wolframdrates (Chempur), der in einer Impföse eingespannt und zu einem Bogen geformt war, wurden die Zygosporen vom Agar gelöst und an einer Stelle gesammelt. Diese wurde mit einem Skalpell pyramidenförmig ausgeschnitten und der Agarblock auf eine TAP-Platte (inkl. Stickstoffquelle, 2 % Agar, frisch gegossen) transferiert. Auf dieser Platte war auf die Unterseite mit dem Skalpell ein Gitter geritzt worden. Die Zygoten wurden von dem Agarblock entfernt, in dem dieser über den Agar der neuen Petrischale gezogen wurde. Die

Zygoten wurden dann auf die erste Linie des Gitters (Startlinie) transferiert. Bei Bedarf konnte diese Platte für 30 s über Chloroform gehalten werden. Dies tötete Gameten ab, die u.U. mit übertragen wurden. Bei Mutantenzellen wurde darauf häufig verzichtet, da bei diesen ein Zellwanddefekt vermutet wurde, der möglicherweise eine fehlende Resistenz der Zygoten gegenüber Chloroformdämpfen zur Folge hatte.

Die Agarplatte wurde für 24 Stunden, bei Mutanten-Zygoten für 36-48 Stunden, ins Dauerlicht ($60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gestellt. Nach dieser Zeit waren einige Zygoten zu einer Tetrade ausgekeimt. Diese Tetrade wurde mit dem Wolframdraht entlang einer senkrechten Linie gezogen. Auf jedem Kreuzungspunkt mit einer horizontalen Linie wurde eine der vier Zellen positioniert. Die Platte wurde für ca. 4 Tage unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Danach waren an den Kreuzungspunkten Kolonien herangewachsen. Alle Kolonien entlang einer senkrechten Linie stellten die Nachkommen einer Zygote dar.

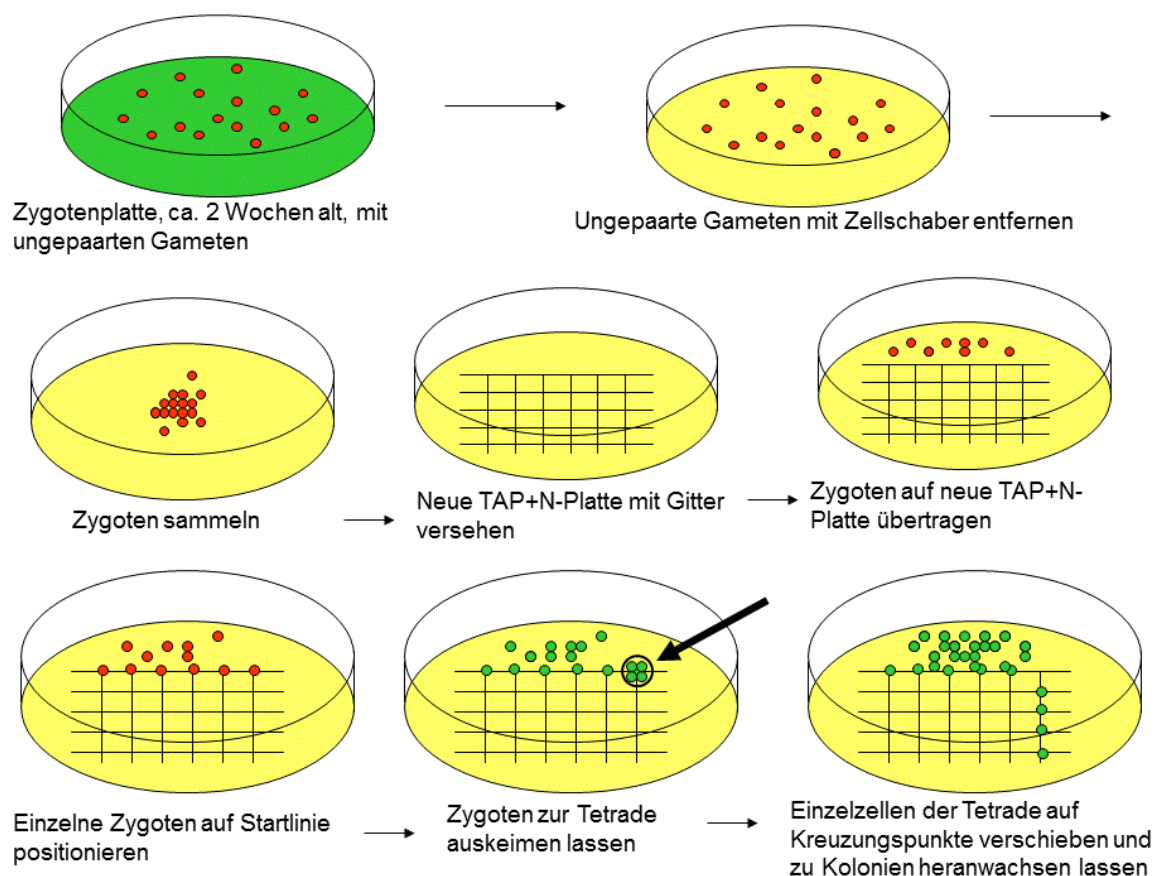


Abbildung II.1) Schematische Darstellung einer Tetradenanalyse.

Die Tetradenanalyse wurde erfolgreich für die Analyse der WT-Zygoten durchgeführt, zwei Beispiele sind in Abb. II.2 gezeigt.

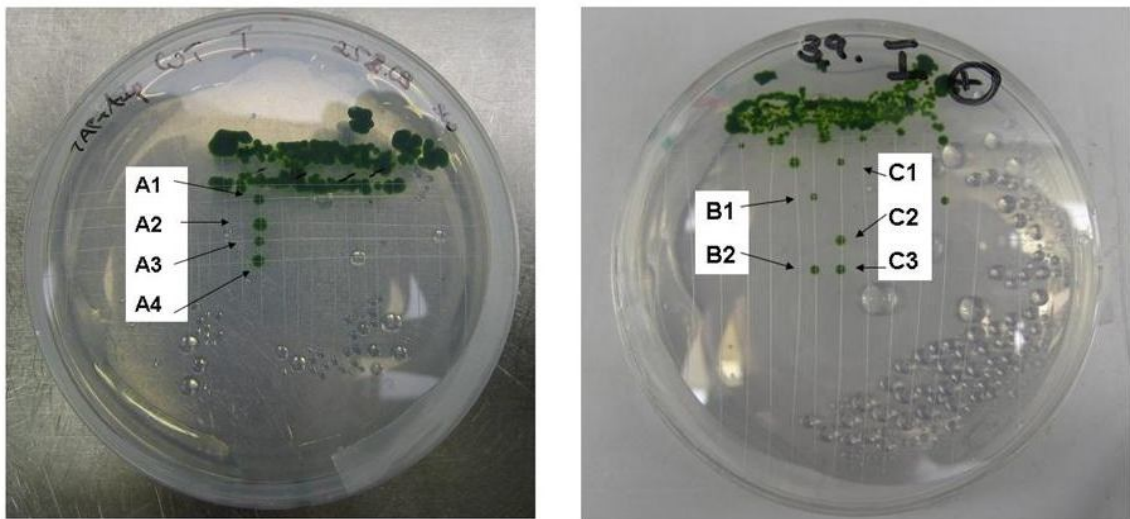


Abbildung II.2) Tetradenanalyse von WT-Zygoten (cc620 x cc621).

Die einzelnen Klone wurden herangezogen und ihr Matingtype anhand der unter Kapitel II.6.4.2 beschriebenen Methode bestimmt.

2.5.2. *Chlamydomonas moewusii*

Neben *C. reinhardtii* wurde die ebenfalls zur Familie der *Chlamydomonaceae* gehörende Alge *C. moewusii* auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Ketocarotinoide zu akkumulieren. Dazu wurde die Alge ebenfalls gepaart und die resultierenden Zygoten untersucht. *C. moewusii* ist im Gegensatz zu *C. reinhardtii* nicht in der Lage heterotroph zu wachsen, sie ist obligat autotroph (Lewin 1950). Im Anhang 2.4 ist das Laborprotokoll für die Paarungen von *C. moewusii* dargestellt.

2.5.2.1. Paarung

Die Zellen wurden auf Agarmedium angezogen und waren mindestens 6 Wochen alt. Zur Gameteninduktion wurden die Agarkulturen mit destilliertem Wasser überschichtet und für 3 Stunden bei $60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Danach waren mobile Gameten zu beobachten. Anschließend wurden die Gametensuspensionen der beiden Kreuzungstypen in einer sterilen Petrischale vereint und für 1 Stunde unter gleichen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss wurden die Zygoten auf Minimalmedium (z.T. ohne Stickstoffquelle) übertragen, die Suspension im Luftstrom der Sterilbank eingetrocknet und für 36-48 Stunden im Licht inkubiert ($60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $22 \text{ }^\circ\text{C}$). Danach konnten die Zygosporen unter verschiedenen Bedingungen gelagert werden.

2.5.2.2. Zygotenreifung durch Lagerung

Das Standardprotokoll sah eine Lagerung im Dunkeln auf MIN-Platten bei 22 °C vor. Allerdings wurden auch Experimente zur Lagerung im Licht und/oder auf MIN-N-Agarmedium durchgeführt. Alle Zygotenansätze von *C. moewusii* wurden bei 22 °C gelagert. Es wurden keine Experimente zum Einfluss der Temperatur durchgeführt.

2.5.2.3. Ernten: Trennung von Zygoten und ungepaarten Gameten

Aufgrund mikroskopischer Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass die Zygoten von *C. moewusii* ebenfalls im Agar eingesunken waren. Daher wurden die ungepaarten Gameten analog zu *C. reinhardtii* mit Flüssigmedium von den Platten gespült. Hier wurde allerdings MIN- oder MIN-N-Medium, je nach Versuchsaufbau, verwendet. Anschließend wurden die Zygoten mit dem Zellschaber vom Agar getrennt, in Medium resuspendiert und gesammelt. Für die weiteren Analysen wurden die Proben mittels Zentrifugation (max. 2.000 x g) eingeeengt oder auf GF6-Filter gezogen.

2.6. Mikroskopische Untersuchungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen verschiedene mikroskopische Verfahren zum Einsatz. Zum einen wurden verschiedene Lichtmikroskope verwendet, um die Algen zu untersuchen. Mit Hilfe der Differentialinterferenzkontrast(DIK)-Mikroskopie konnte die Oberfläche der Zellen plastisch abgebildet werden, so dass erste Aussagen zur Morphologie der Algen getroffen werden konnten. Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zeigten den strukturellen Aufbau der Zellen im Detail.

2.6.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die meisten lichtmikroskopischen Arbeiten wurden mit dem Durchlichtmikroskop Axioplan (Zeiss) durchgeführt. Dieses bot eine maximale Vergrößerung des Faktors 630 und ermöglichte so gute Untersuchungen zur Zahl, Größe und Mobilität der Algenzellen. Mit Hilfe einer angeschlossenen Digitalkamera (Ixus, Canon) konnten die Beobachtungen digitalisiert werden.

Für Untersuchungen unter der Sterilbank wurde ein Auflichtmikroskop (Olympus) verwendet. Dieses bot einen maximalen Vergrößerungsfaktor von 200 und einen großen Objektisch, der die sterilen Arbeiten mit Kulturen in Petrischalen erleichterte.

Die Fluoreszenzaufnahmen der Zygosporen wurden am Fluoreszenzmikroskop Axioplan (Zeiss) durch Georg Schmidt im Rahmen seiner Staatsexamensarbeit durchgeführt.

Die mikroskopische Untersuchung ermöglichte nicht nur eine Beobachtung von Zellzahl, Zellgröße und Zellmobilität, sondern auch eine Unterscheidung von Zygosporen und ungepaarten Gameten auf den Agarplatten. Zygosporen sanken als rundliche Zellen in den

Agar ein, während ungepaarte Gameten als ungleichmäßig geformte Zellen auf dem Agar auflagen. Neben der unterschiedlichen Morphologie konnte aufgrund der verschiedenen Fokussierungsebenen der beiden Zellgruppen eine einfache Unterscheidung unter dem Mikroskop erfolgen.

2.6.1.1. Lipidanfärbung mittels Sudanschwarz B

Um Lipidstrukturen in zellulären Strukturen lichtmikroskopisch zu dokumentieren, wurden Färbungen des algalen Zellmaterials mittels Sudanschwarz B (Sudan Black B, SBB, Merck) durch V. Schmitt parallel zu den TEM-Untersuchungen durchgeführt. Lipophile Substanzen färben sich dabei schwarz, während die Zellwände und Stärkekörner ungefärbt bleiben. Dazu wurden die Zellen für eine Stunde bei 60 °C in einer Lösung von 0,3 % SBB in 70 %igem Ethanol inkubiert, dann das Präparat zunächst in 70 %igem Ethanol und anschließend in dH₂O gespült. Danach erfolgte eine Dokumentation der gefärbten zellulären Strukturen unter dem Lichtmikroskop Axioplan (Zeiss) bei 400facher Vergrößerung.

2.6.2. Untersuchungen mit dem Differentialinterferenzkontrast-Mikroskop

Die Differentialinterferenzkontrast- oder DIK-Mikroskopie stellt ein spezielles Verfahren der Lichtmikroskopie dar. Sie ermöglicht eine plastische Darstellung des Objektes, da Unterschiede in der optischen Weglänge in Helligkeitsunterschiede der Bilder umgewandelt werden (Inoué 1986).

Die Arbeiten wurden mit freundlicher Unterstützung der AG Wernicke, Universität Mainz durchgeführt. Verwendet wurde ein Axioplan-Mikroskop mit DIK-Ausstattung (Zeiss) und ein Videokamerasystem CF 8/1 DX (Kappa).

2.6.3. Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Mit Hilfe der Transmissionen-Elektronen-Mikroskopie (TEM) können Proben mit einer sehr hohen Auflösung detailliert untersucht werden. Bei diesem Verfahren werden die Proben mit Hilfe von Elektronenstrahlen abgebildet, nachdem eine Fixierung der biologischen Objekte vorausgegangen ist. Verwendet wurden dafür Glutaraldehyd zur Vernetzung der Probe und Osmiumtetroxid zur Fixierung und Färbung.

Alle in der vorliegenden Arbeit dargestellten TEM-Untersuchungen wurden von Volker Schmitt, Universität Mainz durchgeführt, der auch die Probenaufarbeitung und Fixierung übernahm.

2.6.3.1. Probenvorbereitung

Die Zellen wurden pelletiert und mit Hilfe einer bei Niedrigtemperaturen gelierenden Agarose (Roth) eingebettet. Dabei wurde eine Konzentration von 2,5 % Agarose in TAP-N-Medium

verwendet. Die resultierenden Agarblöcke wurden in kleine Stücke geschnitten und in 2 % Glutaraldehyd (in TAP-N) über Nacht bei 4 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen in 5 mM Sörensen's Phosphat Puffer (3 x 30 min) wurden die Proben in 1 % Osmiumtetroxid (in Phosphatpuffer) über Nacht bei 4 °C nachfixiert.

Anschließend wurden sie in Sörensens Phosphatpuffer dreimal für je 30 min gewaschen und dann in verschiedenen Waschschrritten mit 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 % und 3 x 100 % Ethanol für jeweils 15 min dehydratisiert. Die Agarblöcke wurden in 2:1-, 1:1- und 1:2-Mischungen von Ethanol: Spurr's Medium bei 4 °C über Nacht eingelegt. In den folgenden beiden Tagen wurden die Agarblöcke viermal in frisches Spurr's Medium übertragen. Danach wurden die Blöcke in flachen Formen in frisches Medium eingebettet und bei 65 °C über Nacht ausgehärtet. Ultradünnschnitte von 60 nm Dicke wurden mit einem Ultracut E Ultramicrotom (Reichert-Jung / Leica) geschnitten, das mit einem Diamantmesser ausgestattet war (Diatome) und auf Formvar-beschichteten Kupfernetzchen (75 Maschen) gesammelt. Die Schnitte wurden sukzessive mit Uranylacetat (2 %ige ethanolische Lösung) für 10 min kontrastiert. Nach einer dreimaligen zweiminütigen Färbung wurden die Proben gewaschen, luftgetrocknet und standen für die TEM-Untersuchungen zur Verfügung. Die Rezepturen der Puffer befinden sich im Anhang 2.6.

2.6.3.2. Untersuchung mittels TEM

Die Dünnschnitte wurden an einem FEI Tecnai 12 BioTwin Transmissionselektronenmikroskop (FEI Europe, Eindhoven, Niederlande) untersucht und mit Hilfe einer SCCD SIS MegaView III Kamera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster) dokumentiert.

3. Chromatographische Verfahren

3.1. HPLC

Die High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) wurde zur Auftrennung und Untersuchung der algalen und bakteriellen Pigmente verwendet.

Diese Untersuchungen wurden mit einem Waters Alliance 2795 Separation Module durchgeführt, an das ein Waters 2996 Photodioden-Array Detektor angeschlossen war. Die Daten wurden mit dem Programm Waters Empower aufgezeichnet und analysiert.

Als Verfahren wurde die Umkehrphasen-HPLC (reverse phase: RP-HPLC) verwendet, bei der die Proben auf eine mit langkettigen Kohlenwasserstoffen beschichtete Silikamatrix als stationäre Phase anlagern. Unpolare Pigmente werden länger retardiert als polare Pigmente. Zusätzlich wurde eine Gradientenelution durchgeführt, so dass sich die Eigenschaften der mobilen Phase im Laufe einer Messung von polar nach unpolar verschoben. Folglich eluierten zunächst polare Pigment von der Säule und mit sinkender Polarität des Eluenten die unpolaren Pigmente.

Mit Hilfe des Photodioden-Array-Detektors wurden während der Messung durchgehend *on line*-Spektren aufgezeichnet, so dass eine Analyse der Absorptionseigenschaften der aufgetrennten Pigmente möglich war.

3.1.1. Säulen

Für die Standarduntersuchungen wurde die Säule Chromolith® Performance RP-18e 100-4.6 mm (Merck) verwendet. Dieser war eine Chromolith® RP-18e 10-4.6 mm Vorsäule (Merck) vorgeschaltet, um Schädigungen der Hauptsäule infolge von Verunreinigungen zu minimieren. Die Säule besaß eine C₁₈-Matrix und erwies sich als besonders zuverlässig bei der Auftrennung von Ketocarotinoiden.

3.1.2. Gradienten und Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Programme verwendet. Beim Standardprotokoll wurde das Programm AstaScanChrom 6B (Gradient 1) verwendet. Bei Bedarf, wie z.B. für die Detektion des Phytoens in den Norflurazonexperimenten, konnte auch eine Absorption der *on line*-Spektren im UV-Bereich erfolgen. Bei Phytoen liegt das Absorptionsmaximum bei 287 nm. Dann wurde das im Eluentenprofil identische Programm AstaScanChrom 6B_UV (Gradient 1B) verwendet. Für die detaillierte Untersuchung der Diacylsterfraktion kam das Programm AstaScanChrom 12 (Gradient 2) zum Einsatz. In den ersten Versuchen wurde noch das Programm AstaScanChrom 4 (Gradient 3) verwendet, das später zum Programm AstaScanChrom 6B optimiert wurde.

Während jedes Laufes wurden *on line*-Spektren zwischen 350 und 700 nm, bzw. bei UV-Programmen zwischen 270 und 700 nm mit einer Auflösung von 1,2 nm und einer Sampling Rate von 2 pro Sekunde aufgezeichnet. Eine Auflistung der Eluenten und der Programm-details finden sich im Anhang 2.14.

3.1.3. Quantifizierung der Pigmentmengen

Die Quantifizierung der Pigmentmengen erfolgte gemäß Lohr (2000). Dabei wurde für die Pigmente Astaxanthin, Canthaxanthin, β -Carotin und Lutein eine absolute Kalibrierung vorgenommen. Für alle anderen Pigmente wurde der Extinktionskoeffizient aus der Literatur (Britton 2004) übernommen und für die Quantifizierung verwendet. Dabei wurde der Extinktionskoeffizient für das Lösungsmittel ausgewählt, bei dem das Absorptionsspektrum die größtmögliche Übereinstimmung mit dem *on line*-Spektrum der HPLC zeigte.

Jedes Pigment wurde in der Nähe seines Absorptionsmaximums quantifiziert. Daher wurden die HPLC-Chromatogramme bei zwei verschiedenen Wellenlängen integriert: 440 nm für die Chlorophylle, Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin, alle anderen Carotinoide wurden bei 480 nm quantifiziert. Eine Übersicht über die quantifizierten Pigmente und die dabei verwendeten Extinktionskoeffizienten finden sich im Anhang 2.15.

Die Kalibrierung von Astaxanthin, Canthaxanthin, Lutein und β -Carotin erfolgte mit Hilfe von Referenzpigmenten (Sigma). Diese wurden jeweils in 5 Ansätzen in definierten Konzentrationen im Photometer gemessen und anschließend mittels HPLC aufgetrennt. Die Menge des in die HPLC-Anlage injizierten Pigments konnte mit Hilfe der Photometerdaten berechnet und zum resultierenden Flächensignal des Detektors in Verbindung gesetzt werden. Der so erhaltene Faktor zur Umrechnung des Flächenintegrals in die Pigmentmenge wurde durch die optische Geometrie der Detektorzelle bestimmt. Mit dessen Hilfe ließen sich die Detektorsignale für die anderen Pigmente anhand ihrer Extinktionskoeffizienten in absolute Pigmentmengen umrechnen.

3.1.4. Probennahme

Vor der Extraktion wurden die Proben zunächst mittels Wasserstrahlpumpe auf Glasfaserfilter transferiert. Für die Standardversuche wurden GF6-Filter verwendet, für die Extraktion der RNA (Kapitel II.6.2) und die Zellhomogenisierung für die Lipidfraktionsuntersuchungen (Kapitel II.4) etwas grobmaschigere GF92-Filter (beide Whatman, über Roth). War nach dem Algentransfer noch viel Filtermaterial frei von Zellen, so wurde dieses abgeschnitten, um die spätere Abtrennung des Pigmentextraktes vom mazerierten Filtermaterial zu erleichtern.

3.1.5.Extraktionen der Proben

Für die Pigmentextraktion laut Standardprotokoll wurden die Filter zusammen mit Glasperlen (0,1-1 mm Durchmesser) und HPLC-Extraktionsmedium (81 Teile Methanol, 11 Teile Ethylacetat, 10 Teile ddH₂O und 75 mM Ammoniumacetat) in eine Glasflasche transferiert. Diese wurde in einen MSK Zellhomogenisator (B.Braun) eingespannt, der den Filter und die darauf enthaltenen Zellen unter Trockeneiskühlung mazerierte. Die Zellen wurden 30 s lang homogenisiert, der Überstand aus der Flasche entnommen und die Suspension abzentrifugiert (Hettich-Tischzentrifuge bei max. Geschwindigkeit für 2 min bei RT). Anschließend wurde der Überstand gesammelt und das Pellet in Ethylacetat resuspendiert (Vortexer und ggf. Ultraschallbad). Dieses sehr unpolare Lösungsmittel extrahierte die unpolaren Pigmente wie β -Carotin oder veresterte Ketocarotinoide. Die Suspension wurde erneut für 1 min abzentrifugiert und die beiden Überstände vereinigt.

Unmittelbar vor der Injektion in die HPLC wurden die Lösung mit max. 10 % ddH₂O versetzt, um die polaren Pigmente besser zu trennen.

In einigen Fällen wurde ein wasserfreies HPLC-Extraktionsmedium (89 % Methanol, 11 % Ethylacetat, 75 mM Ammoniumacetat) verwendet. Dies war der Fall, wenn die Zygosporen nicht mit Methanol gespült worden waren, da z.B. die Zygoten noch jung waren und keine Sekundärwand ausgebildet hatten. Das traf zum Beispiel auf die Untersuchung der Zygotenreifung (Kurzzeitanalytik) zu. Durch das fehlende Spülen mit Methanol war der Wasseranteil im Filter nicht reduziert worden, was zu einem erhöhten Wasseranteil im Pigmentextrakt führte. Dadurch bestand die Gefahr, dass einige der unpolaren Pigmente aus dem Extrakt ausfallen. Durch den Einsatz des wasserfreien Extraktionsmediums wurde diese Gefahr verringert. Allerdings wurde den Proben unmittelbar von der Injektion in die HPLC-Anlage 10 % ddH₂O zugesetzt, um die polaren Pigmente besser auftrennen zu können.

3.1.6.Extraktion von Pigmenten

3.1.6.1. Extraktion mittels Diethylether

In einigen Fällen war eine Extraktion der Pigmente aus einem Lösungsmittel nötig. Dazu wurde die Lösung mit halbem Volumen Diethylether versetzt und stark gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von 5 M wässriger NaCl-Lösung, bis eine Phasentrennung eintrat. Dabei befanden sich die unpolaren Carotinoide in der oberen Etherphase. Durch zweimaliges Waschen mit ddH₂O wurde die Etherphase von Salzkontaminationen befreit und anschließend quantitativ abgenommen. Dabei durfte keine Kontamination mit der wässrigen Unterphase erfolgen. Dazu wurde ca. $\frac{3}{4}$ der Oberphase abgenommen und die verbliebene Oberphase durch Etherzugabe verdünnt. Diese Phase wurde ebenfalls abgenommen und mit der ersten Oberphase vereint. Der Ether wurde unter N₂-Strom verdampft und die

getrockneten Pigmente wurden im gewünschten Lösungsmittel resuspendiert oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.6.2. Extraktion mittels Butanol

Die Extraktion von Pigmenten, u.a. aus Saccharosedichtegradienten, erfolgte bei kleinen Ansätzen mit Hilfe einer Extraktion in Butanol. Dazu wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ Probe mit $66\text{ }\mu\text{l}$ sekundärem Butanol mittels Schüttler (IKA) vermischt und mit $33\text{ }\mu\text{l}$ einer 5 M NaCl -Lösung versetzt. Mittels einminütiger Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Hettich) bei 14.000 x g und RT wurde eine Phasentrennung erreicht. Die gefärbte Oberphase wurde quantitativ abgenommen und anschließend unter N_2 -Strom eingedampft. Das Pigment konnte anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder im gewünschten Lösungsmittel rückgelöst werden.

3.1.7. Trennung von Gameten und Zygosporen für Pigmentanalysen

Für die Abtrennung der Zygosporen von ungepaarten Gameten wurde die hohe Toleranz der Zygosporen gegenüber dem Lösungsmittel Methanol ausgenutzt. Die Gameten besaßen diese Toleranz aufgrund der mangelnden Sekundärzellwand nicht.

Die Zygosporen wurden zwar mit Hilfe mehrfachen Spülens mit TAP-N von den ungepaarten Gameten getrennt, eine leichte Kontamination durch Gameten konnte aber nicht vollständig verhindert werden. Daher wurden die auf Glasfaserfilter transferierten Zygosporen zweimal mit $750\text{ }\mu\text{l}$ Methanol gewaschen, indem der Filter auf der Saugapparatur verblieb, während das Methanol auf den Filter gegeben wurde, ca. 30 s inkubierte und dann mittels Wasserstrahlpumpe vom Filter gesaugt wurde. Der Durchfluss war meist hellgrün gefärbt und stellte die Pigmentfraktion der ungepaarten Gameten dar. Dieser Durchfluss wurde in einigen Fällen zu Kontrollzwecken ebenfalls in die HPLC injiziert, dazu wurde er zusätzlich mit $10\text{ }\%$ ddH₂O versetzt

3.1.8. Reduktion von Ketocarotinoiden

Die Reduktion der Ketocarotinoide erfolgte mittels NaBH_4 (Merck). Dieses wurde mit Ethanol auf eine Konzentration von 25 mg/ml eingestellt. Das Pigment wurde ebenfalls in Ethanol gelöst und soweit möglich auf eine Absorption von $0,5$ verdünnt. NaBH_4 -Lösung und gelöstes Pigment wurden im Volumenverhältnis $1:20$ gemischt. Eine Änderung des Absorptionsspektrums konnte bereits nach 5 min beobachtet werden, abgeschlossen war die Reaktion nach etwa zwei Stunden. Die reduzierten Pigmente wurden mit Ether extrahiert (siehe II.3.1.6.1) und anschließend mittels HPLC untersucht.

3.2. Massenspektrometrische Untersuchungen

3.2.1. Aufarbeiten der Proben

Für die Massenspektrometrischen Untersuchungen (MS) wurden die 6 Wochen alten Zygosporien, wie unter II.3.1.5 beschrieben, aufgearbeitet und die Pigmentextrakte mittels HPLC separiert. Die vorläufig als Astaxanthin, 4-Ketolutein, Lutein und Canthaxanthin identifizierten Pigmentpeaks wurden einzeln abgefangen und mittels Etherextraktion aus dem HPLC-Lösungsmittel isoliert. Etwa 100 ng jedes Pigmentes wurden in einem Gemisch vereint und in einem Methanol/Ethylacetat/Wassergemisch (8:1,2:1) resuspendiert.

3.2.2. MS-Methode

Das Pigmentgemisch wurde mittels LC/MS untersucht. Dazu wurde es in ein HPLC-System injiziert, das aus einer P 580 LPG Pumpe und einem UVD 340 S Detektor (Gynkotek / Dionex) bestand, welcher an ein PE-SCIEX QStarPulsar Massenspektrometer (Applied Biosystems / PE-Sciex) gekoppelt war. Betrieben wurde das System mit der Software Chromeleon 6.4 (Dionex). Die Pigmentauftrennung erfolgte auf einer ProntoSIL 200-5-C30, 5.0 μm , 250 x 4.6 mm Säule, die mit einer ProntoSIL 200-5-C30, 5.0 μm , 20 x 4.0 mm Vorsäule (Bischoff Analysetechnik) versehen war, bei 20 °C in einem binären Gradienten (Fluss 0.9 ml/min), linearer Wechsel beginnend bei 90 % Eluent A (92 % Methanol) und 10 % Eluent B (100 % tert-butyl methyl Ether) bis zu 35 % Eluent A nach 35 min. Dieses Eluentengemisch verblieb bis zum Ende des Laufes nach 52 min. Die Ionisierung der Proben erfolgte durch chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) bei 450 °C und die Gesamtionenströme wurde im positiven Ionenmodus detektiert. Die MS-Messungen wurden freundlicherweise von Stefan Tresch (BASF Limburgerhof) durchgeführt.

3.3. Dünnschichtchromatographie (DC)

3.3.1. DC zur Auftrennung von Ketocarotinoiden

Die Auftrennung der Zygosporienpigmente wurde auch mittels Dünnschichtchromatographie vorgenommen, um deren Eignung für die Trennung von Monoacyl- und Diacylestern der Ketocarotinoide zu untersuchen. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Czygan (1968). Dazu wurden die Zellen in HPLC-Extraktionsmittel I mittels Glasfaserfilter und Glasperlen im Zellhomogenisator aufgeschlossen (vergleiche Kapitel II.3.1.5). Der Pigmentextrakt wurde abzentrifugiert und die gefärbte Pigmentlösung mit Hilfe einer Glaskapillare auf Kieselgelplatten (HPTLC, Kieselgel 60 F 254, Merck) aufgetragen. Als Vergleich dienten die Referenzpigmente Astaxanthin, Canthaxanthin, β -Carotin und Lutein. Auf Laufmittel kam ein

Naphtabenzin/Isopropanol/Chloroform/Wasser-Gemisch (90:10:70:0,3) zum Einsatz. Nachdem die Laufmittelfront das obere Ende der Kieselgelplatte erreicht hatte, wurde die Platte aus der Probenkammer entfernt, unter dem Abzug getrocknet und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

Für die HPLC-Untersuchungen wurden die einzelnen Pigmentbanden von der Platte gekratzt und jeweils in 200 µl Ethylacetat mittels Vortexer extrahiert. Durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 14.000 x g, RT, 1 min) wurde die Kieselgelmatrix entfernt und der pigmenthaltige Überstand in die HPLC injiziert.

3.3.2. DC zur Auftrennung von Lipiden

Für die Analyse der Lipidzusammensetzung in verschiedenen Zellstadien von *C. reinhardtii* wurde das Protokoll von Grünewald und Mitarbeiter (2001) verwendet, die die Lipidzusammensetzung von Aplanosporen von *H. pluvialis* untersucht hatten. Dazu wurden jeweils ca. 1×10^7 Zellen von *C. reinhardtii* auf einen GF6-Filter transferiert. Dieser wurde mittels MSK Zellhomogenisator (B.Braun) und Glasperlen in 1 ml Chloroform:Methanol-Gemisch (2:1, v:v) unter CO₂-Kühlung für 30 s mazeriert, der Extrakt bei 14.000 x g und RT für 1 min zentrifugiert, wobei 500 µl Extrakt rückgewonnen wurden. Dieser Rohextrakt wurde mit 250 µl ddH₂O vermischt, kurz zentrifugiert (gleiche Bedingungen), so dass zwei Phasen entstanden. Die kräftig gefärbte Unterphase wurde abgenommen und auf HPTLC Kieselgel 60 F 254 Platten (Merck) transferiert.

Als Referenzen wurden verwendet:

- 1) Lipidstandard aus SQDQ, PG, DGDG und MGDG, Konzentration je 1 µg pro µl (Lipid Products, Großbritannien), Details siehe Kapitel III.7
- 2) Sonnenblumenöl (Handelsmarke) als TAG-Standard (1 µg/µl, 1:1500 verdünnt)

Die Auftrennung erfolgte in zwei verschiedenen Laufmitteln, von denen das erste eine Auftrennung der polaren Lipide und das zweite eine Trennung von Pigmenten und Neutralfetten ermöglichte.

Als erstes Laufmittel wurde ein Gemisch aus Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser (73:25:2:4) verwendet. Nachdem die Laufmittelfront etwa die erste Hälfte der Platte erreicht hatte, wurde ihre Position seitlich auf der Platte gekennzeichnet und die Platte anschließend in das zweite Laufmittel, bestehend aus Hexan/Diethylether/Essigsäure (85:20:1,5) transferiert. Die Platte wurde zwischenzeitlich nicht getrocknet, da andernfalls die Pigmente deutlich verlaufen waren und keine bessere Auftrennung der Lipide erfolgte.

Anschließend wurde die Platte an der Luft getrocknet und mit Godin's Reagenz besprüht (1 Teil 1 %ige ethanolische Vanillinlösung, 1 Teil 3 %ige Perchlorsäure, unmittelbar vor Gebrauch gemischt). Nach einer Trocknung von 15 min bei 95 °C wurden schwarzen Banden sichtbar.

4. Separierung und Identifikation verschiedener zellulärer Lipidphasen mittels Ultrazentrifugation

Für die Identifizierung der Lipidfraktionen aus Zygosporien von *C. reinhardtii* wurde ein Protokoll zur Augenfleckisolierung von *C. reinhardtii* (Schmidt et al. 2006) abgewandelt. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert bei 3000 rpm, 4 °C, 10 min (Rotor JLA 10.500, Beckman). Das Medium wurde vollständig entfernt und die Zellen in 1,5 ml Resuspendierungspuffer gelöst und mittels MSK Zellhomogenisator und Glasperlen unter CO₂-Kühlung für 25 s homogenisiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Glasperlen dreimal mit je 1 ml Resuspendierungspuffer gewaschen und die Waschfraktionen mit dem Überstand vereint. Zelltrümmer wurden durch eine kurze Zentrifugation bei 10.000 x g für 20 s bei RT entfernt. In ein 4 ml-Ultrazentrifugenröhrchen wurden zunächst 1,5 ml Zellextrakt, darüber 1 ml einer 32 %ige Saccharoselösung, darüber 1 ml einer 21 %ige Saccharoselösung und abschließend 250-500 µl Homogenisierungspuffer bis zum Rand des Gefäßes gefüllt. Die Gradientenröhrchen wurden bei 100.000 x g (31.000 rpm bei Verwendung des Rotors SW 60) für 115 min bei 4 °C in einer Ultrazentrifuge Optima XL-100 (Beckman) zentrifugiert. Die einzelnen Banden wurden abgenommen, je 1:6 verdünnt mit einem Methanol:Dichlormethan-Gemisch (2:1, v:v), mittels Vortexer (Scientific Industry) und Transsonic 460 Ultraschallbad (Elma) gemischt, kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 14.000 x g, 1 min bei RT) und mittels HPLC analysiert.

Die Rezepte der Puffer befinden sich im Anhang 2.16.

Zusätzlich wurde auch das Verfahren der Zellmazerierung mittels Zelldismembrator U (B.Braun) getestet. Dazu wurden die pelletierten Zellen in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes Kunststoffgefäß gegeben, in dem sich eine Wolframkugel befand. Das Gefäß wurde in den Zelldismembrator gespannt und dreimal für jeweils 30 s bei 9000 rpm geschüttelt. Zwischenzeitlich wurde das geschlossene Gefäß in flüssigem Stickstoff gekühlt. Im Anschluss wurden die Zellen in Resuspendierungspuffer überführt. Danach erfolgte die Weiterbehandlung der Lösung gemäß dem oben genannten Protokoll.

5. Photometrie

5.1. Photometrische Untersuchung von Pigmenten

Photometrische Untersuchungen von isolierten Pigmenten und Gesamtpigmentextrakt aus algalem Zellmaterial erfolgte mit Hilfe des MPS-2000 Zweistrahlphotometers (Shimadzu, Japan). Dabei wurden Spektren zwischen 350 und 700 nm aufgenommen.

5.2. Photometrische Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von DNA und RNA

Die photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA erfolgte mit Hilfe des Biophotometers (Eppendorf).

Dazu wurde die Absorption der Pyrimidin- und Purinbasen aufgrund ihrer aromatischen Ringverbindung bei 260 nm bestimmt.

Dabei gilt bei RNA: $OD_{260} = 1$ entspricht 40 μg RNA pro ml Lösung

Dabei gilt bei DNA: $OD_{260} = 1$ entspricht 50 μg DNA pro ml Lösung

Zusätzlich konnte die Kontamination mit Proteinen mittels des Verhältnisses OD_{260}/OD_{280} bestimmt werden, da Proteine aufgrund der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm Licht absorbieren. Dabei gilt für eine reine Präparation von DNA ein Quotient zwischen 1,8 und 1,9 sowie für RNA ein Quotient zwischen 1,9 und 2,0 (Sambrook und Russell 2001).

6. Molekularbiologische Arbeiten

6.1. Isolierung von DNA aus *Chlamydomonas*

DNA aus *C. reinhardtii* wurde als Template für die Amplifikation von spezifischen Genen sowie der Mating-Type-PCR benötigt. Als Extraktionsverfahren stellte sich eine Methode heraus, die zeit- und kostengünstig war und der Veröffentlichung von Lee und Mitarbeitern (2008) entnommen worden war. Das Laborprotokoll befindet sich im Anhang 2.7.

Dabei wurden in den meisten Fällen vegetative Zellen einer max. 5 Tage alten Flüssigkultur (Standardprotokoll) eingesetzt. Vereinzelt wurden die Zellen auch einer Agarkultur entnommen. Das Zellmaterial wurde pelletiert, in einem Proteinase K (Sigma) enthaltenen Isolierungspuffer resuspendiert und zunächst eine Stunde bei 58 °C und anschließende eine Stunde lang bei 94 °C im Thermocycler (T-Gradient, Biometra) inkubiert. Danach wurde die Probe in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit (13 000 x g) für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entweder unmittelbar in eine PCR eingesetzt oder vor der weiteren Verwendung für bis zu 4 Monate bei -20 °C gelagert.

6.2. Isolierung von RNA aus *Chlamydomonas*

Mit Hilfe der RNA-Extraktion und anschließender Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurde die Transkriptionsstärke verschiedener Gene aus *C. reinhardtii* untersucht.

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kit (Roche). Zuvor waren die Kits NucleSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel), SV Total RNA Isolation Kit (Promega) und peqGOLD Plant RNA Kit (peqlab) getestet worden. Das Kit der Firma Roche erwies sich für die Untersuchungen an *C. reinhardtii* als besonders zuverlässig. Da die Folgeexperimente ebenfalls mit Kits der Firma Roche durchgeführt wurden, waren die Reagenzien optimal aufeinander abgestimmt. Das RNA Isolation Kit basiert auf dem Prinzip der Bindung von Nukleinsäuren an eine Silikamatrix unter Hochsalzbedingungen. Folglich wird an das Säulenmaterial RNA, aber auch DNA gebunden. Durch einen DNA-Verdau auf der Säule wird anschließend die DNA fragmentiert und mit mehreren Waschschritten von der Säule entfernt. Mit gering konzentrierten Puffern oder Wasser kann die gereinigte Gesamt-RNA von der Säule eluiert werden. Für alle Experimente wurde das Zellmaterial mit Hilfe eines Beadbeaters in speziellen Reaktionsgefäßen zerkleinert, die Kunststoffkugeln enthielten (Tube B-für Bakterien, ICN). Gegen Ende der vorliegenden Arbeit waren auch Reaktionsgefäße verfügbar, die verschiedene Kugelmaterien und -größen enthielten (Tube SK38, peqlab).

Das Zellmaterial wurde zerkleinert, indem die Zellen zusammen mit einer 10 mM TRIS-Lösung (pH 8,0) sowie dem im Kit enthaltenen Lysispuffer in die Gefäße gegeben und mittels Beadbeater aufgeschlossen wurden. Das Zellhomogenisat wurde auf die Säulenmatrix gebunden und anschließend gemäß Hersteller-Protokoll einem DNA-Verdau unterzogen, gewaschen und von der Säule eluiert. Die Konzentration und die Reinheit der Probe wurden gemäß Kapitel II.5.2 bestimmt. Die Intaktheit der RNA wurde mit Hilfe eines Agarosegels überprüft. Dabei mussten die distinkten Banden der verschiedenen ribosomalen RNAs vorhanden sein. Waren sie intakt, so konnte man davon ausgehen, dass auch die verschiedenen mRNA-Spezies nicht durch RNasen verdaut wurden.

RNasen befinden sich auf Haut, in Schweiß sowie in Schleimhäuten und bieten einen Schutz vor viraler RNA. Bei der Extraktion von RNA muss folglich das Material vor einem Verdau der humanen RNasen geschützt werden. Daher wurden alle Arbeiten mit größter Sorgfalt und unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu gehörten das sorgfältige Sterilisieren aller Arbeitsmaterialien, die Verwendung von frischen Lösungen und Einwegmaterialien sowie die Kühlung aller Reagenzien und Reaktionsgefäße auf 4 °C, da RNasen bei kalten Temperaturen nicht aktiv sind.

6.2.1.RNA-Isolierung aus vegetative Zellen

Für die Extraktion aus vegetativen Zellen wurden 10 ml einer 5 Tage alten Kultur mit einer Dichte von etwa 1×10^7 Zellen pro ml eingesetzt. Die Zellen wurden auf GF6-Filter gezogen oder durch Zentrifugation bei $5\,000 \times g$ für 5 min pelletiert und die Zellen direkt im oben beschriebenen TRIS-Puffer sowie Lysispuffer des verwendeten RNA-Extraktionskits gelöst. Danach wurde wie unter Kapitel II.6.2. beschrieben weiter gearbeitet.

6.2.2.RNA-Isolierung aus Zygosporen und ungepaarten Gameten

Für die Isolation der RNA aus Zygosporen wurden Zygoten verwendet, die fünf Tage lang im Dunkeln inkubiert worden waren. Diese wurden, soweit möglich, von Gameten und Agarresten befreit und die resultierende Zygotensuspension auf GF6-Filter gezogen oder abzentrifugiert (siehe II.3.1.4). Dabei wurden ca. 1×10^6 Zellen eingesetzt. Danach wurde wie in Kapitel II.6.2 beschrieben weiter verfahren.

Die Gametenprobe wurde von ungepaarten Gameten erstellt, die beim Abspülen der Zygosporenplatten gewonnen worden waren. Dabei wurden ca. 1×10^7 Zellen für die RNA-Extraktion eingesetzt.

6.3. Reverse Transkription

Mit Hilfe der reversen Transkription wurde die RNA in einzelsträngige DNA (single strand cDNA) umgeschrieben. Diese konnte im Anschluss im Rahmen einer PCR-Reaktion in doppelsträngige cDNA komplementiert werden.

Für die Reaktion wurde das Transcriptor High Fidelity cDNA-System (Roche) verwendet, da dieses eine variable Reaktionstemperatur der Reversen Transkriptase erlaubte. Aufgrund des hohen GC-Gehaltes der Gene von *C. reinhardtii* wurde eine Reaktionstemperatur von $53\text{ }^\circ\text{C}$ verwendet.

In den meisten Fällen wurde das maximale Einsatzvolumen an RNA gewählt, da die gewonnenen RNA-Konzentrationen häufig unterhalb des vorgegebenen Konzentrationslimits des Kits von $4\ \mu\text{g}$ lagen. Für die Amplifikation wurden Oligo(d)T-Primer verwendet, da diese an den Poly-A-Schwanz der mRNA-Moleküle anlagerten und folglich überwiegend vollständige mRNAs und nicht nur Teilstücke in cDNA umgeschrieben wurden. Die weitere Reaktion wurde gemäß den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

In einigen Fällen wurde angestrebt, von verschiedenen Proben (z.B. vegetative Zellen und Zygoten) gleiche RNA-Konzentrationen in der RT-PCR einzusetzen. Dazu wurde die RNA-Konzentration zuvor photometrisch bestimmt. Die Details finden sich im Kapitel III.9.

6.4. PCR

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können DNA-Sequenzen mit Hilfe des thermophilen Enzyms DNA-Polymerase vervielfältigt werden (Lottspeich und Zorbas 1998). Die PCR kam im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum einen zur Bestimmung des Paarungstyps von *C. reinhardtii* zum Einsatz. Zum anderen wurde mit dieser Technik die Expression von einzelnen Genen in den verschiedenen Zellstadien von *C. reinhardtii* analysiert. Eine besondere Herausforderung stellte der sehr hohe GC-Gehalt des Genoms von *C. reinhardtii* dar. Dieser beträgt 64 % im Gesamtgenom bzw. 68 % im codierenden Bereich des Erbguts. Im Vergleich dazu besitzt *Arabidopsis thaliana* einen GC-Gehalt von 36 % im Gesamtgenom und von 44 % im codierenden Bereich (Merchant et al. 2007). Ein hoher GC-Gehalt führt aufgrund des größeren Anteils an Wasserstoffbrückenbindungen zu einem stärkeren Zusammenhalt der doppelsträngigen DNA und z.T. auch zu einer verstärkten Ausbildung von Sekundärstrukturen. Substanzen wie z.B. DMSO oder Betain bewirken die Reduktion dieser Sekundärstrukturen (Mühlhardt 2009). Als besonders zuverlässig bei der Amplifikation der Gene aus *C. reinhardtii* erwies sich das GC-Rich PCR System (Roche), das aufgrund enthaltener Reagenzien für GC-reiche Templates optimiert war. Es enthält eine Enzymmischung aus *Taq*- und *Tgo*-Polymerase.

Des Weiteren wurde für einige Experimente das KAPA2G-Robust Polymerase-Kit (peqlab) verwendet, das ebenfalls einen speziellen Puffer und Enhancer für GC-reiches Template enthielt. Dieses Kit besaß aufgrund des Fehlens einer Proofreading-Polymerase eine höhere Fehlerrate, so dass es nicht bei der Sequenzbestimmung der Gene *Zym C* und *EZY 15* zum Einsatz kam, sondern für die Nachweisreaktionen eingesetzt wurde. Zudem betrug die Kosten pro Ansatz bei diesem Kit nur etwa 5 % im Vergleich zum GC-Rich-Kit.

Bei allen Versuchen wurden Kontrollansätze ohne Template-DNA durchgeführt, wodurch eine falsch-positive Amplifikation infolge von Kontaminationen ausgeschlossen werden konnte. Durchgeführt wurden die PCR-Experimente im T-Gradient Thermocycler (Biometra).

6.4.1. Amplifikation verschiedener Gene aus *C. reinhardtii*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Gene mittels PCR aus *C. reinhardtii* nachgewiesen:

Gen	Primerkombination	Annealing-Temperatur	Amplifizierte Länge bei cDNA-Template	Amplifizierte Länge bei DNA-Template
BKT	CrBKT-end-a2p CrBKT-3UTR-e1m	59 °C	688 bp	987 bp
CAO	CrCAO-end-a2p CrCAO-3UTR-e1m	61 °C	765 bp	927 bp
CHYB	CrCHYB-end-a2p CrCHYB-3UTR-e2m	58 °C	627 bp	1407 bp
ZymC	CrZymC-a2p CrZymC-e2m	57 °C	283 bp	730 bp
EZY15	CrEZY15-a1p crEZY15-e1m	56 °C	562 bp	-

Tabelle II.2) Übersicht über die erfolgreich amplifizierten Gene inkl. verwendeter Primer und Annealing-Temperaturen sowie der erwarteten Längen der PCR-Produkte.

Eine Übersicht über die verwendeten Primer und erfolgreichen Amplifikationsbedingungen der verschiedenen Gene findet sich im Anhang 2.9-2.10.

6.4.2. Bestimmung des Paarungstypes (Matingtype-PCR)

Die Bestimmung des Paarungstypes wurde in Anlehnung an Werner und Mergenhahn (1998) und Köhler (2008) durchgeführt. Dazu wurden zwei paarungstypspezifische Gene in einer Multiplex-PCR untersucht. In dieser PCR wurden Primer eingesetzt, die spezifische Sequenzen aus der Matingtype-Region amplifizierten, die jeweils nur in einem der beiden Paarungstypen vorhanden waren. Die Amplifikation erfolgte als Multiplex-PCR, so dass beide Primerpaare im gleichen Ansatz verwendet wurden. Je nach DNA wurde nur das Gen, das in diesem Stamm vorhanden war, amplifiziert. Da beide Primerkombinationen unterschiedlich lange Amplifikate lieferten, konnte aufgrund der Bandengröße im DNA-Gel der Matingtype direkt bestimmt werden.

Verwendet wurde das für den Paarungstyp „plus“ spezifische FUS-Gen und das für den Paarungstyp „minus“ spezifische MID-Gen. Das FUS-Gen codiert für ein Glycoprotein, das an der Zellfusion während der Paarung beteiligt ist. Das Produkt des MID-Gens ist an der Induktion der „minus“-Gameten beteiligt.

Die Bedingungen dieser PCR und die Primersequenzen finden sich im Anhang 2.9 und 2.11, dort ist auch eine erfolgreiche Amplifikation dargestellt.

6.5. Agarosegele

Die Untersuchung der PCR-Amplifikate und der RNA erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren in einem Agarosegel.

Dabei wurde eine Konzentration an Agarose (Broad Range, Carl Roth) von 1 % für Gen-Amplifikate und von 0,7 % für RNA-Nachweise eingesetzt. Als Puffer wurde 1 x TAE verwendet. Die Gele wurden je nach Bedarf in vertikalen (Genterprise) oder horizontalen (peqlab, bzw. Eigenbau Universität Mainz) Elektrophoreseapparaturen aufgetrennt. Als Marker kam ein Laddermix (Fermentas) zum Einsatz, der eine Mischung aus einer 100 bp-Ladder und einer 1 kb-Ladder darstellte. Alle Proben wurden mit 6 x Loading Dye (Fermentas) versetzt. Die Details des Markers und die Rezeptur des Puffers finden sich im Anhang 2.13 und 2.14.

Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden mit dem in Nukleinsäuren interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (Carl Roth) gefärbt, indem das Agarosegel in einer 0,0001 % (v/v) Farbstofflösung für 15 min inkubiert und anschließend für 5 min in dH₂O entfärbt wurde. Die Visualisierung unter UV-Licht und die Dokumentation erfolgte mit einer Gel Doc 1000-Apparatur (BioRad).

6.6. Sequenzierungen

Mittels einzelner Kontrollsequenzierungen wurde der Nachweis der Transkriptionsaktivität einzelner Gene in den verschiedenen Zellstadien überprüft. Dazu wurden RT-PCR-Amplifikate aufgereinigt, gemäß Herstellerangaben mit der BigDye 3.1-Sequenzierungsmischung amplifiziert und anschließend durch einen kommerziellen Anbieter (Genterprise, Mainz) sequenziert.

Zusätzlich wurde mit dieser Methode die Sequenz des Gens ZymC identifiziert.

7. Verwendete Bioinformatik-Programme und Datenbanken

Die Untersuchungen der Gensequenzen erfolgten mit dem Programm BioEdit (Hall 1999; <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Die Referenzsequenzen der untersuchten Gene wurden durch eine BLAST-Suche im Genombrowser des Joint Genome Institutes (<http://www.jgi.doe.gov/>) oder in der GenBank-Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) erhalten.

Die Erstellung der Primer erfolgte mit dem webbasierten Programm Primer 3 (Rozen und Skaletsky 2000; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Die Überprüfung der Primerfunktion erfolgte mit dem Programm FastPCR (Kalendar et al. 2009; <http://primerdigital.com/fastpcr.html>).

Informationen zu den *C. reinhardtii*-Stämmen lieferte die Homepage des Chlamydomonas Centers (www.chlamy.org).

Informationen zu Medien und weiteren Algenstämmen lieferte die Homepage der Sammlung von Algen der Universität Göttingen (www.epsag.uni-goettingen.de).

I. ERGEBNISSE

1. Herstellung und erste Charakterisierung der Zygosporen von *C. reinhardtii*

1.1. Paarung von Gameten verschiedener Stämme

1.1.1. Paarung der Stämme CLS 31-8 x CLS 31-10

Die ersten Paarungen erfolgten mit den arginin-auxotrophen Stämmen CLS 31-10 mt+ und CLS 31-8 mt- in Zusammenarbeit mit Georg Schmidt im Rahmen seiner Staatsexamensarbeit (Schmidt 2007). Dazu wurden ca. 4 Tage alte vegetative Zellen mit einer Zelldichte von ca. 2×10^6 Zellen/ml in stickstofffreies TAP-Medium überführt (Harris 2009, Van Winkle-Swift 1977). Die Gameteninduktion erfolgte durch Inkubation im Licht ($60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) für 24 Stunden. Ein deutlicher Hinweis für eine erfolgreiche Gameteninduktion war die Mobilität der Zellen. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation eingengt, auf gleiche Zellzahl eingestellt und im selben Zellzahlverhältnis vermischt. Nach vierstündiger Paarung in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen im Licht ($60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) wurden die Lösungen auf TAP-N-Agarplatten mit 4 % Agar transferiert. Sie wurden so lange unter einem Luftstrom in der Sterilbank belassen, bis die Lösungen vollständig in den Agar eingezogen waren und die Platten trocken erschienen. Es folgte eine Inkubation unter gleichen Lichtverhältnissen für 24 Stunden. Danach wurden die Platten ins Dunkle transferiert und bei 22 °C gelagert. Nach ca. fünf Wochen konnten makroskopisch farbliche Veränderungen der Zellen beobachtet werden; die grünen Zellen hatten sich orange verfärbt. Unter dem Mikroskop konnten kleine Zellen von unregelmäßiger Form sowie große, runde Zellen erkannt werden. Auffällig war, dass die dickeren, runden Zellen scheinbar tiefer im Agar eingesunken waren, da sie in einer anderen Fokussierungsebene lagen (Abb. III.1.1A). Durch Spülen mit TAP-N-Medium konnten die kleinen, unregelmäßig geformten Zellen entfernt werden, die großen hafteten im Agar (Abb. III.1.1B).

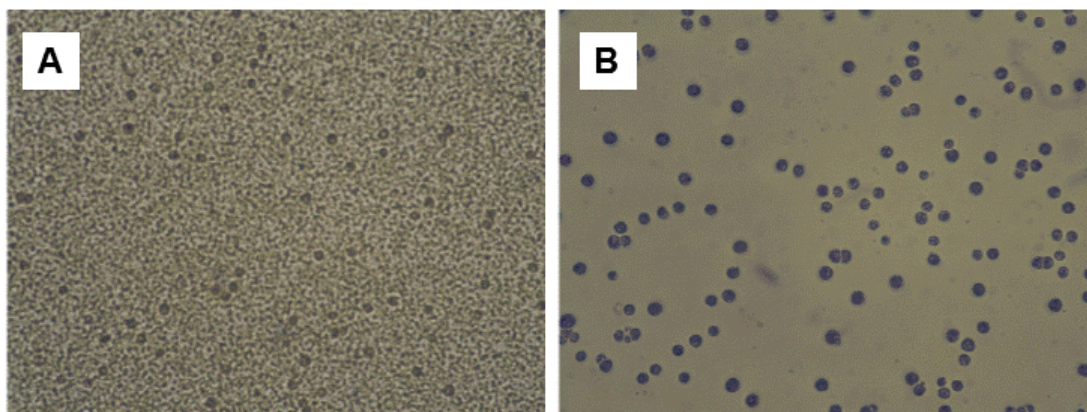


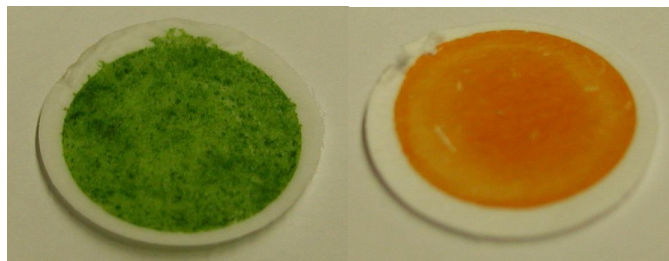
Abbildung III.1.1) 9 Wochen alte Zygotenplatten, CLS 31-10 x CLS 31-8, LM mit 200facher Vergrößerung.
A: Platte nicht abgspült, d.h. Zygoten und ungepaarte Gameten sichtbar,
B: Platte abgspült, d.h. nur eingesunkene Zygosporen sichtbar.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte beobachtet werden, dass die eingesunkenen Zellen zum Teil keine Chlorophyll-Autofluoreszenz mehr zeigten (Abb. III.1.2). Dies lies einen Abbau des Chlorophylls vermuten.



Abbildung III.1.2) Zygosporien besitzen keine grüne Chlorophyllautofluoreszenz mehr, LM mit 200facher Vergrößerung, Anregung mit blauem Fluoreszenzlicht (aus Schmidt 2007).

Wurden die eingesunkenen Zellen mittels Zellschaber von der Platte gekratzt, konnte eine auffällige Orangefärbung beobachtet werden (Abb. III.1.3). Diese unterschied sich deutlich von der kräftig grünen Farbe der vegetativen Zellen. Die abgespülte Zelllösung war hellgrün bis olivfarben.



**Abbildung III.1.3) Zellen von *C. reinhardtii* auf GF-Filter gesaugt.
Links: vegetative Zellen CLS 31-10, 7 Tage alt unter Standardbedingungen angezogen,
Recht: Zygosporien CLS 31-10 x CLS 31-8, 7 Wochen alt bei 22 °C auf TAP-N-Agarplatten im Dunkeln gelagert.**

Zygoten zeichnen sich, im Gegensatz zu vegetativen Zellen, durch einen vergrößerten Zelldurchmesser und eine orangefarbene statt grüne Farbe aus (Harris 2009). Daran angelehnt wurden die größeren, runden Zellen als Zygoten bestimmt, die für die weiteren Pigmentuntersuchungen eingesetzt wurden. Bei den kleinen, unregelmäßig geformten Zellen handelte es sich demnach um ungepaarte Gameten, die aufgrund der Lagerung unter Stickstoff- sowie Lichtmangel degradierten.

Während der Versuche zeigte sich, dass die Ausbeute an Zygoten bezogen auf die Zahl der eingesetzten Gameten gering war. Die von Schmidt (2007) untersuchten Paarungseffizienzen zeigten eine durchschnittliche Ausbeute von 8,4 %, d.h. weniger als 10 % der

eingesetzten Gameten wurden in Form von Zygoten wieder gewonnen (Tab. III.1.1). Als maximale Paarungseffizienz konnte ein Wert von lediglich 27 % erreicht werden.

Auffällig war eine gesteigerte Zygotenausbeute bei einer hohen Mobilitätsrate der Gameten. Schmidt postuliert in seiner Arbeit, dass die Mobilität für den Paarungserfolg entscheidend sei. Diese Beobachtung wurde auch von Harris (2009) beschrieben; immobile Zellen befanden sich meist in einem Palmellastadium, das aufgrund der fehlenden Geißeln kein paarungsfähiges Zellstadium darstellt.

	Effizienzen (%)
Ansatz A	1,4
Ansatz B	0,4
Ansatz C	8,4
Ansatz D	27,0
Ansatz E	4,9
Durchschnitt	8,4

Tabelle III.1.1) Ausbeute bei der Zygotenbildung der Paarung der Stämme CLS 31-10 x CLS 31-8 (Daten aus Schmidt 2007).

Die Paarung der beiden Stämme CLS 31-10 und CLS 31-8 war demnach grundsätzlich erfolgreich. Allerdings war die Paarungseffizienz sehr gering. Es wurde vermutet, dass dies u.a. an der Argininauxotrophie dieser Stämme lag. Sie benötigten eine Zugabe von Arginin im Medium, da Ihnen die Fähigkeit zur Argininsynthese fehlte. Die stickstoffhaltige Aminosäure Arginin kann von *C. reinhardtii* bedingt auch als Stickstoffquelle verwendet werden (Harris 2009). Somit war eine unvollständige Gametenbildung sehr wahrscheinlich. Für die weiteren Versuche wurden folglich neue Stämme herangezogen. Die Wahl fiel dabei auf die Stämme cc620 mt+ und cc621 mt-, die in der Chlamydomonas Core Collection als besonders paarungseffizient beschrieben wurden und keinen Argininzusatz benötigten (Details siehe Kapitel II.2.2).

1.1.2. Paarung der Stämme cc620 x cc621

Bereits in den ersten Paarungsversuchen der Stämme cc620 mt+ und cc621 mt- zeigte sich eine sehr hohe Mobilität der Gameten, die sich zum einen durch sehr schnelle Bewegungen der Zellen darstellte. Zum anderen waren fast alle Zellen bei mikroskopischer Betrachtung beweglich; nur vereinzelt wurden unbewegliche Zellen beobachtet.

Nach erfolgreicher Paarung (Methode siehe Kapitel II.2.5) konnten bereits nach ca. 2 Wochen eine Orangefärbung der Zellen auf dem Agar beobachtet werden.

Wurden die ungepaarten Gameten von einer Zygotenplatte (Abb. III.1.4A) gespült, so verblieb ein dichter Zellrasen aus abgerundeten, größeren Zellen, die im Agar eingesunken waren (Abb. III.1.4B). Diese Zellen konnten mit dem Zellschaber von der Platte gekratzt werden. Sie zeigten eine kräftige orange Färbung, während die abgespülte Gametensuspension meist eine oliv-grüne, z.T. noch hellgrüne Färbung zeigte.

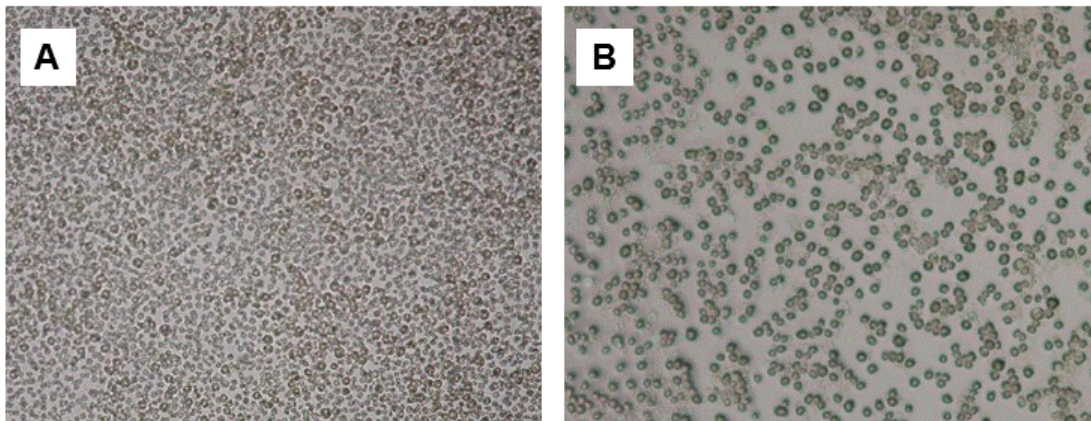


Abbildung III.1.4) 3 Wochen alte Zygotenplatten, cc620 x cc621, LM 200fache Vergrößerung.
A: Platte nicht abgespült, d.h. Zygoten und ungepaarte Gameten sichtbar,
B: Platte abgespült, d.h. nur eingesunkene Zygosporen sichtbar,

Wurden die Zellen nach der zweistündigen Paarung im Licht nicht auf Agarplatten transferiert, sondern länger in Flüssigkultur im Licht inkubiert, so konnte ein Film auf der Flüssigkeit beobachtet werden, der als Pellicula bezeichnet wird (Millikin et al. 1984). Genauere Untersuchungen zeigten, dass dies eine Matrix darstellt, die lange Fibrillen enthält und dabei reich an Hydroxyprolinen, Arabinose und Galactose ist (Suzuki et al. 2000). Die Pellicula ist ein Zeichen für eine erfolgreiche Zygotenbildung. Sie konnte auch bei der Paarung der Stämme cc620 mit cc621 beobachtet werden. Erste dünne Stränge bildeten sich nach vier Stunden Inkubation der Flüssigkulturen im Licht, nach 24 Stunden war ein ca. 1-2 mm dicker Film zu erkennen. Dieser befand sich überwiegend auf der Flüssigkeit, zum Teil kleidete er aber auch die mit Suspension bedeckten Gefäßinnenseiten aus.

In einzelnen Veröffentlichungen, z.B. Wegener und Mitarbeiter (1989) wurde die Paarungszeit so gewählt, dass sich eine möglichst große und dicke Pellicula bildete, die

dann für Folgeversuche auf Plattenkulturen übertragen und im Dunkeln gelagert wurde (Abb. III.1.5).

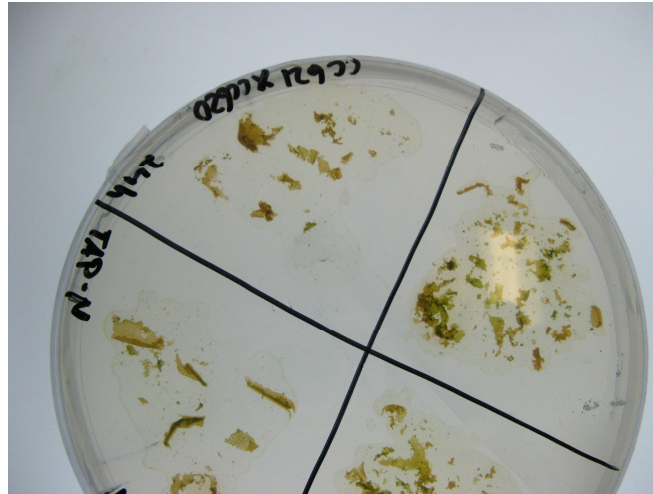


Abbildung III.1.5) Pelliculastücke von Paarung cc620 x cc621, auf TAP-N-Platte übertragen.

Bei mikroskopischen Betrachtungen fiel allerdings auf, dass die Entwicklung der Zygoten innerhalb der Pellicula sehr uneinheitlich war. Zwischen kräftig orangefarbenen Zellen konnten noch auffällig grüne Zellen beobachtet werden (Abb. III.1.6), so dass vermutet wurde, dass die Zygoten in dieser Matrix heterogen reiften. Der Grund dafür ist unklar. Möglicherweise herrscht innerhalb dieser kohlenhydrat- und proteinreichen fibrillösen Struktur ein hoher Wassergehalt. Schmidt (2007) zeigte, dass die Zygotenreife durch eine trockene Umgebung beschleunigt wurde. Die ungleichmäßige Reifung der Zygosporen wäre somit eine Folge der unterschiedlichen Feuchtigkeitskonzentrationen innerhalb der Matrix. Alternativ ist denkbar, dass eine unterschiedliche Anheftung der Zygoten in diese Matrix erfolgt. Für die Zygotenreife ist eine Anheftung an einen festen Untergrund essentiell. Suzuki und Kollegen spekulierten, dass die Pellicula solch eine Anheftungsbasis darstellt, wenn die Paarung nicht auf festem, sondern flüssigem Untergrund erfolgt (Suzuki et al. 2000). Eine schlechte Anheftung in diesem Fibrillengerüst einzelner Zygoten könnte zu einer Verzögerung der Reifung führen.

Des Weiteren ließen sich die Zellen der Pellicula für die Pigmentextraktionen nur schwer homogenisieren.

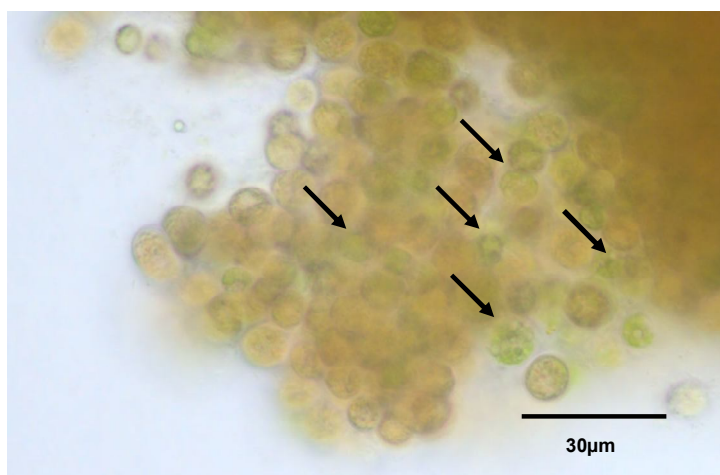


Abbildung III.1.6) Pellicula einer Zygosporenkultur cc620 x cc 621, 4 Wochen lang bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarkulturen gelagert. Markiert sind grünliche Zellen zwischen den orangefarbenen Zygosporen.

Aufgrund der großen Inhomogenität der Zellen und der erschwerten Zellhomogenisierung wurde von der Verwendung der Pellicula Abstand genommen. In einigen Fällen wurde ihr Vorliegen jedoch als Bestätigung einer erfolgreichen Paarung verwendet.

Als Standardpaarungsprotokoll wurde somit für die Folgeversuche das unter Kapitel II.2.5.1.1-II.2.5.1.3 beschriebene Protokoll verwendet. Im Vergleich zur Paarung der Stämme CLS 31-10 x CLS 31-8 war dabei die Paarungszeit von ursprünglich 4 Stunden auf 2 Stunden reduziert worden, um eine Bildung der Pellicula möglichst zu vermeiden.

So wurden bei einem Einsatz von jeweils 1×10^8 Gameten pro ml Lösung und einem Auftrag von 0,8 ml dieser Paarungslösung auf eine kleine Platte, bzw. 1,2 ml auf eine große Platte ca. $2,0$ bzw. 3×10^7 Zygoten zur Untersuchung rück gewonnen. Folglich konnte eine durchschnittliche Paarungseffizienz von rund 25 % erreicht werden (Tabelle III.1.2). Dies bedeutete, dass 25 % der theoretisch erwarteten Zygoten nach der Paarung und nach dem Abschaben aus den Agarkulturen wieder gewonnen werden konnten.

	Effizienzen Mittelwert (%)	Effizienzen Standardabweichung	Anzahl der ausgewerteten Platten	Bemerkung
Zeitreihe 1	20,2	7,1	12	
Zeitreihe 2	24,0	6,2	26	Filtriert
Zeitreihe 3	27,4	6,4	10	Filtriert
Zeitreihe 4	29,7	20,1	40	Filtriert
Durchschnitt	26,4	14,6	89	

Tabelle III.1.2) Übersicht über die Effizienzen der Paarung der Stämme cc620 x cc621.

1.2. Lichtmikroskopische Untersuchungen der verschiedenen Zellstadien

Bereits in den 1970er Jahren wurde von Cavalier-Smith (1975, 1976) beschrieben, dass vegetative Zellen und Zygoten von *C. reinhardtii* eine unterschiedliche Morphologie zeigen. Das konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Somit konnten die unterschiedlichen Zellstadien vor ihren weiteren Analysen mittels mikroskopischer Kontrolle sicher bestimmt werden.

Bereits im Lichtmikroskop konnten bei einer 200fachen Vergrößerung deutliche Unterschiede bestimmt werden. Vegetative Zellen zeigten eine ovale Zellform und meist zwei lange Geißeln an einem Ende der Zelle (Abb. III.1.7A). In einigen Fällen konnten der rötliche Augenfleck (Stigma) sowie die kontraktile Vakuole beobachtet werden. Zellmorphologische Unterschiede zwischen vegetativen Zellen und Gameten konnten mit dieser Methode nicht festgestellt werden. Zygosporen zeichneten sich dagegen durch eine runde Form und eine stark lichtbrechende Zellwand aus und waren stets unbegeißelt (Abb. III.1.7B). Es waren keine weiteren Zellstrukturen zu erkennen; vielmehr erschienen die Zellen mit einer granulären Substanz gefüllt

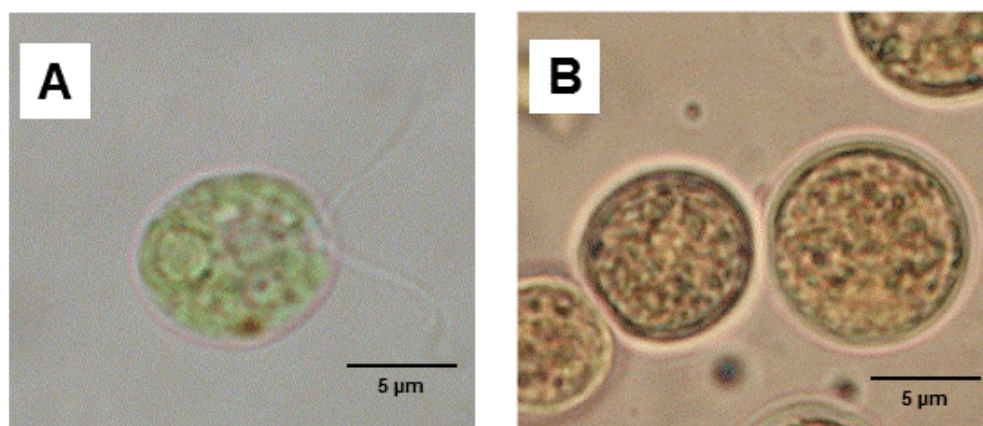


Abbildung III.1.7) Lichtmikroskopische Aufnahmen *C. reinhardtii*.

A: Vegetative Zelle, cc621 mt-; Standardanzucht,

B: Zygospore, cc620xcc621, 5 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatte gelagert.

Untersuchungen mit dem DIK-Mikroskop verdeutlichten diese Unterschiede. In den vegetativen Zellen fiel besonders das Pyrenoid auf, außerdem war eine geringe Zahl kleiner globulärer Einschlüsse erkennbar. Die Bewegung des Geißelschlags konnte vermutet werden (Abb. III.1.8A). Bei den Zygosporen wurden größere vesikuläre Strukturen beobachtet und die Zellwand erschien deutlich dicker als die der vegetativen Zellen (Abb. III.1.8B).

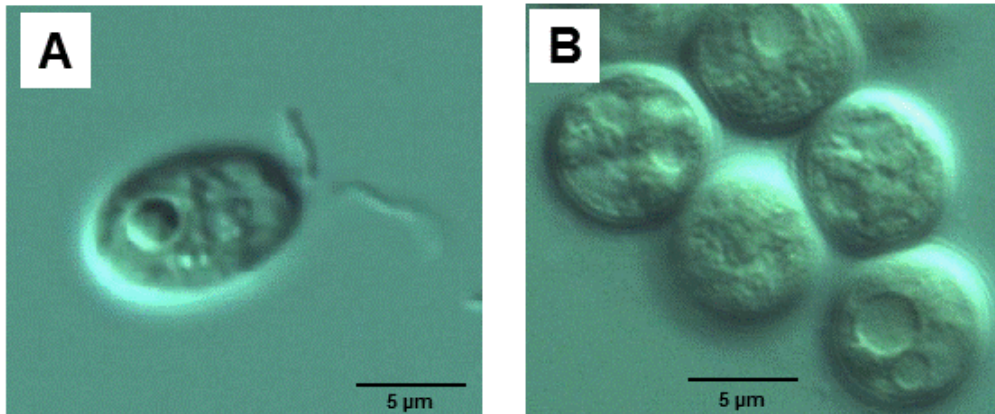


Abbildung III.1.8) DIK-Aufnahmen *C. reinhardtii*.

A: Vegetative Zelle, cc621 mt-; Standardanzucht,

B: Zygospore, cc620xcc621, 6 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatte gelagert.

Nach zweiwöchiger Dunkellagerung unter Stickstoffmangel zeigten sich bei DIK-mikroskopischer Betrachtung die ungepaarten Gameten voller globulärer Strukturen (Abb. III.1.9). Allerdings besaßen fast alle Zellen immer noch ihre Geißeln und die ovale Zellform war meist noch zu erkennen. Die Zellwand erschien aufgrund einer geringen Lichtbrechung weiterhin dünn. Somit konnten mittels mikroskopischer Untersuchungen Gameten und Zygoten gut unterschieden werden. Dies war, neben der unterschiedlichen Einbettung in den Agar, ein wichtiges Unterscheidungskriterium bei der Bestimmung des Zellstadiums.

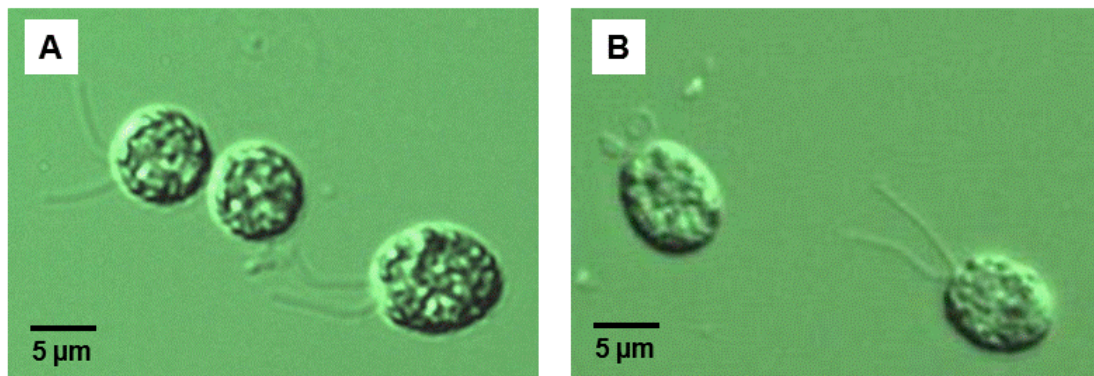


Abbildung III.1.9) DIK-Aufnahmen *C. reinhardtii*.

A: Gameten, cc620 mt-; 2 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatte gelagert,

B: Gameten, cc621 mt-; 2 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatte gelagert.

1.3. HPLC-Untersuchungen der Pigmente verschiedener Zellstadien

Aufgrund der unterschiedlichen Färbung der verschiedenen Zellstadien wurde eine Änderung der Pigmentzusammensetzung vermutet. Die orange Färbung der Zygoten war in Bezug auf ein mögliches Vorkommen an Ketocarotinoiden vielversprechend. Daher wurde bei der Pigmentanalyse der Zygosporen besonders auf neu auftretende Pigmente geachtet. Die Untersuchung erfolgte mittels HPLC und *on line*-Detektion der Absorptionsspektren der aufgetrennten Farbstoffe.

Für eine saubere Trennung von Zygosporen und ungepaarten Gameten wurden letztere zunächst von der Platte gespült und anschließend die eingesunkenen Zygosporen mit einem Zellschaber vom Agar entfernt und auf Glasfaserfilter übertragen. Bevor die Zellen aufgeschlossen wurden, konnte der Filter mit Methanol gespült werden (siehe Kapitel II.3.1.7). Zygosporen zeichneten sich durch die Fähigkeit aus, kurze Spülphasen mit Methanol ohne Pigmentverlust zu überdauern. Dies traf für die Gameten nicht zu. Durch Spülung der Zygosporen mit Methanol konnte daher sichergestellt werden, dass deren Pigmentextrakte keine Pigmente von ungepaarten Gameten mehr enthielten.

1.3.1. Vegetative Zellen und Zygosporen der Stämme CLS 31-8 x CLS 31-10

Vegetative Zellen zeigten eine für photosynthetisch aktive Grünalgen typische Pigmentzusammensetzung. Neben den Chlorophyllen a und b wurden größere Mengen an Lutein, β -Carotin sowie Neoxanthin und Violaxanthin gefunden. Kleinere Mengen von Antheraxanthin konnten ebenfalls detektiert werden (Abb. III.1.10 und Anhang III).

Bei der Untersuchung der Zygosporen wurde eine große Menge an neuen Analytenpeaks im HPLC-Chromatogramm gefunden. Alle Analytenpeaks wurden zunächst mit Hilfe ihrer Absorptionsspektren untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass alle neuen Pigmente für verschiedene Ketocarotinoide typische Absorptionsspektren aufwiesen. Sie wurden daher zu diesem Zeitpunkt mit „Ketolike“ bezeichnet. Mit Hilfe der unter Kapitel III.2 beschriebenen Methoden wurden die neuen Pigmente auf verschiedene Art und Weise weiter charakterisiert.

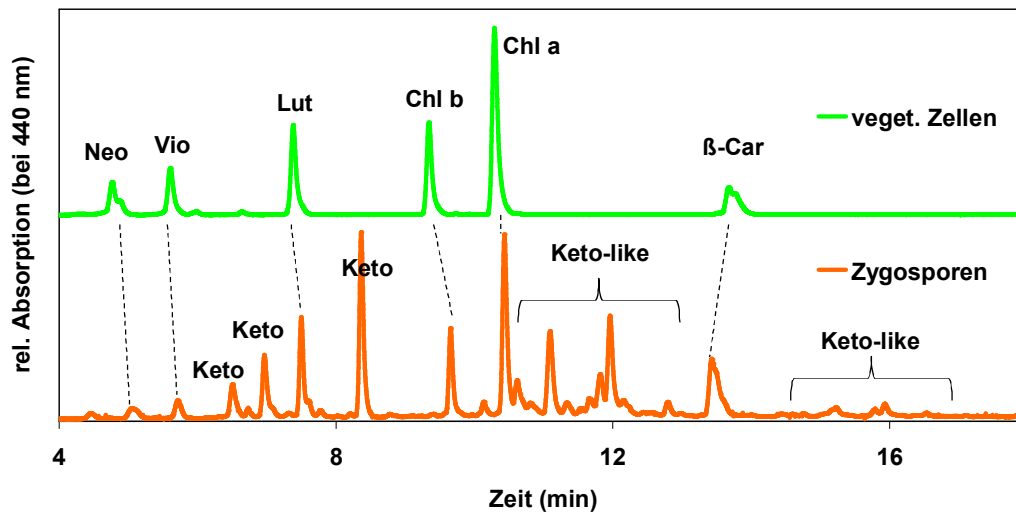


Abbildung III.1.10) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten vegetativer Zellen und Zygosporen von *C. reinhardtii*.
 Vegetative Zellen: CLS 31-8 mt-, 6 Tage alt, Standardanzucht,
 Zygosporen: CLS 31-8 mt+ x CLS 31-8 mt -; 6 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatte gelagert, HPLC-Gradient 3.

Dabei zeigte sich, dass viele der neuen Pigmentpeaks gleiche oder zumindest sehr ähnliche Absorptionsspektren aufwiesen.

1.3.2. Vegetative Zellen, Gameten und Zygosporen der Stämme cc620 x cc621

Die vegetativen Zellen der Stämme cc620 und cc621 wiesen eine für Grünalgen typische Pigmentzusammensetzung auf (Abb. III.1.12 und Anhang zu Ergebnissen) und ähnelte damit den Stämmen CLS 31-10 und CLS 31-8 sehr.

Neben den vegetativen Zellen wurde für diese Stämme auch die qualitative Pigmentzusammensetzung von jungen sowie gealterten Gameten untersucht (Abb. III.1.11). Bei den jungen Gameten handelte es sich um Zellen, die nach 24 Stunden im Licht unter Stickstoffzug gerade die Gameteninduktion abgeschlossen hatten. Die gealterten Gameten stammten von TAP-N-Platten, die für 33 Tage bei 22 °C im Dunkeln gelagert worden waren.

Die jungen Gameten besaßen erwartungsgemäß eine sehr ähnliche Pigmentzusammensetzung wie vegetative Zellen. Während der mehrwöchigen Dunkelinkubation verschob sich allerdings das Verhältnis von Chlorophyllen und Carotinoiden deutlich in Richtung der Carotinoide. In keinem Fall wurde eine Synthese von Ketocarotinoiden beobachtet.

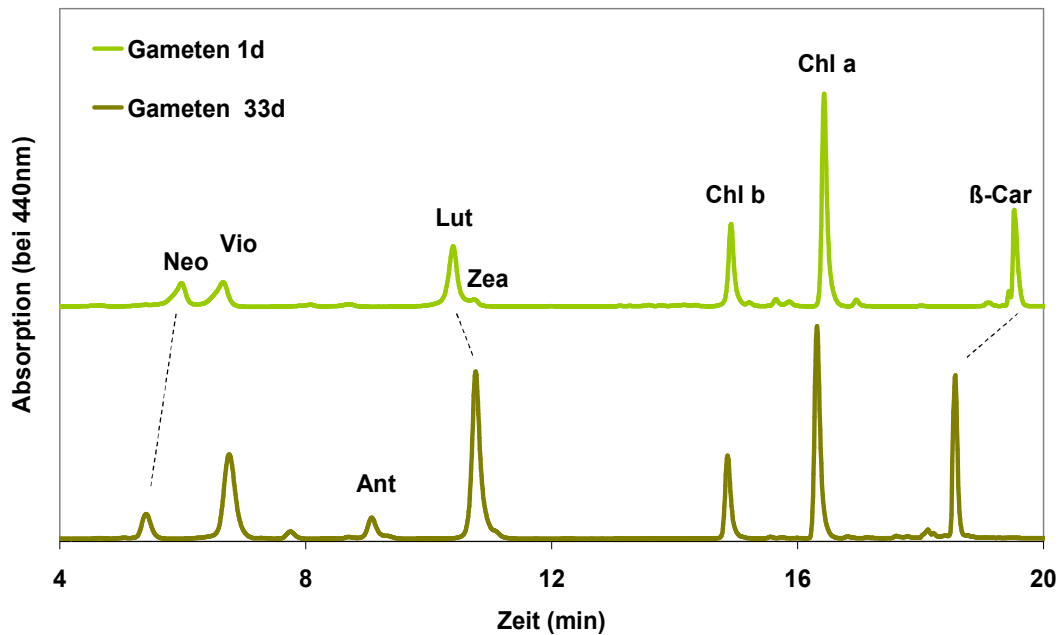


Abbildung III.1.11) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten dunkel gelagerter Gameten von *C. reinhardtii*. Gameten cc621 mt-, 1 Tag bei 22 °C im Dunkeln gelagert auf TAP-N-Platten, Gameten cc621 mt-, 33 Tage bei 22 °C im Dunkeln gelagert auf TAP-N-Platten, HPLC-Gradient 1b.

Im Gegensatz zu den Gameten, bei denen im Vergleich zu den vegetativen Zellen keine weiteren Pigmente detektiert wurden, konnten bei den Zygosporen zahlreiche neue Pigmente beobachtet werden (Abb. III.1.12). Diese wiesen die für Ketocarotinoide typischen Absorptionsspektren auf. Das Pigmentmuster dieser Zygosporen ähnelte dem der Zygosporen aus der Paarung von CLS 31-10 x CLS 31-8 sehr.

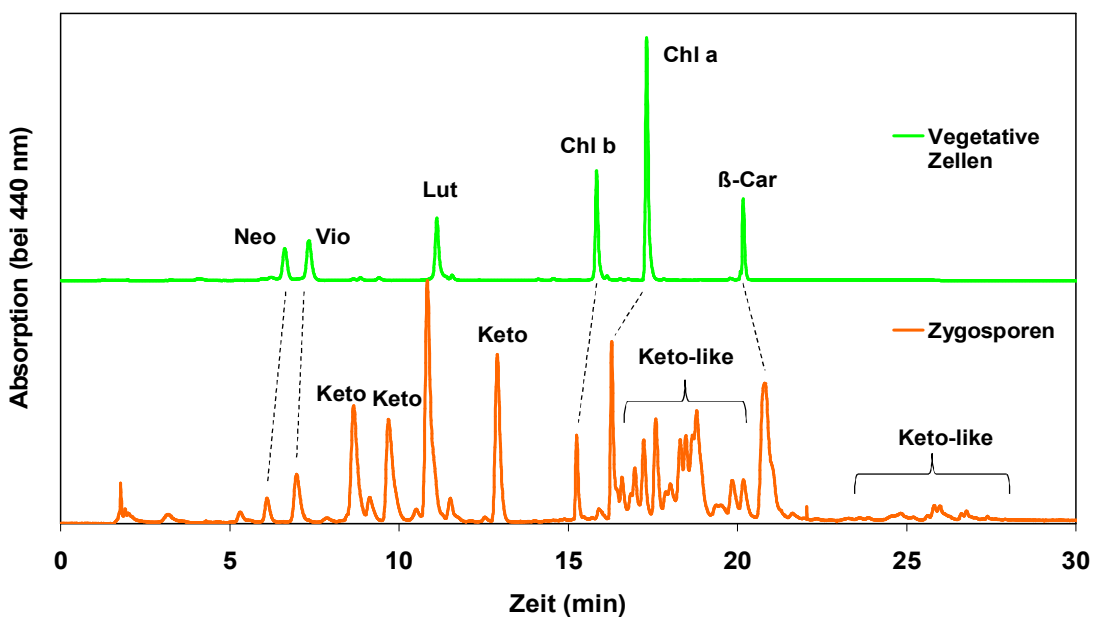


Abbildung III.1.12) HPLC-Chromogramme von Pigmentextrakten vegetativer Zellen und Zygosporen von *C. reinhardtii*. Vegetative Zellen: cc621 mt+, 6 Tage alt, Standardanzucht, Zygoten: cc 620 mt+ x cc 621 mt- ; 3 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatte gelagert, HPLC-Gradient 2.

2. Nachweis der Identität der Ketocarotinoide aus Zygosporen von *C. reinhardtii*

Wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt wurde, traten in den Pigmentuntersuchungen von Zygosporen mittels HPLC eine Reihe von neuen Pigmentpeaks auf. Diese neuen Pigmente wurden mit Hilfe verschiedener Verfahren analysiert, um Ihre Identität zu bestimmen.

Dazu wurden neben Vergleichen mit Referenzpigmenten auch spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die chemische Reduktion der potentiellen Ketocarotinoide sollte weitere Hinweise auf ihre Identität liefern. Außerdem wurde mittels MS-Experimenten die Masse ausgewählter Pigmente bestimmt.

Aufgrund von späteren Untersuchung durch Bauch (2007) sowie Literaturvergleiche (Johnson und An 1991), gepaart mit massenspektrometrischen Untersuchungen (Kapitel III.2.5) wurden die neuen Pigmente in drei Kategorien unterteilt: Freie Pigmente, Pigmente mit einer Fettsäure verestert (sog. Monoacyl ester) und Pigment mit zwei Fettsäuren verestert (sog. Diacyl ester).

Folglich wurde als Erstes die Identität der freien Pigmente bestimmt, da diese die Basis für die Ketocarotinoid-Fettsäure-Ester darstellen sollten (Kapitel III.2.7). Anschließend wurden diese Ester genauer bestimmt.

2.1. Die vorläufige Identifizierung von Astaxanthin und Canthaxanthin anhand Referenzpigmenten

2.1.1. Retentionszeiten als erstes Nachweiskriterium

Einen ersten Hinweis auf die Identität der neuen Pigmente lieferte ein Vergleich mit kommerziell erhältlichen Referenzpigmenten. Diese waren für die Farbstoffe Astaxanthin und Canthaxanthin erhältlich. Sie wurden freundlicherweise von Stefan Tresch, BASF, zur Verfügung gestellt.

Bei vergleichbaren HPLC-Messungen zeigten sich gleiche Auftrennungseigenschaften, d.h. es wurden gleiche Laufzeiten und gleiche Absorptionseigenschaften der Referenzpigmente sowie der vorläufig identifizierten Pigmente auf dem verwendeten HPLC-System nachgewiesen (Abb. III.2.1).

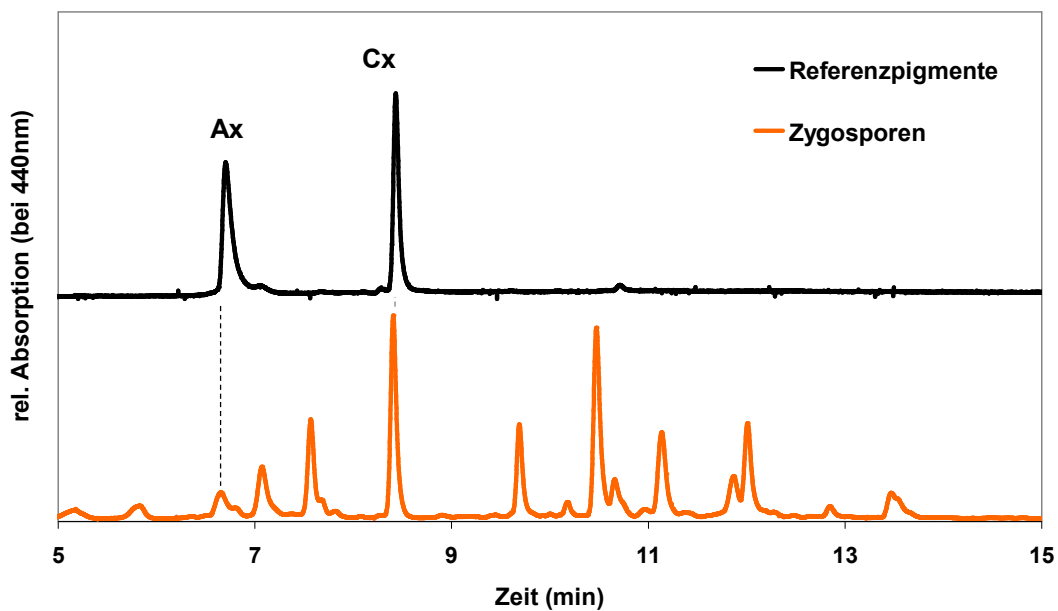


Abbildung III.2.1) HPLC-Chromatogramm einer Referenzpigmentmischung von Astaxanthin und Canthaxanthin (BASF) sowie als Vergleich ein HPLC-Chromatogramm eines Zygosporenpigment-extraktes: Stämme CLS 31-10 x CLS 31-8, 8 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert, HPLC-Gradient 3.

Dies wurde als erster Hinweis für die Identität von zwei der neuen Zygosporenpigmente gewertet.

2.1.2. Zygoten- und Referenzpigmente besitzen die gleichen Absorptionseigenschaften

Nachdem die Retentionszeiten einen ersten Anhaltspunkt für die Identität der neuen Pigmente geliefert hatten, wurden im Anschluss die Absorptionsspektren der Referenz- und der Zygosporenpigmente verglichen. Dazu wurden die *on line*-Messung im HPLC-System mittels Photodiodenarraydetektor sowie photometrische Untersuchungen verwendet.

Canthaxanthin und Astaxanthin wiesen sehr ähnliche Absorptionsspektren auf (Abb. III.2.2 und III.2.3). Beide besaßen nur ein Maximum bei 478 bzw. 479 nm und waren im Vergleich zu anderen Carotinoiden in einen längerwelligen Bereich verschoben. Verantwortlich für die Ähnlichkeit der spektralen Eigenschaften ist das gleiche Chromophor dieser beiden Pigmente. Die zweifache Hydroxylierung an den Positionen 3 und 3' der β -Iononringe des Astaxanthins führt zu keiner Änderung des absorbierenden Doppelbindungssystems.

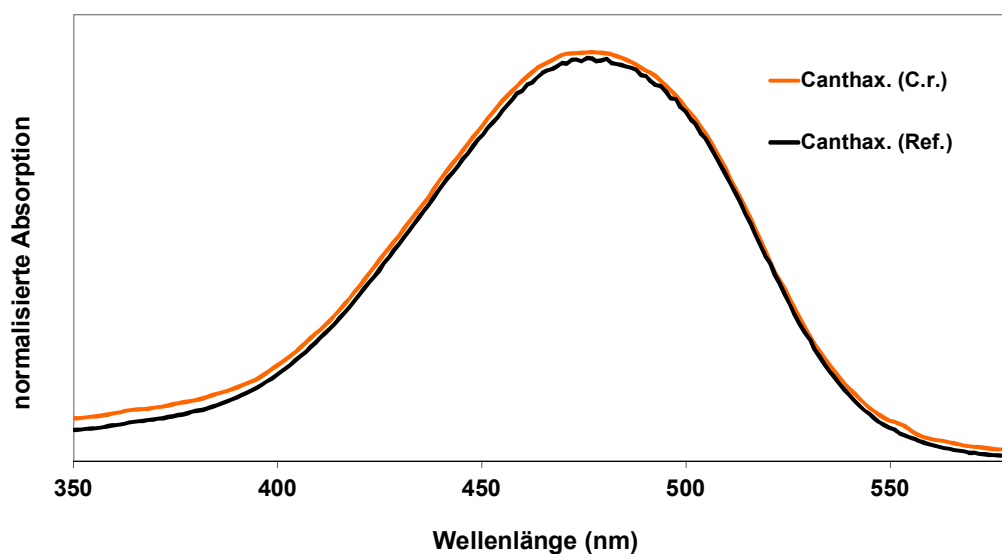


Abbildung III.2.2) Absorptionsspektren von Canthaxanthin (orange: nativ aus *C. reinhardtii*, schwarz: Referenzpigment).

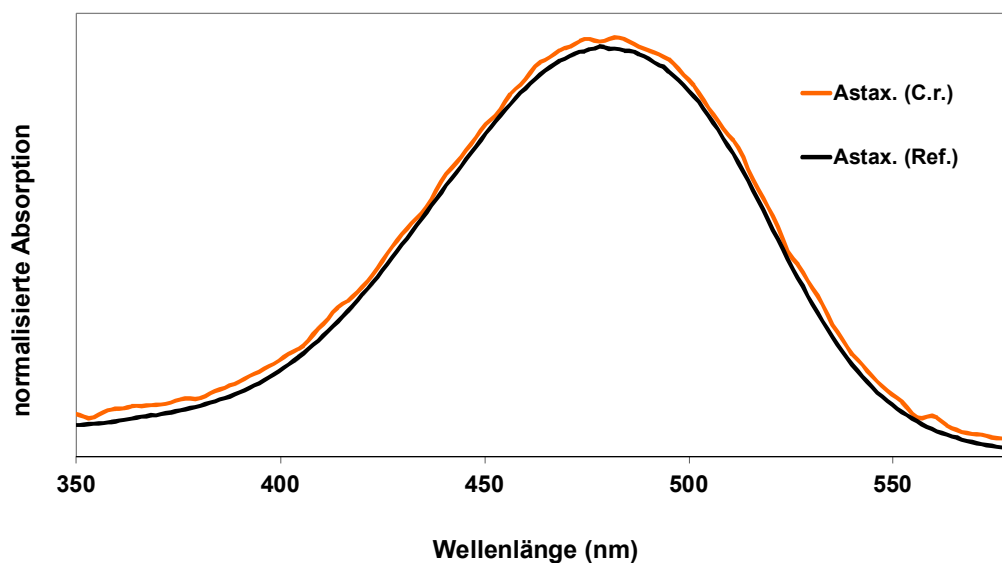


Abbildung III.2.3) Absorptionsspektren von Astaxanthin (orange: nativ aus *C. reinhardtii*, schwarz: Referenzpigment).

2.2. Vorläufige Identifizierung des 4-Ketoluteins

Trotz der großen Anzahl an neuen Pigmenten traten bei deren Untersuchungen nur zwei wesentliche Spektrentypen auf. Neben dem für Astaxanthin und Canthaxanthin typischen Spektrum mit einem Maximum wurde ein weiterer Typ gefunden. Dieser zeichnete sich durch zwei relativ langwellige Maxima aus, die durch ein sehr schwaches Tal miteinander verbunden waren (Abb. III.2.4). Die Maxima lagen bei 456 und 472 nm. Aufgrund der Retentionszeit, die sehr ähnlich zu Astaxanthin war, und Literaturvergleiche (Britton 2004), wurde es vorläufig als 4-Ketolutein bezeichnet.

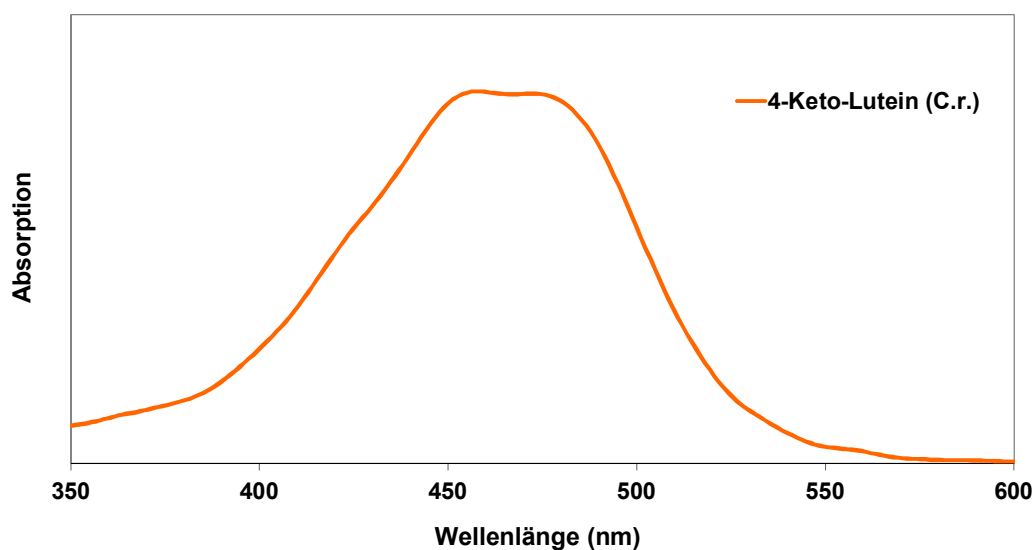


Abbildung III.2.4) Absorptionsspektrum 4-Ketolutein nativ aus *C. reinhardtii*.

2.3. Die Ketocarotinoide liegen sowohl in der *all-trans*- als auch in der *cis*-Konformation vor

Bei spektroskopischen Untersuchungen der Ketocarotinoide im UV-Bereich des Lichtes wurden jeweils mehrere Untergruppen von Astaxanthin, Canthaxanthin und 4-Ketolutein detektiert. Eine Gruppe wies eine weitere Absorptionsschulter im UV-Bereich auf und wurde als Gruppe der *cis*-Isomere bezeichnet (Abb. III.2.5, III.2.6 und III.2.7). Spektren von *cis*-Isomeren sind leicht in den kürzerwelligen Bereich verschoben und unterscheiden sich von *all-trans*-Carotinoiden in einem zusätzlichen Peak, der etwa 140 nm unterhalb des langwelligsten Maximums absorbiert (Britton 2004). Da die Maxima der untersuchten Ketocarotinoide bei etwa 470 nm lagen, wurde der weitere *cis*-Peak im UV-Bereich detektiert. Pigmente ohne eine solche Absorption wurden der *all-trans*-Konformation zugeordnet.

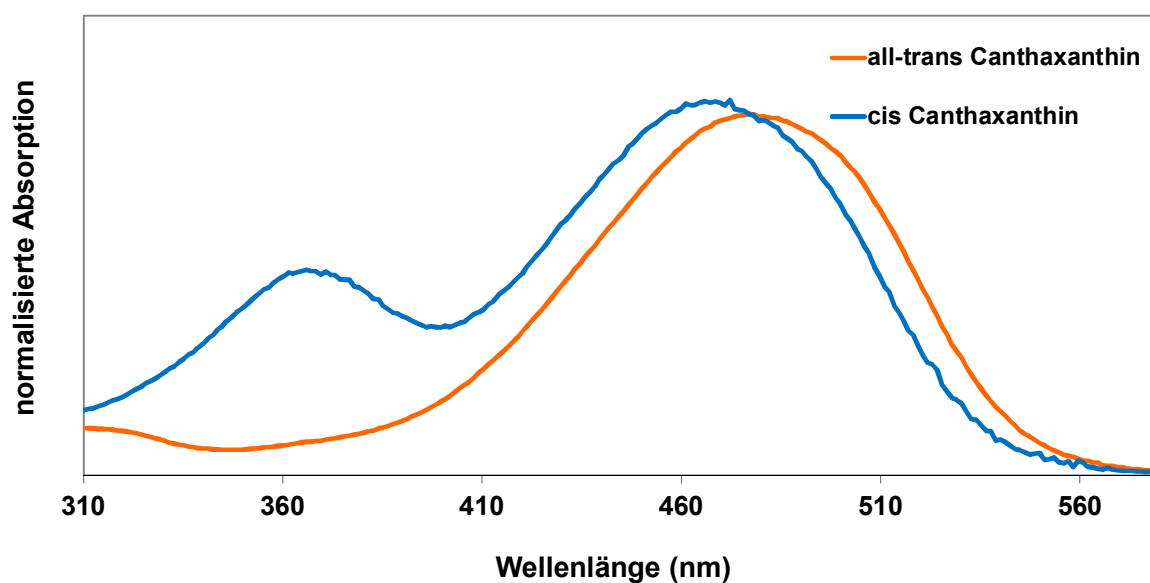


Abbildung III.2.5) Absorptionsspektren von Canthaxanthin aus *C. reinhardtii* in der *all-trans*- sowie der *cis*-Konformation.

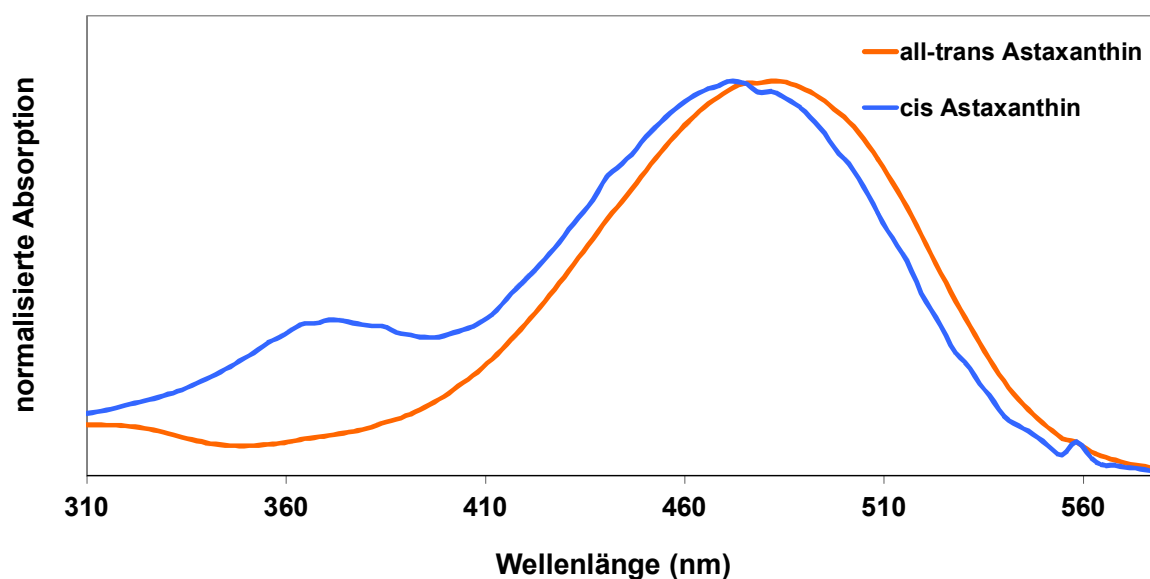


Abbildung III.2.6) Absorptionsspektren von Astaxanthin aus *C. reinhardtii* in der *all-trans*- sowie der *cis*-Konformation.

Bei 4-Ketolutein wurden zwei verschiedene Spektren detektiert, die beide eine Absorption im UV-Bereich zeigten und folglich beide der *cis*-Konformation zugeordnet wurden (Abb. III.2.7). Sie unterschieden sich leicht in der Höhe des zweiten Maximums.

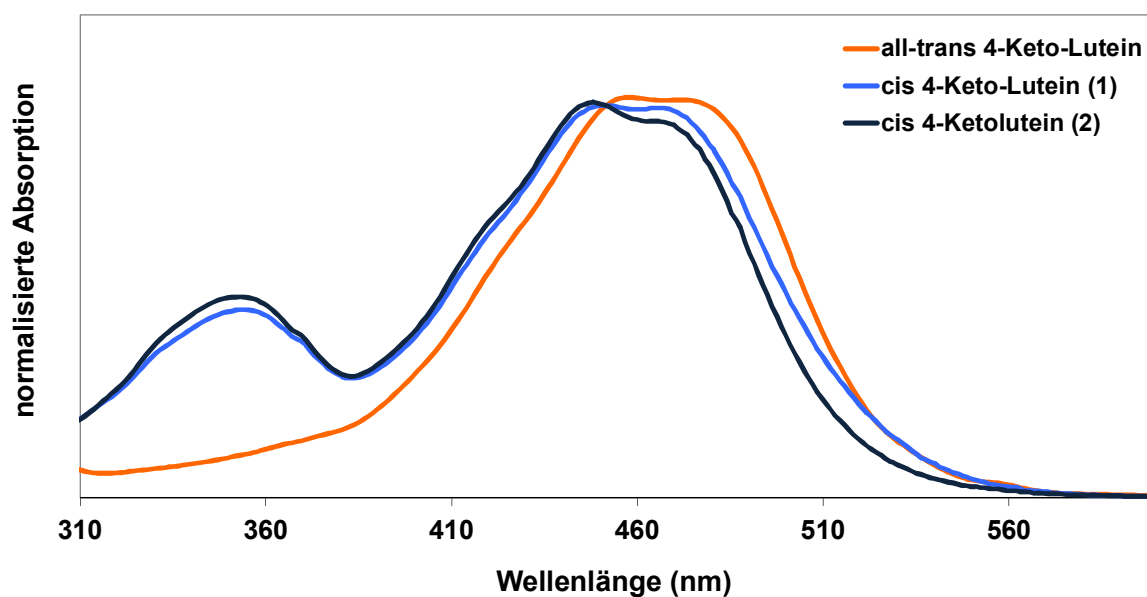


Abbildung III.2.7) Absorptionsspektren von 4-Ketolutein aus *C. reinhardtii* in der *all-trans*- sowie in zwei *cis*-Konformationen.

2.4. Chemische Reduktion der Pigmente

Als weitere Untersuchungsmethode wurde die chemische Reduktion der Ketocarotinoide mittels NaBH_4 angewendet. Sie diente in anderen Forschungsarbeiten bereits als Nachweismethode für in Pflanzen detektiertes 4-Ketolutein (Stålberg et al. 2003). Bei diesem Versuchsaufbau wird die Carbonylgruppe der Ketobindung an der C4-Position im β -Iononring selektiv reduziert. Die Folge ist der Verlust einer konjugierten Doppelbindung des π -Elektronensystems und damit die Änderung des Absorptionsspektrums hin zum nicht oxygenierten Produkt (Britton 2004). Je nach Anzahl der Ketogruppen des Pigmentes konnten ein oder zwei Carbonylgruppen reduziert und folglich zwei Produkte mit unterschiedlichen Absorptionsspektren identifiziert werden.

Zunächst wurden die Pigmente Canthaxanthin und Astaxanthin reduziert, um weitere Hinweise auf deren Identität zu erhalten.

Die chemische Reduktion von Canthaxanthin führte zu zwei neuen Produkten, die mittels HPLC aufgetrennt werden konnten (Abb. III.2.8). Durch die Reduktion besitzen die reduzierten Pigmente polarere Eigenschaften und eluierten somit früher von der Säule (reverse-phase Verfahren). Dabei ist die Polarität abhängig von der Anzahl der reduzierten Ketogruppen im Pigment.

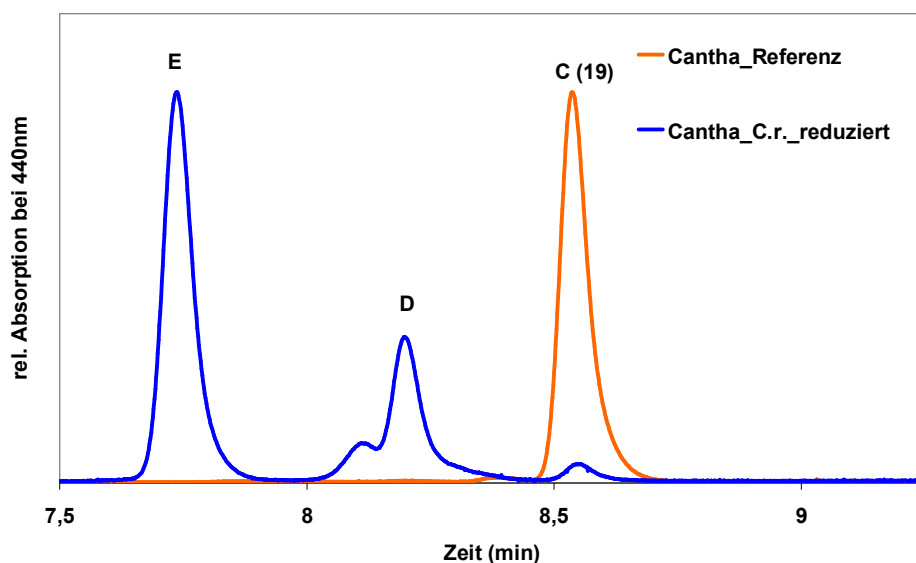


Abbildung III.2.8) HPLC-Chromatogramme von nativem sowie reduziertem Canthaxanthin, orange: Referenzpigment (BASF), blau: nativ aus *C. reinhardtii* isoliertes und reduziertes Pigment, C: Canthaxanthin, D: putatives 4-Hydroxyechinenon, E: putatives Isozeaxanthin.

Die Reduktion von Canthaxanthin führte zu einem Verlust des Ketocarotinoid-typischen Spektrums hin zu einem β -Carotin-ähnlichen Spektrum (Abb. III.2.9). Wahrscheinlich handelt es sich beim zugehörigen Pigment um Isozeaxanthin. Es wies Maxima bei 454 und 481 nm auf, mit einem III/II-Verhältnis von 0,38. Zusätzlich konnte ein Zwischenprodukt beobachtet werden, dessen Retentionszeit und Absorptionsspektrum für das Vorliegen des erwarteten Monoreduktionsproduktes 4-Hydroxyechinenon sprechen. Dieses Ergebnis wurde zunächst für das Referenzpigment, später für natives, aus *C. reinhardtii* isoliertes Pigment erhalten.

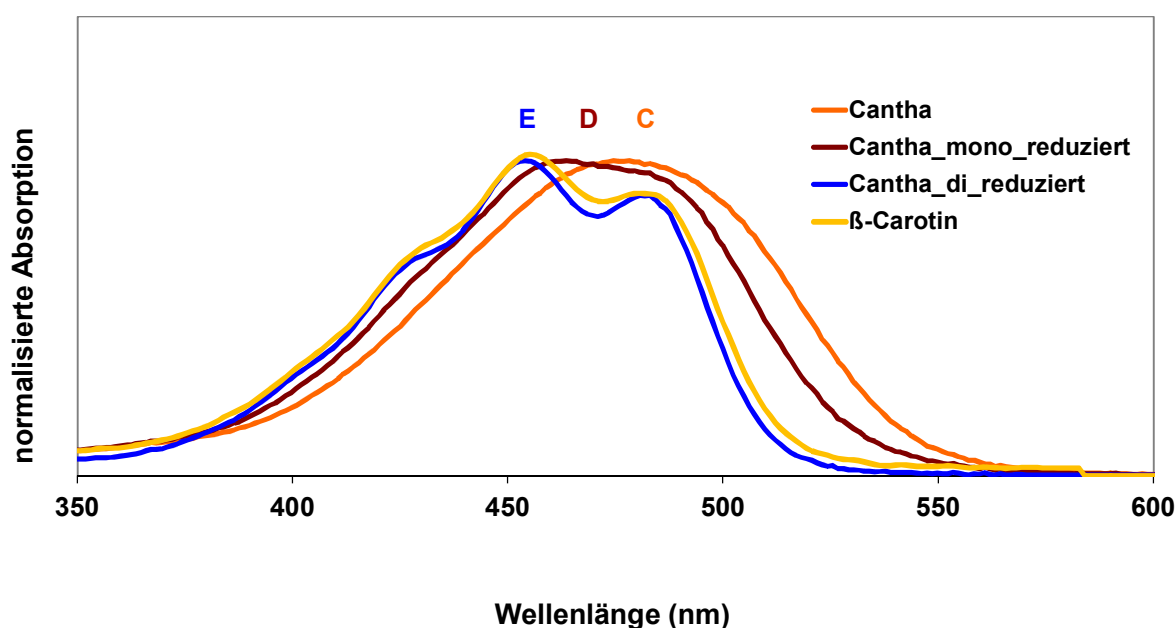


Abbildung III.2.9) Absorptionsspektrum von nativem und mono- sowie di-reduziertem Canthaxanthin und nativem β -Carotin, C: Canthaxanthin, D: putatives 4-Hydroxyechinenon, E: putatives Isozeaxanthin.

Die Reduktion von Astaxanthin führte ebenfalls zu zwei neuen Produkten, die mittels HPLC aufgetrennt werden konnten (Abb. III.2.10).

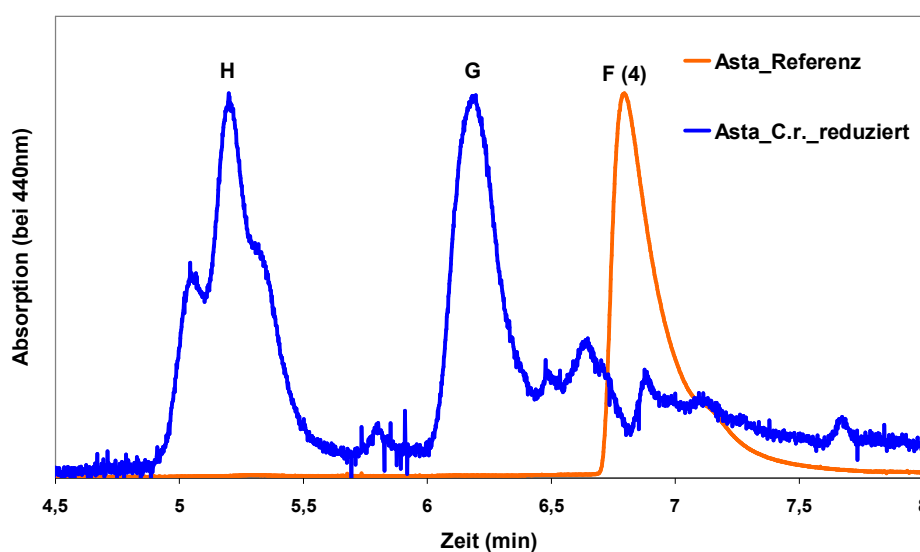


Abbildung III.2.10) HPLC-Chromatogramme von nativem sowie reduziertem Astaxanthin, orange: Referenzpigment (BASF), blau: nativ aus *C. reinhardtii* isoliertes und reduziertes Pigment, F: Astaxanthin, G: putatives Idoxanthin, H: putatives Crustaxanthin.

Die Reduktion von Astaxanthin führte zu einem Pigment, das vergleichbare spektrale Eigenschaften wie β -Carotin hatte. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Crustaxanthin. Es weist ähnliche Absorptionseigenschaften auf wie das Canthaxanthin-di-Reduktionsprodukt Isozeaxanthin (Abb. III.2.11). Die Maxima lagen bei 453 und 481 nm mit einem III/II-Verhältnis von 0,41. Auch bei Astaxanthin wurde dieses Ergebnis sowohl für das Referenzpigment als auch für natives, aus *C. reinhardtii* isoliertes Pigment erhalten.

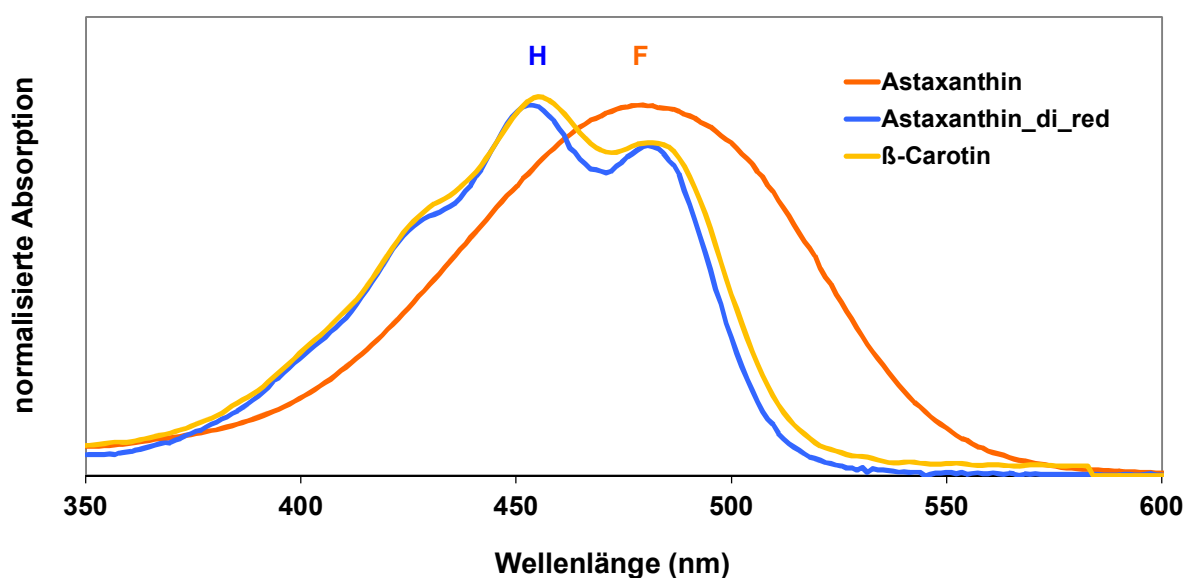


Abbildung III.2.11) Absorptionsspektren von nativem und di-reduziertem Astaxanthin sowie nativem β -Carotin, F: Astaxanthin, H: putatives Crustaxanthin.

Für Astaxanthin und Canthaxanthin konnten jeweils eine mono-reduzierte sowie eine di-reduzierte Form gefunden werden (Abb. III.2.8 und III.2.10), für 4-Ketolutein nur eine Mono-reduzierte Form (Abb. III.2.12). Dies korreliert mit der Anzahl der zu erwartenden Produkte. Da 4-Ketolutein nur eine Ketogruppe besitzt, konnte nur ein einzelnes Reduktionsprodukt erwartet werden. Astaxanthin und Canthaxanthin besitzen jeweils zwei Ketogruppen, die einzeln oder nacheinander reduziert werden können.

Nach der Reduktion von 4-Ketolutein wurde im HPLC-Chromatogramm nur ein weiteres Pigment detektiert. Das sprach dafür, dass das Pigment nur eine Ketogruppe besaß, wie dies für 4-Ketolutein auch vermutet wurde.

Bei diesem Experiment waren leichte Kontaminationen des nativ abgefangenen 4-Ketoluteins durch Astaxanthin vorhanden, so dass auch dieses in Folge des Experimentes reduziert wurde und folglich mit im HPLC-Chromatogramm sichtbar ist.

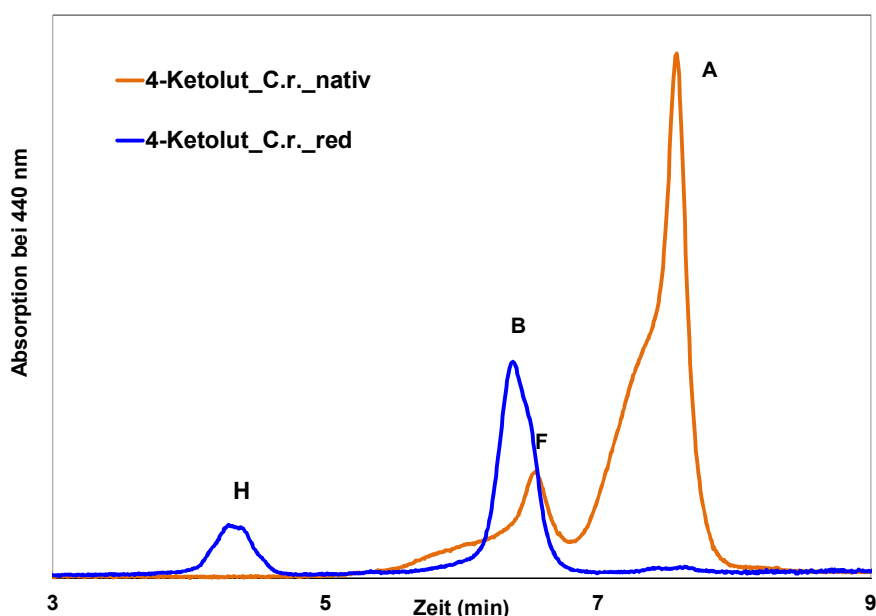


Abbildung III.2.12) HPLC-Chromatogramme von nativem und reduziertem 4-Ketolutein, orange: nativ aus *C. reinhardtii* isoliertes Pigment, blau: nativ aus *C. reinhardtii* isoliertes sowie reduziertes Pigment, A: 4-Ketolutein, B: 4-Hydroxylutein, F: Kontamination mit nativem Astaxanthin, H: di-reduziertes Astaxanthin putatives Crustaxanthin, Schulterbildung an A und F: Lösungsmittelartefakt – die Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften der Peaks zeigte keiner Kontamination mit weiteren Pigmenten.

Bei der Reduktion von 4-Ketolutein wurde ein Lutein-ähnliches Spektrum gefunden (Abb. III.2.13). Es wies drei Maxima bei 425, 448 und 476 nm mit einem III/II-Verhältnis von 0,70 auf. Für Lutein wurden Maxima bei 427, 448 und 477 nm gefunden und ein III/II-Verhältnis von 0,67.

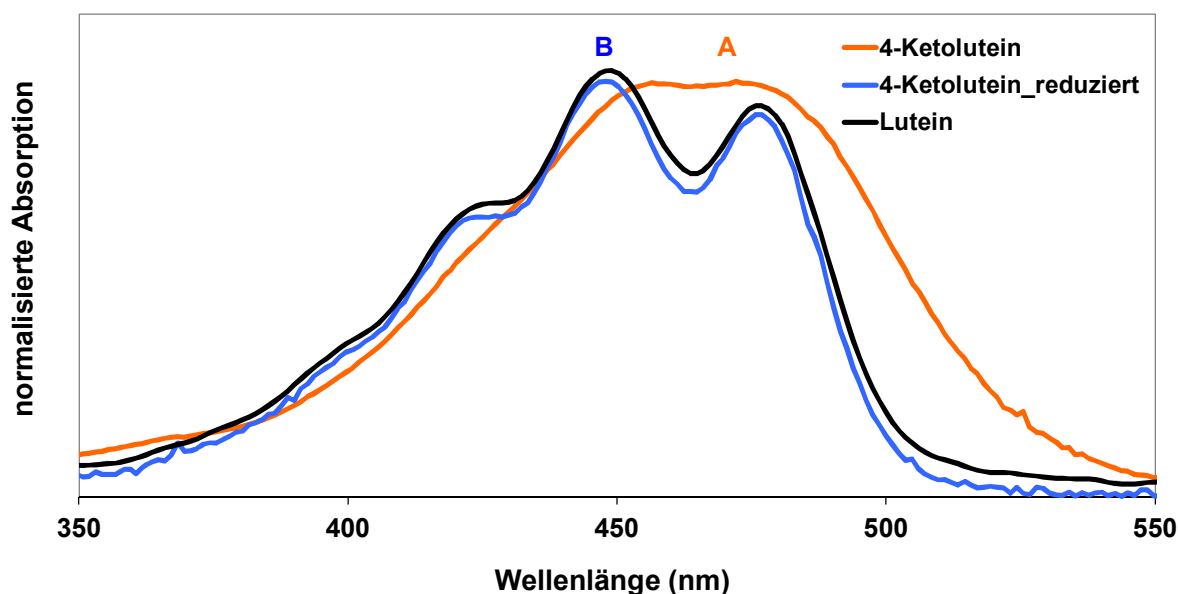


Abbildung III.2.13) Absorptionsspektren von nativem und reduziertem 4-Ketolutein sowie nativem Lutein, A: 4-Ketolutein, B: 4-Hydroxylutein.

2.5. Massenspektroskopische Untersuchung der unbekannt Pigmente

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden die Peaks der Pigmente Astaxanthin, 4-Ketolutein, Lutein und Canthaxanthin aus HPLC-Läufen abgefangen, aufgereinigt und mittels LC/MS untersucht (siehe Kapitel II.3.2). Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten bei der Firma BASF mit freundlicher Unterstützung von Stefan Tresch.

Da nur positive Ionen detektiert wurden, war für die Pigmente Astaxanthin und Canthaxanthin die Masse $M + 1$ zu erwarten, hervorgerufen durch die Ionisierung nach Anlagerung eines Protons. Wie aus Tab. III.2.1 ersichtlich, wies für beide Pigmente der jeweils dominierende Ionenpeak die erwartete Masse auf.

Für Lutein wurde eine Masse von $M - 18 + 1$ erwartet. Diese Reduktion der Masse um 18 erfolgt aufgrund der Abspaltung der OH-Gruppe des ϵ -Iononringes bei der APCI-Ionisierung. Dieses Phänomen wurde u.a. von Aman und Kollegen (Aman et al. 2005) beschrieben und zeigte sich ebenso für die hier erfolgte Untersuchung von Lutein.

Für das vorläufig als 4-Ketolutein identifizierte Pigment wurde folglich ebenfalls eine Reduktion der Masse um 17 erwartet. Diese Masse wurde bei der Untersuchung des Pigmentes erhalten und lieferte einen weiteren Beleg für die Identität des 4-Ketoluteins.

Peak	Rt [min]	Pigment	Masse		entspricht
			theor.	gemessen	
1a	10,9	Astaxanthin	597,394	597,399	M+1
1b	11,5	4-Ketolutein	565,405	565,409	[M-18]+1
2	13	Lutein	551,425	551,426	[M-18]+1
3	15,1	Canthaxanthin	565,405	565,409	M+1

Tabelle III.2.1) Übersicht über die massenspektroskopisch untersuchten Pigmente aus *C. reinhardtii*, abgefangen aus Zygosporenextrakten und anschließend mittels LC/MS die Masse bestimmt. Zygosporen: cc621xcc620, 6 Wochen lang bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert.

Mit Hilfe der verschiedenen Methoden wurde die Identität dieser drei Ketocarotinoide bestimmt. Diese wurden früh im HPLC-Chromatogramm detektiert und besaßen somit vergleichsweise polare Eigenschaften. Daneben fanden sich sehr viele Peaks mit für Ketocarotinoide typischen Spektren, die aber viel später im Chromatogramm zu finden waren. Dies sprach für deutlich unpolare Eigenschaften. Daher wurde zu Vergleichszwecken ein Organismus herangezogen, der in der Literatur hinreichend auf sein Ketocarotinoidvorkommen untersucht und beschrieben wurde.

2.6. Ketocarotinoidvorkommen in *Haematococcus pluvialis*

Neben den Referenzpigmenten wurde auch der für seine ketocarotinoidakkumulierende Eigenschaft bekannte Organismus *H. pluvialis* zur Pigmentidentifikation herangezogen. *H. pluvialis* ist eine einzellige Grünalge, deren vegetative, grüne Zellen sich unter wachstumslimitierenden Umweltbedingungen zu kräftig rot gefärbten Aplanosporen (Abb. III.2.14) umwandeln.

Dabei dienten zum einen die für diese Art beschriebenen Ketocarotinoide als weiterer Beleg für die Pigmentidentität der in *C. reinhardtii* neu entdeckten Ketocarotinoide. Des Weiteren wurden mit ihm Untersuchungen zur Bestimmung der zahlreichen unpolaren Pigmente mit Ketocarotinoid-ähnlichen Absorptionsspektren in den Zygosporen durchgeführt.

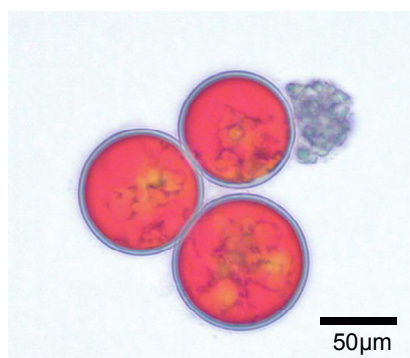


Abbildung III.2.14) Lichtmikroskopische Aufnahmen *Haematococcus pluvialis* Aplanosporen, SAG 192.80, aus einer 6 Monate alten Standkultur bei 18 °C.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Aplanosporenbildung durch eine mehrwöchige Inkubation in Desmidiaceenmedium ohne Zugabe von neuen Nährstoffen induziert.

Bei den Pigmentuntersuchungen von *H. pluvialis* mittels HPLC wurden neben den PS-Carotinoiden Peaks mit Astaxanthin- und Canthaxanthin-Spektrum detektiert. Das in *C. reinhardtii* beobachtete 4-Ketolutein wurde nicht gefunden.

Dabei traten, wie auch in *C. reinhardtii*, zwei verschiedenere Isomere der Ketocarotinoide auf. Canthaxanthin und Astaxanthin wurden sowohl in der *all-trans*- wie auch in der *cis*-Konformation detektiert.

Die Ketocarotinoidspektren wurden überwiegend bei Pigmenten mit einem unpolaren Laufverhalten beobachtet und wenig bei Pigmenten, die früh im HPLC-Chromatogramm auftraten (Abb. III.2.15). Das Ketocarotinoidvorkommen in *H. pluvialis* ist in der Literatur detailliert beschrieben (u.a. Lemoine und Schoeffs 2010). Für diesen Organismus wurde nachgewiesen, dass Astaxanthin wenig als freies Pigment vorkommt (<1 %), sondern sehr häufig mit Fettsäuren verestert vorliegt (zu 99 %). Dabei kann ein β -Iononring mit einer Fettsäure verestert werden oder beiden β -Iononringe mit jeweils einer Fettsäure. Je nach Anzahl der Ester spricht man von einem Monoacyl-Ketocarotinoid-Ester oder von einem Diacyl-Ketocarotinoid-Ester.

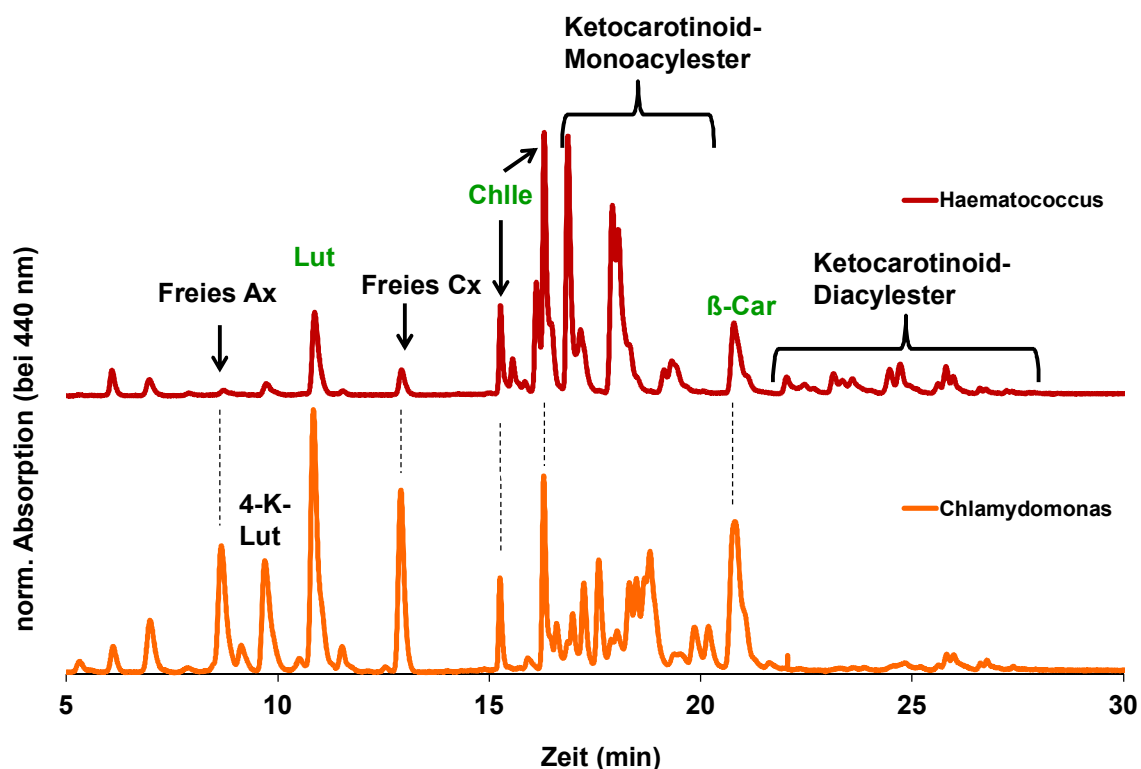


Abbildung III.2.15) HPLC-Chromatogramme der Pigmentextrakte von Aplanosporen von *H. pluvialis* und Zygosporen von *C. reinhardtii*.
 H.p.: SAG 192-80; 6 Monate alte Standkultur bei 18 °C,
 C.r.: Zygosporen cc620 mt+ x cc621 mt-; 3 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert
 HPLC-Gradient 2.

Die Pigmentpeaks mit Retentionszeiten von 16-20 min wurden literaturkonform (Breithaupt 2007, Miao et al. 2006) als Monoacyl ester und Pigmentpeaks zwischen 22 und 28 min als Diacyl ester bezeichnet.

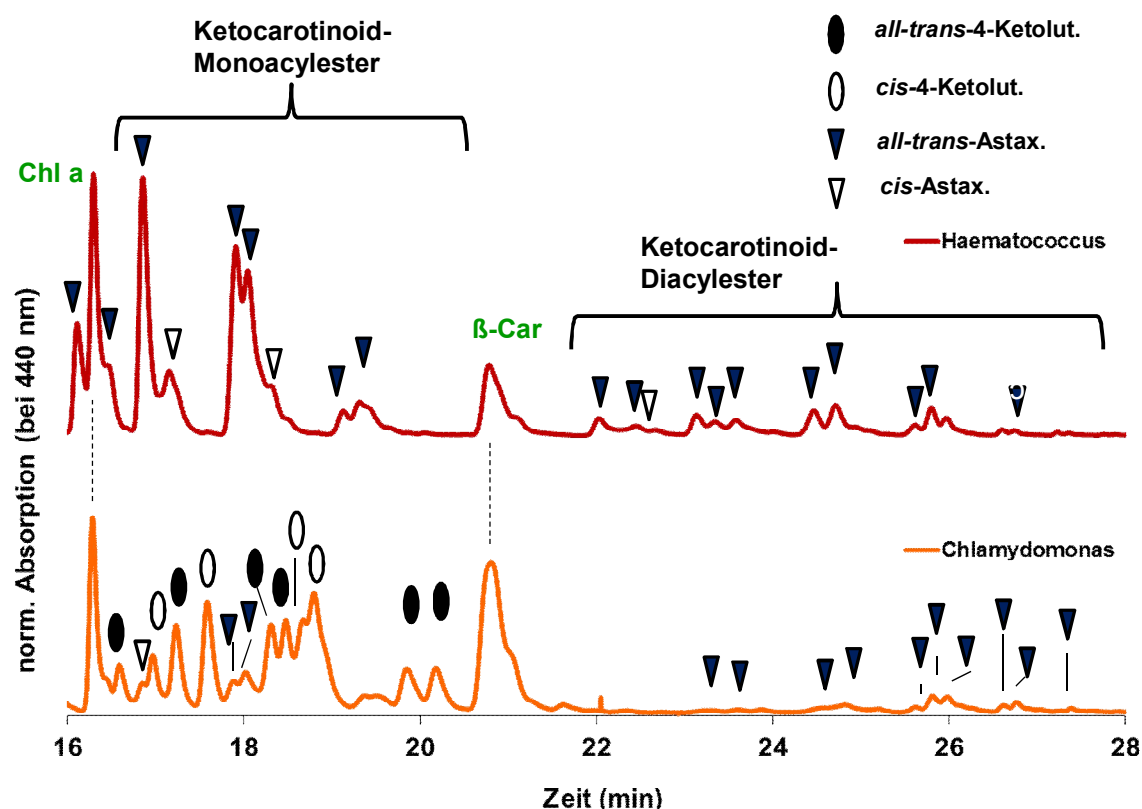


Abbildung III.2.16) Ausschnitt aus Abb. III.2.15: HPLC-Chromatogrammen der Pigmentextrakte von Aplanosporen von *H. pluvialis* und Zygosporen von *C. reinhardtii*, Esterfraktionen.

Bei genauerer Analyse der Pigmentverhältnisse in *H. pluvialis* zeigte sich, dass in den untersuchten Aplanosporen der Ketocarotinoidanteil mehr als zwei Drittel des Gesamtpigmentanteils betrug (Tab. III.2.2). Dabei waren nur sehr geringe Mengen an α -Carotinoid-Derivaten zu finden, die überwiegende Mehrheit waren Pigmente mit β -Carotin-Ursprung. Das Verhältnis von β -Carotinoiden zu α -Carotinoiden betrug etwa 20:1.

Unter den Ketocarotinoiden stellte Astaxanthin das dominierende Pigment mit einem Anteil von 98 % dar. Als weiteres Ketocarotinoid fand sich lediglich Canthaxanthin, das als Synthesevorstufe des Astaxanthins angesehen wird und aufgrund fehlender Hydroxygruppen nicht mit Fettsäuren verestert werden kann.

		<i>H. pluvialis</i> Aplanosporen (Anteil in %)	<i>C. reinhardtii</i> Zygosporen (Anteil in %)
Chlorophylle	Chl a	16,5	7,3
	Chl b	4,7	1,7
PS-Carotinoide	Lutein	3,7	2,1
	beta-Carotin	6,0	11,4
	Violaxanthin	0,6	1,0
	Antheraxanthin	-	1,5
	Zeaxanthin	0,1	0,4
	Neoxanthin	0,8	1,1
Ketocarotinoide	4-Ketolutein	-	6,9
	4-K-Lut-Monoester	-	41,8
	Astaxanthin	0,3	8,6
	Asta-Monoester	51,9	0,1
	Asta-Diester	13,9	6,1
	Canthaxanthin	1,4	10,0
Summe		100	100
Verhältnis	β- zu α-Carotinoiden	20,3 : 1	0,96:1

Tabelle III.2.2) Prozentuale Zusammensetzung der Pigmente von 35 Tage alten Aplanosporen von *H. pluvialis* (SAG 192.80) und 33 Tage alten Zygosporen von *C. reinhardtii* (cc620xcc621), Datenbasis molare Werte.

2.7. Untersuchung der Monoacyl- und Diacyl-Ketocarotinoidester in Zygosporen von *C. reinhardtii*

Die Analyse der *on line*-Absorptionsspektren aller Analytenpeaks im Chromatogramm von Zygotenextrakten zeigte das Auftreten der gleichen Spektren bei einer Vielzahl der Peaks. Vor allem die Spektren der als 4-Ketolutein und Astaxanthin identifizierten freien Ketocarotinoide fanden sich bei vielen Pigmentpeaks.

Die große Anzahl der Monoacylester und der Diacylester mit den gleichen Pigmentspektren lies auf eine Veresterung des gleichen Pigmentes mit unterschiedlichen Fettsäuren schließen, die aufgrund der Länge oder des Sättigungsgrades ihrer Kohlenwasserstoffketten eine unterschiedliche Hydrophobizität und somit ein unterschiedliches Laufverhalten besaßen.

Mit Hilfe von Literaturvergleichen (Breithaupt 2007, Miao et al. 2006) wurden die Esterfraktionen in zwei Bereiche eingeteilt: Zum einen wurde die Monoacylesterfraktion bestimmt, die bei Verwendung des HPLC-Gradienten 2 zwischen 15 und 22 min von der Säule eluierte (bei HPLC-Gradient 1 zwischen 15 und 18,5 min, bei HPLC-Gradient 3 zwischen 10 und 13,5 min). Zum anderen fand sich eine Diacylesterfraktion, die bei

Verwendung des HPLC-Gradienten 2 zwischen 23 und 28 min von der Säule eluierte (bei HPLC-Gradient 1 zwischen 18,5 und 20 min, bei HPLC-Gradient 3 zwischen 14 und 17 min).

Die Auftrennung der Mono-oder Diacyl esterfraktionen in die einzelnen Pigmentacyl ester mittels dünn schicht chromatographischen Untersuchungen (Kapitel II.3.3.1) scheiterten im Rahmen der Arbeit. Durch weitere Forschungsarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe Lohr, insbesondere durch Verseifungsreaktionen, wurde die durch Absorptionsspektren vorausgesagte Identität dieser Pigmentpeaks bestätigt.

Bei Untersuchungen der Monoacyl esterfraktion zeigte sich bis auf wenige Ausnahmen das Spektrum des 4-Ketoluteins, nur wenige kleine Peaks zeigten ein Astaxanthinspektrum. Bei der Untersuchung der Diacyl esterfraktion wiesen alle Peaks ein Astaxanthinspektrum auf. Dieses Phänomen wurde sowohl für die Zygosporen der Stämme CLS 31-10 x CLS 31-8 (Abb. III.2.17) als auch für die Zygosporen der Stämme cc620 x cc621 (Abb. III.2.18) beobachtet.

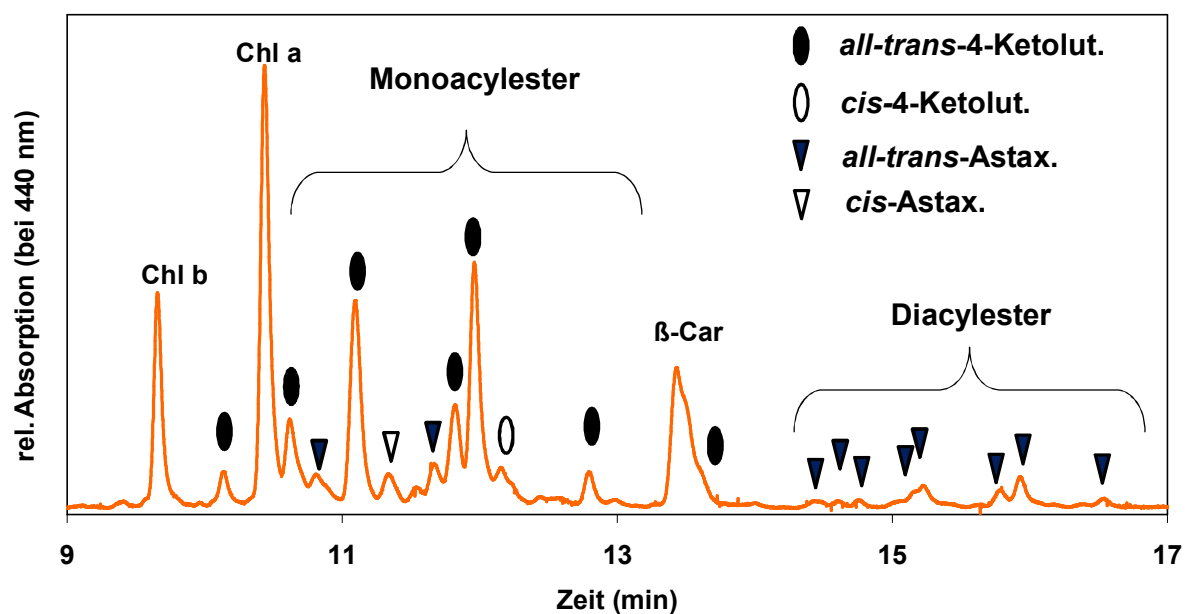


Abbildung III.2.17 Ausschnitt des HPLC-Chromatogramms des Zygosporen-Pigmentextraktes aus einer Paarung der *C. reinhardtii*-Stämme CLS 31-10 x CLS 31-8, Zellen 6 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert, HPLC-Gradient 3.

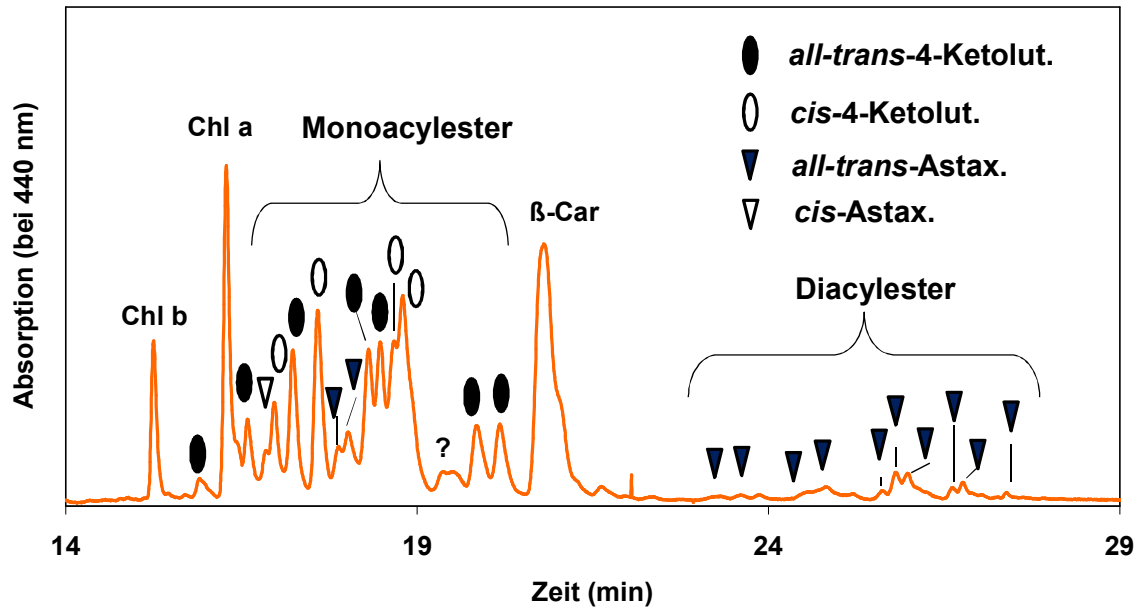


Abbildung III.2.18) Ausschnitt des HPLC-Chromatogramms des Zygosporen-Pigmentextraktes aus einer Paarung der *C. reinhardtii*-Stämme cc620 x cc621, Zellen 3 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agraplatten gelagert, HPLC-Gradient 2.

Bei genaueren Untersuchungen konnten kleine Unterschiede in den Mono- und Diacyl-esterfraktionen erkannt werden, wie z.B. die im Vergleich zu den Zygosporen cc620 x cc621 deutlich geringere Menge der Peaks mit Absorptionsspektrum von *cis*-Pigmenten bei den Zygosporen von CLS 31-10 x CLS 31-8. Allerdings zeigte sich, dass auch die HPLC-Chromatogramme der Esterfraktionen verschiedener Paarungsansätze der gleichen Stämme leichte Variabilitäten aufwiesen. Wie die nachfolgenden Untersuchungen in Kapitel III.3.2. zeigen, war hierfür ein unterschiedlicher Reifegrad der Zygosporen verantwortlich, da die Menge der Esterfraktionen mit dem Reifegrad der Zygoten zunahm. Durch die schnelle Reifung der Zygosporen der Stämme cc620 x cc621 konnten bei vergleichbar kürzer gelagerten Zygosporen größere Mengen an veresterten Ketocarotinoiden gefunden werden als bei den Stämmen CLS 31-10 x CLS 31-8. Dieses Phänomen kann auch in den Abbildungen III.2.17 und III.2.18 beobachtet werden. Die Zygosporen der Stämme CLS 31-10 x CLS 31-8 waren zwar länger gelagert worden, allerdings sind die Flächen der Chlorophyllpeaks im Verhältnis zu den Esterfraktionen deutlich größer als bei den kürzer gelagerten Zygosporen der Stämme cc620 x cc621.

Sowohl in den Mono- als auch in den Diacyl-esterfraktionen wurden die unterschiedlichen Isomere der Ketocarotinoide detektiert. Nach drei Wochen Lagerung bei 22 °C im Dunkeln stellten unter den freien Pigmenten die *trans*-Isomere mit 86 % die Mehrheit. Dagegen dominierten innerhalb der Monoester bei 4-Ketolutein die *cis*-Isomere mit einem Anteil von 92 %, Astaxanthin fand sich hingegen innerhalb der Monoacyl-esterfraktion mit 87 % überwiegend in der *all-trans*-Konformation. Innerhalb der Diacyl-esterfraktion wurden nur die *all-trans*-Konformation des Astaxanthins detektiert (siehe Kapitel III.3.2).

2.8. Identifizierung des 4-Ketolutein und dessen Acylester mit Hilfe der Pigmentmutante *lor1*

Wie in den vorausgegangenen Kapiteln hinreichend belegt wurde, wiesen Zygosporen von *C. reinhardtii* eine Reihe von neuen Pigmenten auf. Die Identität der Pigmente, die zu Beginn der Untersuchungen noch vorläufig als Astaxanthin, Canthaxanthin und 4-Ketolutein bezeichnet worden waren, konnte durch verschiedene Nachweise (Kapitel III.2.1 bis III.2.5) eindeutig belegt werden.

Zur Identifikation des als 4-Ketolutein bezeichneten Pigmentes war allerdings kein Referenzpigment verfügbar. Auch wurde 4-Ketolutein in der Literatur bisher wenig beschrieben. Daher wurden Zygosporen einer Pigmentmutante untersucht, die kein α -Carotin und folglich weder Lutein noch 4-Ketolutein bilden kann. Diese sog. *lor1*-Mutante weist einen Defekt der Lycopin- ϵ -Zyklase in der Carotinoidbiosynthese auf. Dies führt zu der erwähnten Abwesenheit von α -Carotin und aller davon abgeleiteten Pigmente. Die Mutante wurde von Chunaev und Mitarbeiter erstmals charakterisiert und fiel zunächst aufgrund eines Loroaxanthinmangels auf (Chunaev et al. 1991). Daher wurde sie als Loroaxanthindefizient oder später als *lor1*-Mutante bezeichnet (Anwaruzzaman et al. 2004).

Bei der Untersuchung der homozygoten *lor1*-Zygoten sollten weder 4-Ketolutein noch dessen Monoacylester detektierbar sein. Durch den Vergleich der Pigmentspektren von Wildtyp- und Mutantenzygosporen sollte zum einen deutlich werden, ob 4-Ketolutein von *C. reinhardtii* synthetisiert werden kann. Vor allem aber könnten so auch alle Acylesterpeaks bestimmt werden, die auf 4-Ketolutein zurückgingen. Deren Identitätsbestimmung war aufgrund des ähnlichen Laufverhaltens der Astaxanthin-Fettsäure-Ester schwierig.

2.8.1. Untersuchungen der *lor1*-Stämme cc3873 und cc2420

Aus der Chlamydomonas Core Collection des Chlamydomonas Centers wurden zwei *lor1*-Mutanten-Stämme bezogen, von denen der Stamm cc2420 als mt- bezeichnet war. Für den Stamm cc3873 war kein Paarungstyp angegeben.

Die HPLC- Untersuchungen zeigten für beide Stämme ein Pigmentmuster, das, wie erwartet, durch das Fehlen von Lutein charakterisiert war. Im Vergleich zu Wildtypstämmen zeichneten sich beide *lor1*-Stämme zusätzlich durch einen hohen Anteil an Violaxanthin aus (Abb. III.2.19).

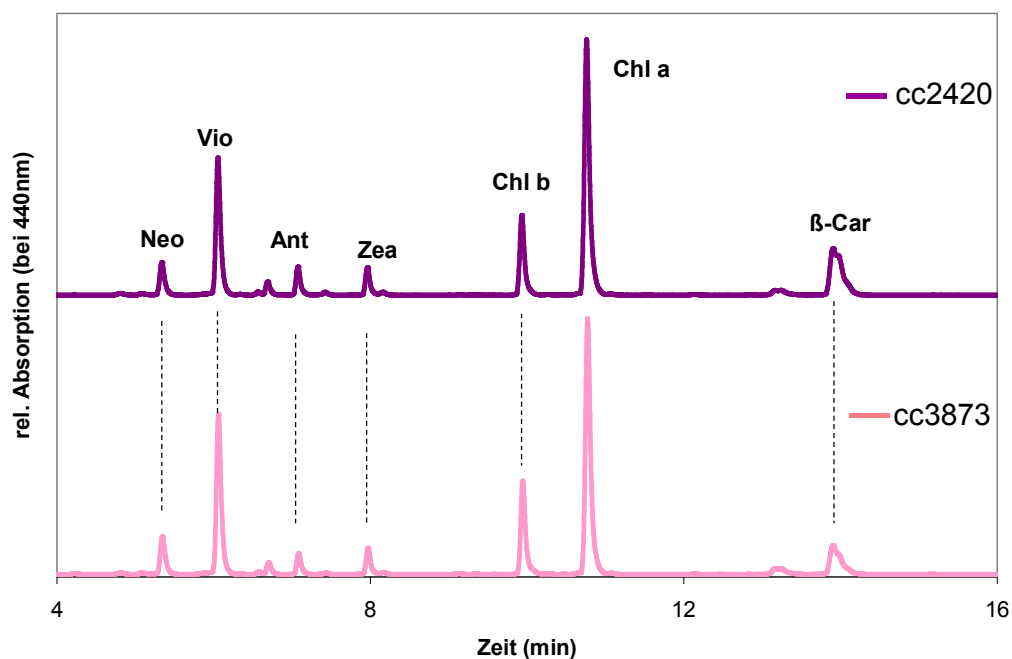


Abbildung III.2.19) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten der *lor1*-Mutanten von *C. reinhardtii*, Stämme cc3873 und cc2420 mt-; 10 Tage alte TAP-Flüssigschüttelkulturen, Lagerung bei 18 °C, HPLC-Gradient 3.

Bei den ersten Paarungsversuchen zeigte sich, dass der Stamm cc2420 mt- zwar schwach mobil war, bei der Kreuzung mit dem Stamm cc620 mt+ aber keinerlei Zygoten entstanden. Nachdem dies in mehreren Versuchen wiederholt auftrat, wurden Kreuzungsversuche mit dem Stamm cc621 mt- durchgeführt. Dabei fand eine Zygotenbildung statt. Dies zeigte, dass der angegebene Paarungstyp „minus“ falsch war, der Stamm cc2420 besaß den Paarungstyp „plus“. Daraufhin veranlasste Untersuchungen mittels Matingtyp-PCRs bestätigt das (Köhler 2008).

Der Stamm cc3873 erwies sich als völlig unmobil und alle Versuche aktiv bewegliche Zelle zu erhalten, waren erfolglos. Nachdem Köhler (2008) mittels molekularbiologischer Untersuchungen zusätzlich gezeigt hatte, dass dieser Stamm den Paarungstyp „plus“ und somit den gleichen Paarungstyp wie Stamm cc2420 besaß, wurde Stamm cc3873 nicht weiter verwendet.

Da für die Herstellung *lor1*-homozygoter Zygosporen beide Paarungstypen der Mutante benötigt wurden, musste nun erst durch Kreuzungen des *lor1*-Stammes cc2420 mt+ mit einem Wildtypstamm mit dem Paarungstyp „minus“ ein *lor1*-Stamm mit dem Paarungstyp „minus“ erzeugt werden.

2.8.2. Gewinnung eines *lor1*-Stammes mit dem Paarungstyp mt- (cc2420 C12)

Die Erzeugung eines *lor1*-Stammes des Paarungstypes „minus“ erwies sich in vielen Versuchsansätzen als erfolglos (Köhler 2008). Mit Hilfe der zeitgleich erschienenen Genomveröffentlichung von *C. reinhardtii* (Merchant et al. 2007) wurde durch einen Vergleich der darin beschriebenen Kopplungsgruppen und mehreren Blastsuchen der Abstand der beiden zu rekombinierenden Gene analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Genlocus der LCYE sowie des Matingtyp-Lokus bei *Chlamydomonas* auf dem gleichen Chromosom 6 in unmittelbarer Nähe mit einem Abstand von ca. 10-12 cM liegen.

Der Abstand von 10 cM gibt an, dass die Gene mit einer Wahrscheinlichkeit von 10 % durch Strangbruch (Crossing-Over) bei einer Paarung voneinander separiert werden. Das bedeutete, dass die Chance für Nachkommen mit einer Rekombination dieser beiden Gene bei 10% lag. Da diese Rekombination zwei unterschiedliche Nachkommen, nämlich WT mit Paarungstyp „minus“ und *lor1* mit „plus“ zur Folge hatte, war davon auszugehen, dass nur 5 % der untersuchten Klone die gewünschte Genkombination *lor1* mt- besaßen.

Um Nachkommen dieser seltenen Genkombination aufzufinden, wurde eine Tetradenanalyse der Zygoten von cc621 mt- x *lor1* E3.6 mt+ durchgeführt. Letzterer war von Köhler 2007 im Rahmen einer Kreuzung von cc2420 mt+ mit cc621 mt- isoliert worden und besaß eine etwas höhere Mobilität als der Ausgangsstamm cc2420.

Bei der Paarung traten erhebliche Schwierigkeiten auf. Zunächst konnten aufgrund der vergleichsweise immer noch geringen Mobilität nur wenige Zygoten gewonnen werden.

Diese keimten allerdings in einigen Fällen aus. Nachdem die resultierenden Tetrasporen vereinzelt waren, wuchsen jedoch viele der Tetraden nicht mehr zu Kolonien heran. Dies konnte festgestellt werden, da die vereinzelt Zellen auch Tage später noch an den Kreuzungspunkten zu finden waren, aber sich nicht mehr geteilt hatten. Nur sehr selten teilten sich alle vier Zellen einer Tetrade weiter und bildeten ausreichend große Kolonien für weitere Untersuchungen (Abb. III.2.20).

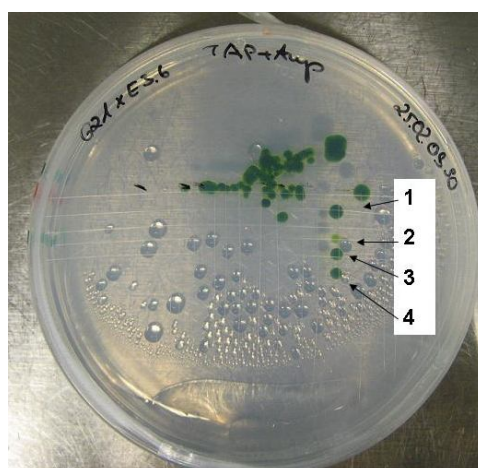


Abbildung III.2.20) Tetradenanalyse von *lor1*/WT-Zygoten (*lor1* E3.6 x cc621).

Dieses Phänomen wurde bei der Tetradenanalyse von WT-Zygoten nicht beobachtet (siehe Kapitel II.2.5.1.11). Auch nachdem die Keimzeit für die *lor1*-Zygoten verlängert wurde, konnte keine höhere Keimungsrate erzielt werden. Daher wurde ein Zellwanddefekt dieser Nachkommen vermutet. Um diesem Phänomen nachzugehen, wurde wie folgt vorgegangen: Mehrere Tage nach der Zygotenvereinzlung wurden Kolonien auf der Startlinie der Tetradenplatte ausgewählt. Jede Kolonie sollte aus einer einzelnen Zygote hervorgegangen sein, die erfolgreich ausgekeimt war, aber deren Tetraden nicht vereinzelt wurden. Die in diesen Kolonien enthaltenen Zellen wurden durch Verdünnung und Ausplattierung auf TAP-Agarplatten vereinzelt, Klone isoliert und deren Paarungstyp mittels Matingtype-PCR bestimmt. Trat nach der Analyse von etwa 20 Klonen ein Paarungstypverhältnis von 1: 1 auf, konnte man annehmen, dass die Ausgangszelle eine Zygote gewesen war.

Mehrere dieser Zygotenkolonien wurden untersucht, indem jede Kolonie verdünnt und auf einer separaten Platte vereinzelt wurde. Dabei wurde deutlich, dass etwa die Hälfte der herangewachsenen Kolonien auf einer Platte auffällig heller grün als die andere Hälfte war. Diese Beobachtung entsprach den Forschungsergebnissen von Chunaev und Kollegen (Chunaev et al. 1991). Sie beschrieben, dass die *lor1*-Stämme häufig eine hellgrüne Farbe aufwiesen. Die Autoren spekulierten, dass der Luteinmangel einen geringeren LHClI-Gehalt hervorrief. Dies führte auch zu einem geringeren Chl b-Anteil und folglich einer hellgrünere Farbe. Daher wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit ein hellgrüner Klon vorläufig als eine *lor1*-Mutante bezeichnet. Für die Matingtype-Analyse wurden daher pro ausgekeimter Zygotenkolonie etwa 10 hell- und 10 dunkelgrüne Klone ausgewählt. Sie zeigten ein Matingtype-Verhältnis von 1:1, wobei überwiegend die dunklen Kolonien dem Matingtyp „minus“ (entsprach dem eingesetzten Wildtyp) und die hellen dem Matingtyp „plus“ (eingesetzte *lor1*-Mutante) aufwiesen.

In einer Matingtype-Untersuchung fiel ein Klon auf, der eine helle Farbe, aber den Paarungstyp „minus“ besaß. Nachdem bis zu diesem Zeitpunkt eine hellgrüne Farbe ein Indiz für eine *lor1*-Mutante (mt+) war, erschien dieser Klon ein Kandidat für den gesuchten Genotyp. Der Klon wurde mittels HPLC (Abb. III.2.22) und wiederholter Matingtype-PCR (Abb. III.2.21) untersucht und stellte sich als gesuchter *lor1*-Stamm mit dem Paarungstyp „minus“ heraus. Er wurde aufgrund seiner Vereinzlungsposition als C12 bezeichnet.

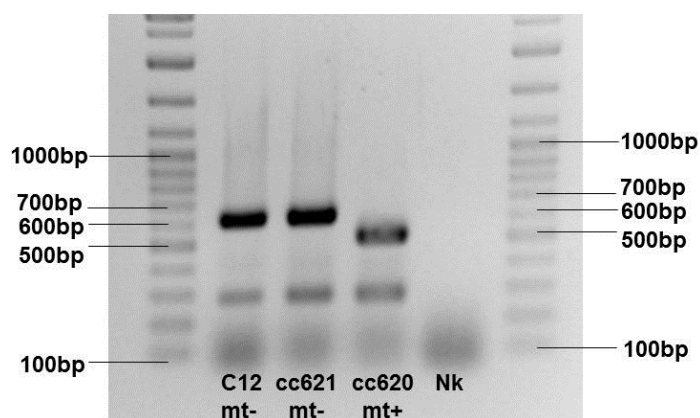


Abbildung III.2.21) Agarosegel zum Nachweis des Paarungstypes des neuen *lor1*-Klones C12, Bande in Höhe von 500 bp zeigen den Matingtyp „plus“ an, Banden in Höhe von 650 bp den Matingtype „minus“. DNA mt-: cc621, DNA mt+: cc620, NK: Negativkontrolle mit Wasser als Template, Marker: Laddermix (Fermentas).

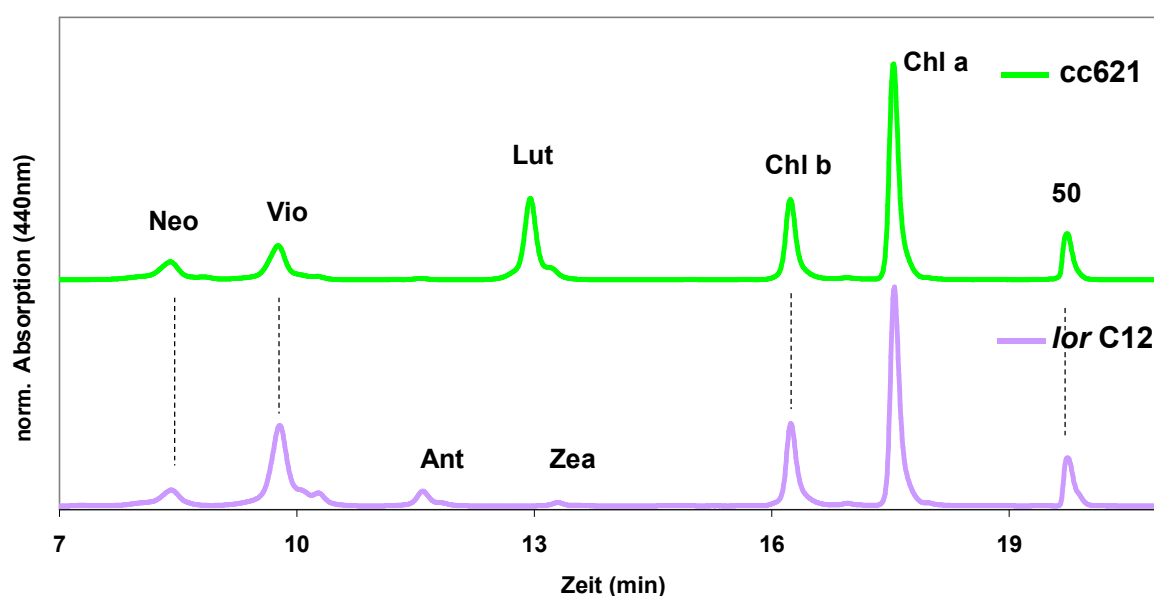


Abbildung III.2.22) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten vegetativer Zellen des WT und der *lor1*-Mutante von *C. reinhardtii*. Stämme: WT: cc621, 21 Tage alte TAP-Schüttelkultur; *lor1*: C12, 15 Tage alte TAP-Schüttelkultur, beide Lagerung bei 18 °C, HPLC-Gradient 1.

2.8.3. Paarung der *lor1*-Stämme von cc2420 E3.6 mit cc2420 C12

Nachdem nun beide Paarungstypen der *lor1*-Mutante vorlagen, wurden diese gemäß dem Standardprotokoll (Kapitel II.2.5.1.1- II.2.5.1.3) gepaart. Dabei wurde die Paarungszeit der Flüssigkulturen im Licht von 2 Stunden beibehalten. Als Vergleich wurden parallel die WT-Stämme cc620 und cc621 gepaart. Dies diente als Kontrolle und zeigte, dass die verwendeten Medien und Inkubationsbedingungen prinzipiell zu einer erfolgreichen Paarung führten.

Nach einer Inkubation der ausplattierten Zellen im Dunkeln für fünf Wochen wurden die ungepaarten Gameten von den Platten gespült und die Zygoten von den Platten geschabt.

Die Zygosporen der *lor1*-Mutanten wurden mittels DIK-Mikroskop untersucht (Abb. III.2.23). Dabei zeigten sich auffällige Unterschiede zu WT-Zygosporen. Die *lor1*-Zygoten zeigten ein hyalines Aussehen, wobei granuläre Strukturen im Cytosol Teile der Zellen ausfüllten. Die Zellen schienen große Zelldefekte aufzuweisen.

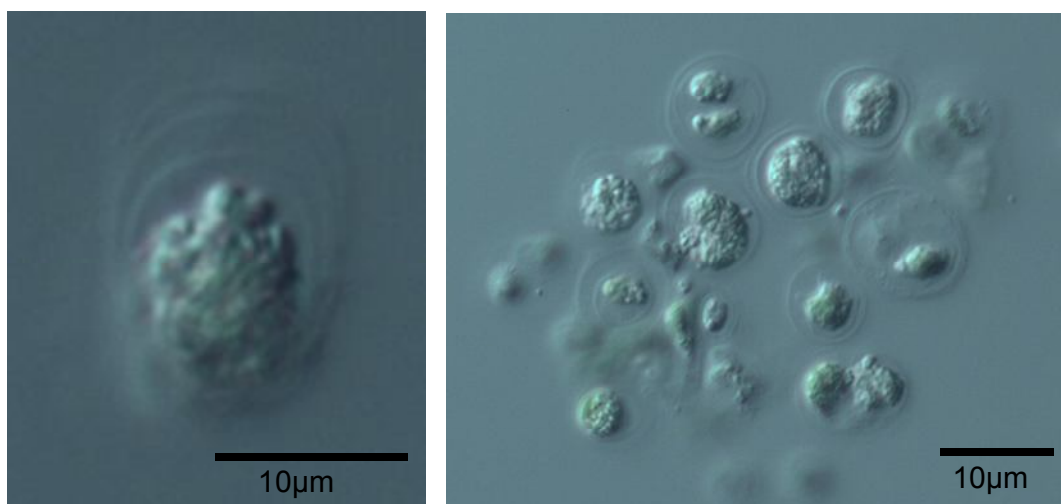


Abbildung III.2.23 DIK-Aufnahmen von *lor1*-homozygoten Zygosporen (E3.6 x C12) von *C. reinhardtii*. Links: einzelne Zygospore, rechts Pellicula der Zygosporen, Zygoten 14 Wochen lang bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert.

Die zugehörigen Pigmentuntersuchungen mittels HPLC gemäß Standardprotokoll zeigten ein nur sehr geringes Ketocarotinoidvorkommen in den *lor1*-Zygosporen (Tab. III.2.3). Lediglich Canthaxanthin wurde detektiert. Dagegen wurde β -Carotin mit etwa 50 % am Gesamtpigmentanteil nachgewiesen. Die Chlorophylle a und b konnten nur noch in stark verringerten Mengen beobachtet werden. Kontrollversuche mit WT-Zygosporen zeigten ein für sie zu erwartenden Pigmentspektrum (Abb. III.3.24).

		<i>lor1</i>-Zygosporen E3.6 x C12 (Anteil in %)
Chlorophylle	Chl a	17,6
	Chl b	4,0
PS-Carotinoide	Lutein	-
	beta-Carotin	52,2
	Violaxanthin	13,0
	Antheraxanthin	-
	Zeaxanthin	-
	Neoxanthin	-
Ketocarotinoide	Canthaxanthin	13,2
	andere Ketocarotinoide	-
Summe		100

Tabelle III.2.3) Pigmentzusammensetzung der *lor1*-Zygosporen (E3.6 x C12), 5 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatte gelagert, Datenbasis molare Werte.

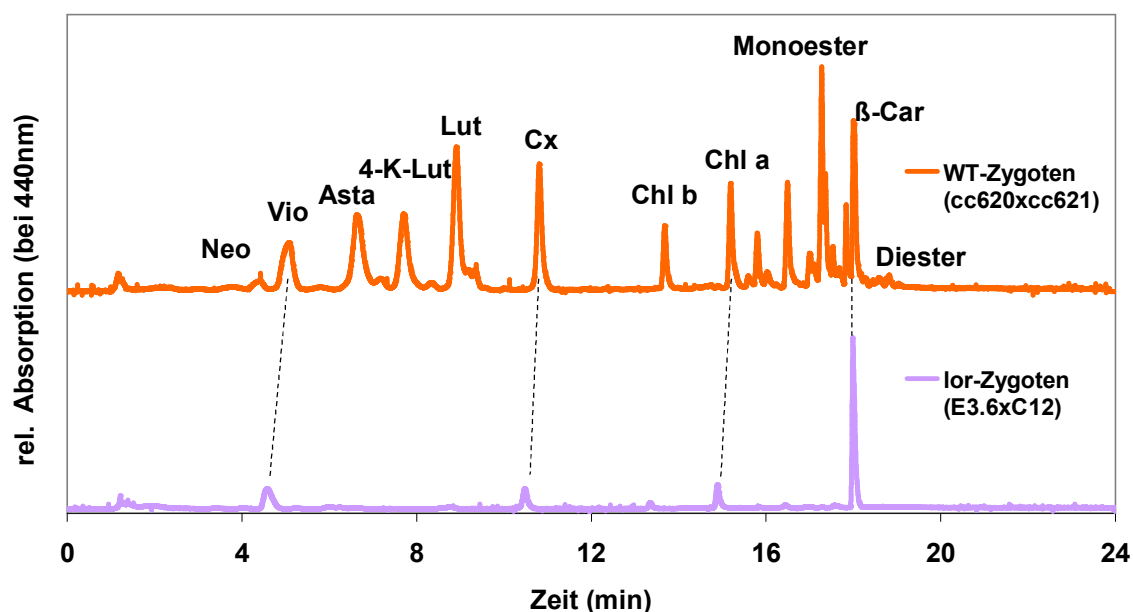


Abbildung III.2.24) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten von WT- und *lor1*-Zygosporen von *C. reinhardtii*.

WT: cc620 mt+ x cc621 mt -; *lor1*: E3.6 mt+ x C12 mt-; Beide Ansätze 5 Wochen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatte gelagert, HPLC-Gradient 1.

Anschließende Untersuchungen der *lor1*-Zygoten im TEM zeigten, dass diese Zellen starke Defekte aufwiesen und abgestorben waren; es konnten keine intakten Zellstrukturen mehr beobachtet werden (Abb. III.2.25). Die Zelle war von zwei Hüllen umgeben, wobei nicht

geklärt werden konnte, ob es sich um primäre Zellwand und Plasmalemma oder um Primärwand und eine dünne Sekundärwand handelte.

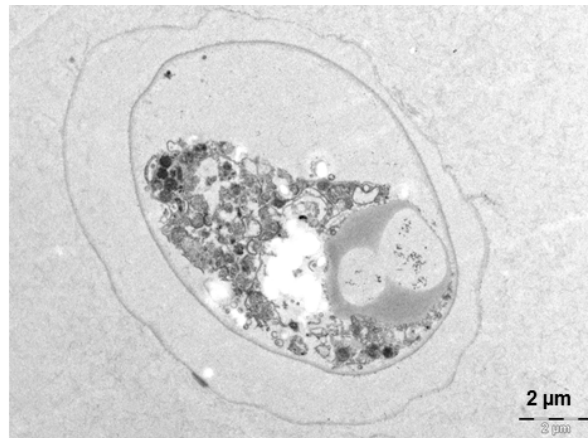


Abbildung III.2.25) TEM-Aufnahmen von homozygoten *lor1*-Zygosporen (E3.6 x C12) von *C. reinhardtii*, 14 Wochen auf TAP-N-Agarplatten im Dunkeln bei 22 °C gelagert.

Aufgrund der zellmorphologischen Daten ließ sich ein Zelldefekt vermuten, der durch weitere Mutationen in den Zellen hervorgerufen wurde, aber erst durch Paarung der beiden Stämme phänotypisch auftrat. Folglich waren die Zygosporen dieser *lor1*-Mutanten für weitere Untersuchungen ungeeignet. Daraufhin wurden weitere Stämme der *lor1*-Mutante gesucht, die für die Kreuzungsexperimente verwendet werden sollten.

2.8.4. Paarung der *lor1*-Stämme ASX1-1b und ASX2-11d

Die beiden neuen Stämme der *lor1*-Mutante ASX1-1b mt+ und ASX2-11d mt- wurden freundlicherweise von Kris Niyogi (Universität Berkeley) zur Verfügung gestellt. Diese waren in seiner Arbeitsgruppe isoliert und auf ihre Paarungsfähigkeit hin überprüft worden.

Die beiden Stämme wurden in TAP-Medium angezogen und die vegetativen Zellen zeigten das erwartete Pigmentspektrum mit einem Mangel von Lutein (Abb. III.2.26).

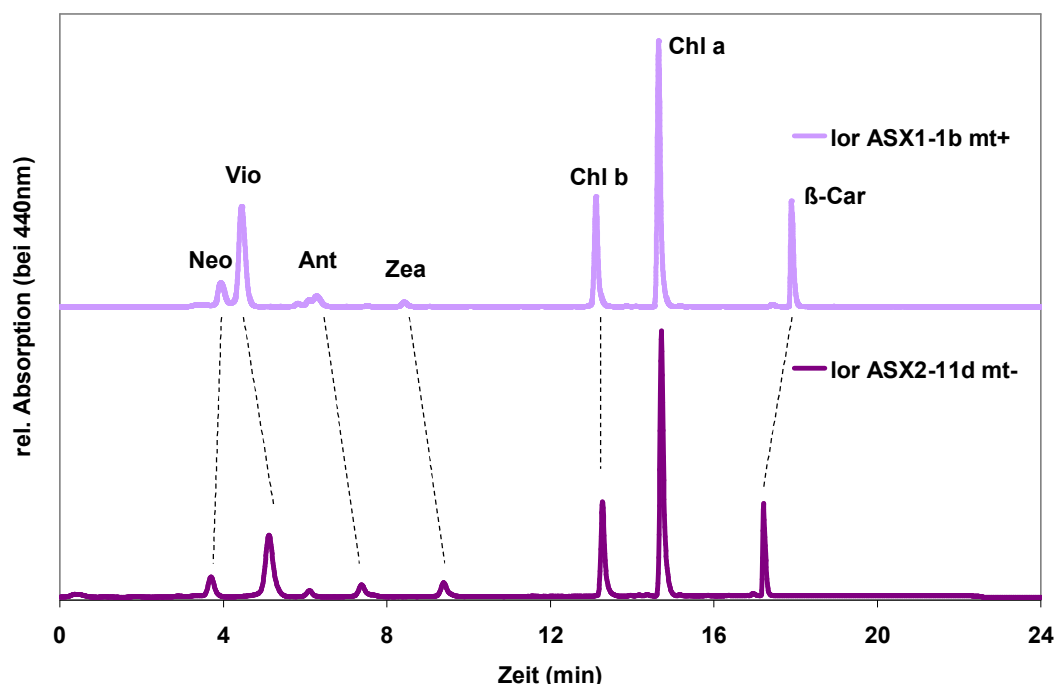


Abbildung III.2.26) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten zweier *lor1*-Mutanten von *C. reinhardtii* Stämme ASX1-1b mt+ und ASX2-11d mt-; 8 Tage alte Flüssigschüttelkulturen in TAP-Medium bei 60 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und 22 °C gelagert, HPLC-Gradient 1.

Bei der Untersuchung der Pigmentzusammensetzung der beiden *lor1*-Stämme konnte kein veränderter Chlorophyll b-Anteil beobachtet werden (Tab. III.2.4 und Anhang 3.2). Wie auch bei dem *lor1*-Stamm cc2420 zeigte sich aber ein erhöhter Violaxanthingehalt. Chunaev und Mitarbeiter spekulierten, das Violaxanthin als Ersatz für Lutein in die Lichtsammelkomplexe eingebaut werden kann (Chunaev et al. 1991).

		<i>lor1</i> ASX1-1b m+ (Anteil in %)	<i>lor1</i> ASX2-11d mt- (Anteil in %)
Chlorophylle	Chl a	50,9	55,8
	Chl b	20,9	19,5
PS-Carotinoide	Lutein	-	-
	beta-Carotin	8,7	6,6
	Violaxanthin	13,6	10,3
	Antheraxanthin	1,9	2,4
	Zeaxanthin	0,6	2,5
	Neoxanthin	3,3	2,7
Summe		100	100

Tabelle III.2.4) Prozentuale Pigmentzusammensetzung von vegetativen Zellen der *lor1*-Mutanten ASX2-11d mt- 7 Tage alt, ASX1-1b mt+ 14 Tage alt, Flüssigschüttelkulturen in TAP-Medium bei 60 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und 22 °C gelagert, Datenbasis molare Werte.

Zur Zygotenherstellung wurde bei beiden *lor1*-Stämmen mittels Stickstoffentzug im Medium die Gametenbildung induziert. Die Paarung erfolgte gemäß Standardprotokoll (Kapitel II.2.5.1.1 - II.2.5.1.3) mit den im Kapitel II.2.5.1.8 beschriebenen Abweichungen. Als Kontrolle wurden erneut auch die beiden WT-Stämme cc620 und cc621 gepaart. Die Plattenkulturen wurden für 24 Stunden im Licht belassen und danach dunkel gestellt (bei 22 und 30 °C).

Nach 24 Stunden Inkubation im Licht fiel auf, dass sich in der verbliebenen Paarungssuspension eine Pellicula gebildet hatte. Diese wurde abgenommen, auf TAP-N-Agarplatten transferiert, für 5 Tage im Licht bei 22 °C belassen und danach bei 30 °C im Dunkeln gelagert.

Nach fünf Wochen Lagerung im Dunkeln wurden die ungepaarten Gameten abgespült, die Zygosporien mittels Zellschaber isoliert und gemäß Standardprotokoll (Kapitel II.3.1.5) die Pigmente extrahiert. Dabei wurde deutlich, dass auf den Plattenkulturen der nur 4 Stunden gepaarten *lor1*-Zellen keine Zygosporienbildung beobachten werden konnte. Dagegen war die Pellicula der *lor1*-Zygosporien, die auf TAP-N-Agarplatten transferiert worden war, orange-rot verfärbt.

Diese Zygosporien wurden ebenfalls mittels DIK-Mikroskopie untersucht. Sie zeigten ein ganz ähnliches Bild wie Zygosporien des Wildtypes (Abb. III.2.27) und schienen somit frei von einem auffälligen Zelldefekt wie ihn die Zygosporien der *lor1*-Mutanten E3.6 x C12 gezeigt hatten.

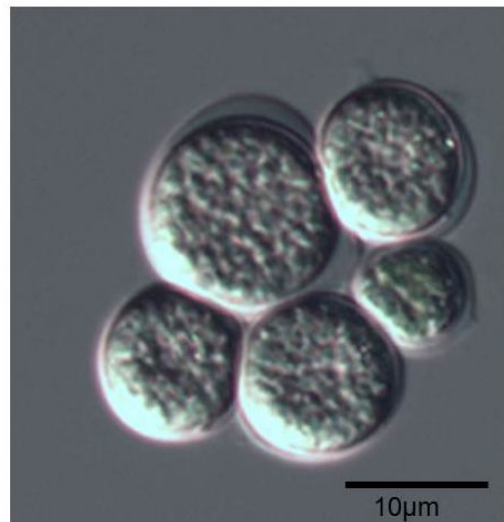


Abbildung III.2.27) DIK-Aufnahmen von homozygoten *lor1*-Zygosporien (ASX1-1b x ASX2-11d) von *C. reinhardtii* 5 Wochen auf TAP-N-Platten im Dunkeln bei 30 °C gelagert.

Die HPLC-Untersuchung der Pigmentextrakte zeigte, dass die *lor1*-Zygosporien der Stämme ASX1-1b und ASX2-11d ein Pigmentmuster besaßen, bei dem Lutein, 4-Ketolutein und sehr viele Monoesterfraktionen fehlten (Abb. III.2.28).

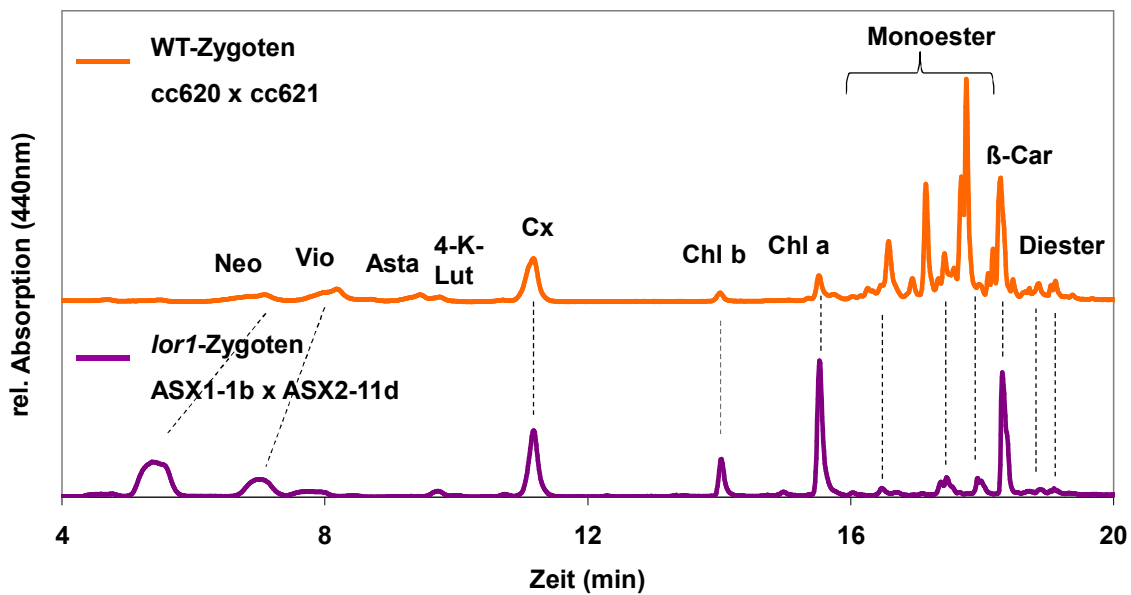


Abbildung III.2.28) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten von WT- sowie homozygoten *lor1*-Zygoten von *C. reinhardtii*, HPLC-Gradient 1B.
 WT: cc620 mt+ x cc621 mt-; *lor1*: ASX1-1b mt+ x ASX2-11d mt-;
 Beide Zygotenansätze 5 Wochen bei 30 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatte gelagert.

Bei genaueren Untersuchungen der Monoesterfraktionen zeigte sich, dass alle Monoester, die bei WT-Zygoten ein 4-Ketolutein-Spektrum aufwiesen, nun nicht mehr zu finden waren (Abb. III.2.29). Lediglich Monoester, die im WT ein Astaxanthinspektrum zeigten, konnten auch bei den *lor1*-Zygoten nachgewiesen werden. Bei den Diestern waren keine Unterschiede zum WT festzustellen. Alle nachgewiesenen Ketocarotinoide lagen in der *all-trans*-Konformation vor.

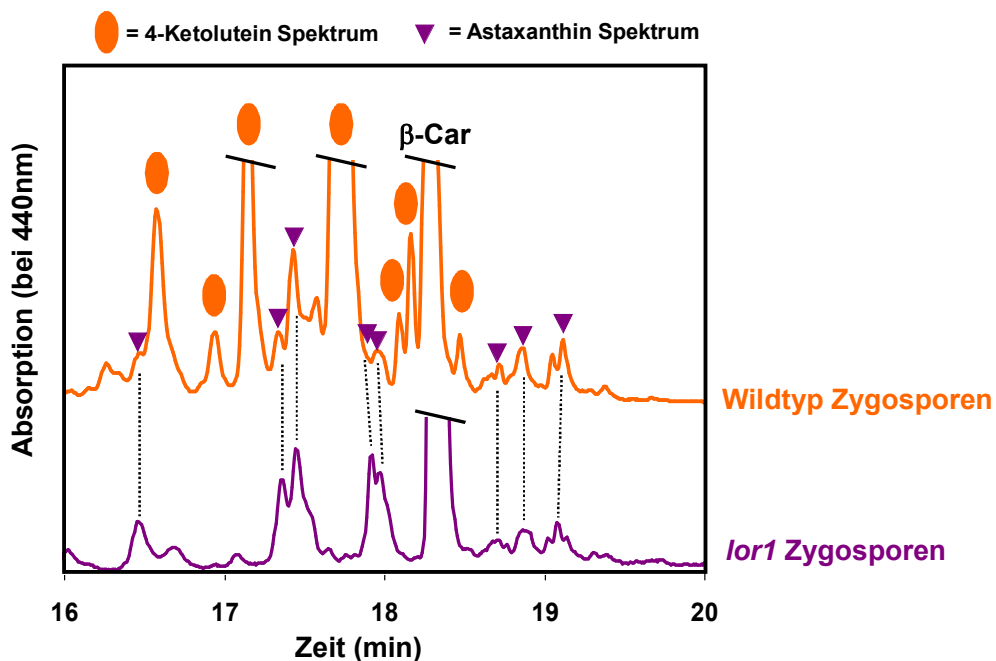


Abbildung III.2.29) Ausschnitte der HPLC-Chromatogramme der Zygoten von *C. reinhardtii* (aus Abb. III.2.29): Esterfraktionen und Hinweise auf deren Absorptionseigenschaften.
 WT: cc620 mt+ x cc621 mt-; *lor1*: ASX1-1b mt+ x ASX2-11d mt-.

Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da die *lor1*-Zygosporen nicht mehr in der Lage waren α -Carotin sowie dessen Derivate, und somit weder Lutein noch die ketolierte Form 4-Ketolutein, zu synthetisieren.

Diese Untersuchungen lieferten einen weiteren Beleg für die Identität des 4-Ketoluteins sowie der davon abgeleiteten Monoester und bestätigten damit die zuvor nur anhand von *on line*-Absorptionsspektren vorgenommene Identifizierung der Chromophore in den Ketocarotinoidacyclen. Sie belegten zusätzlich die Vermutung, dass 4-Ketolutein nur als Monoester, nicht aber als Diester vorliegt.

		<i>lor1</i>-Zygosporen ASX1-1b x ASX2-11d (Anteil in %)
Chlorophylle	Chl a	28,8
	Chl b	7,3
PS-Carotinoide	Lutein	0,0
	beta-Carotin	11,4
	Violaxanthin	12,4
	Antheraxanthin	1,3
	Zeaxanthin	0,9
	Neoxanthin	0,8
Ketocarotinoide	Canthaxanthin	15,4
	Astaxanthin	9,5
	Astaxanthin-Monoester	8,1
	Astaxanthin-Diester	4,1
	andere Ketocarotinoide	0,0
Summe		100

Tabelle III.2.5) Prozentuale Pigmentzusammensetzung der *lor1*-Zygosporen (ASX1-1b x ASX2-11d), 5 Wochen bei 30 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatte gelagert, Datenbasis molare Werte.

Auch die Untersuchungen dieser Zellen mittels TEM offenbarte eine Morphologie der Mutantenzygosporen, die dem WT-Zygosporen sehr ähnlich war (Abb. III.2.30). Die *lor1*-Zygosporen waren dicht gefüllt mit globulären Strukturen, die aufgrund ihrer Osmiophilie vorläufig als Lipidtröpfchen bezeichnet wurden. Des Weiteren fanden sich einige Stärkekörner in den Zellen. Auffällig war, dass diese Zygosporen sowohl eine primäre als auch eine sekundäre Zellwand aufwiesen. Das steht wahrscheinlich in Verbindung mit der Beobachtung, dass diese Zellen bei Extraktionsversuchen die unter Kapitel II.3.1.7 beschriebene kurzzeitige Stabilität gegenüber dem Extraktionsmittel Methanol besaßen.

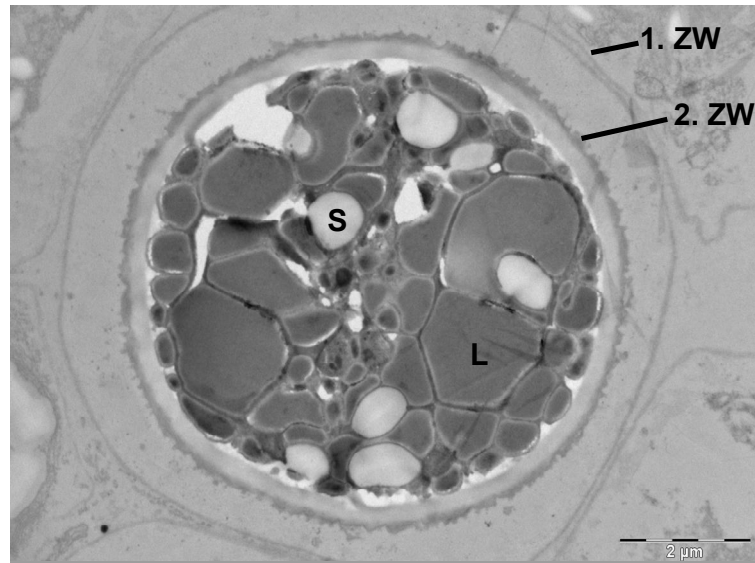


Abbildung III.2.30) TEM-Aufnahmen von homozygoten *lor1*-Zygosporen (ASX1-1b x ASX2-11d) von *C. reinhardtii* 5 Wochen auf TAP-N-Platten im Dunkeln bei 30 °C gelagert, L: Lipidtröpfchen, S: Stärkekörner, 1.ZW: Primäre Zellwand, 2.ZW: Sekundäre Zellwand.

Aufgrund der mikroskopischen Untersuchungen der Zygosporen der *lor1*-Stämme ASX1-1b und ASX2-11d konnte von intakten Zellen ausgegangen werden. Diese Zygoten reiften ähnlich wie WT-Zygoten. Diese *lor1*-Zygosporen akkumulierten kleine Mengen an Ketocarotinoiden, die überwiegend mit Fettsäuren verestert waren. Dabei waren nur Ketocarotinoide, die vom β -Carotin abgeleitet sind, anzutreffen. Es traten keine weiteren, neuartigen Ketocarotinoide auf. Alle von α -Carotin abgeleiteten Pigmente wurden nicht detektiert.

3. Änderung der Pigmentgehalte in Gameten und Zygoten von *C. reinhardtii* unter mehrwöchiger Dunkelinkubation

3.1. Vegetative Zellen und Gameten

Auch vegetative Zellen und Gameten zeigen eine Änderung des Pigmentmusters mit Dauer der Lagerung. Durch den entstehenden Nährstoffmangel wandeln sich vegetative Zellen stets in Gameten um. Die Pigmentzusammensetzung der vegetativen Zellen bildet somit die Basis für die Pigmentzusammensetzung der jungen Gameten. Diese können dann im Laufe des zunehmenden Nährstoffmangels infolge der Lagerzeit ihr Pigmentmuster ändern.

3.1.1. Die Pigmentgehalte der vegetative Zellen

Die Daten der vegetativen Zellen zeigten eine für photosynthetisch aktive Grünalgen typische Pigmentzusammensetzung. Die Chlorophylle dominierten den Pigmentgehalt mit ca. 75 % Anteil am Gesamtgehalt (Tab. III.3.1). Als Carotinoide waren (in absteigender Konzentration) in der Zelle Lutein (etwa 10 %), β -Carotin (etwa 6 %), die Pigmente des Violaxanthin-Antheraxanthin-Zeaxanthin-Zyklus (Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin; zusammen etwa 5 %) sowie Neoxanthin (etwa 5 %) vorhanden. Unter den verwendeten HPLC-Bedingungen coeluierten die Pigmente Neoxanthin und Loroxanthin, so dass das im Rahmen dieser Arbeit als Neoxanthin quantifizierte Pigment auch einen geringen Loroxanthinanteil enthält. Kontrollversuche mit anderen HPLC-Methoden zeigten, dass der Loroxanthinanteil bei den verwendeten Inkubationsbedingungen weniger als 2 % am Gesamtpigmentgehalt betrug.

		cc620 veg. Zellen (Anteil in %)	cc621 veg. Zellen (Anteil in %)
Chlorophylle	Chl a	50,0	52,4
	Chl b	21,2	22,2
PS-Carotinoide	Lutein	11,9	9,3
	beta-Carotin	7,0	5,4
	Violaxanthin	4,0	5,6
	Antheraxanthin	0,5	0,4
	Zeaxanthin	0,0	0,0
	Neoxanthin	5,4	4,7
Summe		100	100

Tabelle III.3.1) Prozentuale Zusammensetzung der Pigmente in vegetativen Zellen von *C. reinhardtii*, Stämme cc621 sowie cc620, 6 Tage alt, Datenbasis molare Werte.

Bei mikroskopischen Untersuchungen der vegetativen Zellen wurde wiederholt beobachtet, dass Stamm cc620 deutlich kleinere Zellen aufwies. Bei den Pigmentuntersuchungen zeigte sich, dass die prozentuale Zusammensetzung der Pigmente in den beiden Stämmen davon

unbeeinflusst war (Tab. III.3.1). Die Chlorophylle waren die dominierende Fraktion, die Carotinoide stellten rund ein Viertel des Gesamtpigmentgehaltes.

Wurden die Pigmentgehalte pro Zelle bestimmt, so wiesen die kleineren Zellen des Stammes cc620 deutlich geringere Pigmentmengen pro Zelle auf als die Zellen des Stammes cc621. Fast alle Pigmentkonzentrationen von cc620 waren bei den hier vorliegenden Messungen auf rund ein Viertel reduziert (Abb. III.3.1).

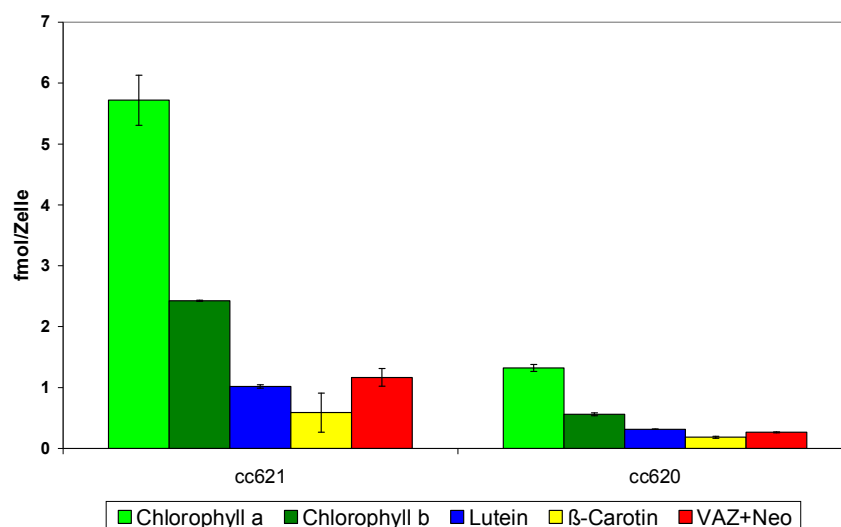


Abbildung III.3.1) Pigmentzusammensetzung der Stämme cc620 sowie cc621 von *C. reinhardtii*, vegetative Zellen: 6 Tage alte bei 18 °C in TAP-Schüttelkulturen bei 60 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ angezogene Kulturen. Fehlerbalken: durchschnittliche Abweichung bei zwei unabhängigen HPLC-Messungen und Zellzahlbestimmungen der gleichen Probe.

3.1.2. Die Pigmentgehalte in den Gameten ändern sich infolge der Lagerung

3.1.2.1. Die Änderung in den absoluten Pigmentgehalten

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Pigmententwicklung in alternden Gameten bestimmt, die auf Festmedium im Dunkeln gelagert wurden. Dies waren die gleichen Bedingungen mit denen die Zygosporen inkubiert wurden.

Für die Pigmentuntersuchungen wurden drei Zeitpunkte gewählt: Junge Gameten, die sich nach 24 Stunden Induktion im Licht unter Stickstoffmangel aus vegetativen Zellen des Stammes cc621 gebildet hatten. Des Weiteren wurden Gameten des gleichen Ansatzes untersucht, die auf TAP-N-Agarplatten übertragen, weitere 24 Stunden im Licht belassen und nach 12 oder 33 Tage Inkubation im Dunkeln bei 20 °C geerntet worden waren.

Im Vergleich dieser drei Gametenproben fiel auf, dass die Chlorophylle während der Lagerung der Gameten im Dunkeln abnahmen; die Carotinoide waren nach 33 Tagen die dominierende Pigmentfraktion (Abb. III.3.2). Allerdings änderte sich das Pigmentmuster nicht während der langen Lagerzeit; es konnten keine wesentlichen Mengen an neuen Pigmentpeaks identifiziert werden. Die weiteren Peaks im Chromatogramm der 12 Tage Probe von Stamm cc621, die zwischen 15 und 17 min von der Säule eluierten, stellten

Chlorophyllderivate dar, die aber in der 33 Tage alten Probe nicht mehr nachweisbar waren. Da diese Peaks auch nicht in der Gametenprobe des zweiten Stammes cc620 gefunden wurden, wird vermutet, dass es sich um einen Artefakt handelt: Dieser kann aufgrund starker Epimerisierung von hoch konzentrierten Chl a haltigen Lösungen entstehen, wenn es nach der Probenextraktion zu einer langer Verweilzeit im Autosampler der HPLC kommt.

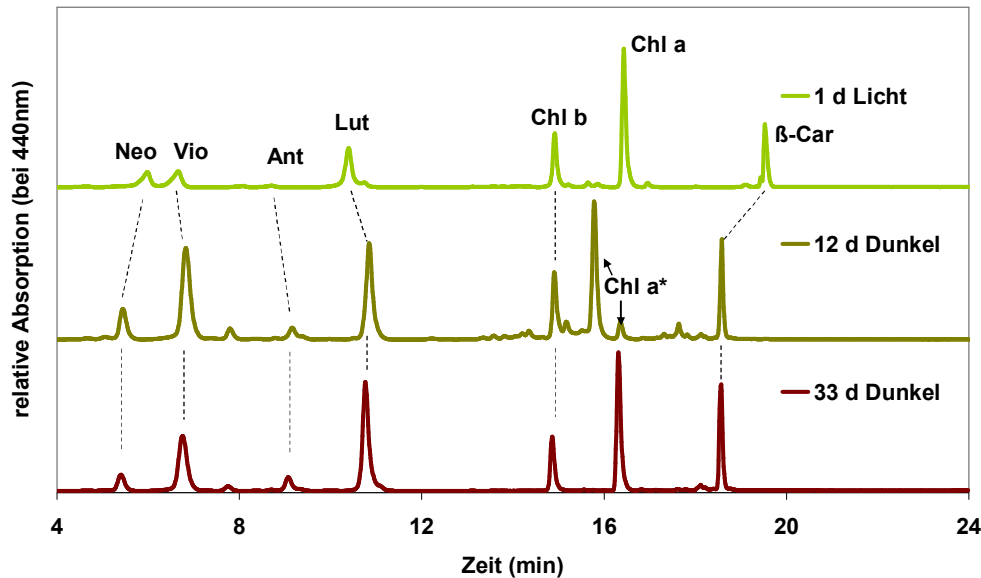


Abbildung III.3.2) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten der Gameten verschiedenen Alters des *C. reinhardtii* Stammes cc621: 1 Tag im Licht in TAP-N-Flüssigkultur (Induktion der Gametenbildung) sowie 12 und 33 Tage lang bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert, Chl a* bei Tag 12 wahrscheinlich epimerisiert, HPLC-Gradient 1B.

Während der Lagerung der Gameten im Dunkeln nahmen die Carotinoid- sowie Chlorophyllmengen deutlich ab. Nach 12 Tagen Lagerung waren etwa gleiche Mengen an Carotinoiden wie an Chlorophyllen in den Zellen vorhanden. Dieses Verhältnis änderte sich auch nach über einem Monat Lagerung im Dunkeln nicht wesentlich (Abb. III.3.3).

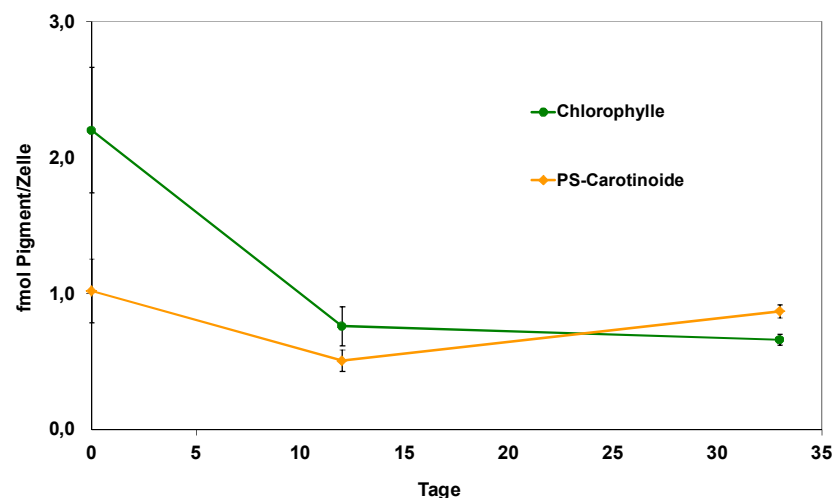


Abbildung III.3.3) Übersicht über die Pigmentgehalte in den Gameten (Mittelwert aus cc620 und cc621) von *C. reinhardtii*, Fehlerberechnung als Hinweis auf die Variabilität der Pigmentgehalte in den beiden verschiedenen Gameten: Pro Stamm wurde jeweils eine Zellzahlbestimmung sowie eine HPLC-Messungen durchgeführt, alle Proben stammen aus einer Zeitreihe nach Gameteninduktion.

3.1.2.2. Die prozentuale Pigmentverteilung in unterschiedlich lang gelagerten Gameten

Um die Pigmentänderungen in den alternden Gameten besser identifizieren zu können, wurden die prozentualen Verhältnisse der Pigmente zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Grundlage dafür waren die molaren Pigmentgehalte in den Zellen (fmol Pigment pro Gametenzelle).

In frisch induzierten Gameten (24 Stunden Licht, Flüssigkultur TAP-N) dominierten die Chlorophylle mit einem Anteil von über 76 % die Pigmentzusammensetzung (Abb. III.3.4). Die quantitativ dominierenden Carotinoide stellen Lutein (etwa 12,6 % vom Gesamtpigmentgehalt) und β -Carotin (9,5 %) dar. Die Pigmentzusammensetzung entsprach im Wesentlichen der von vegetativen Zellen (Tab. III.3.2).

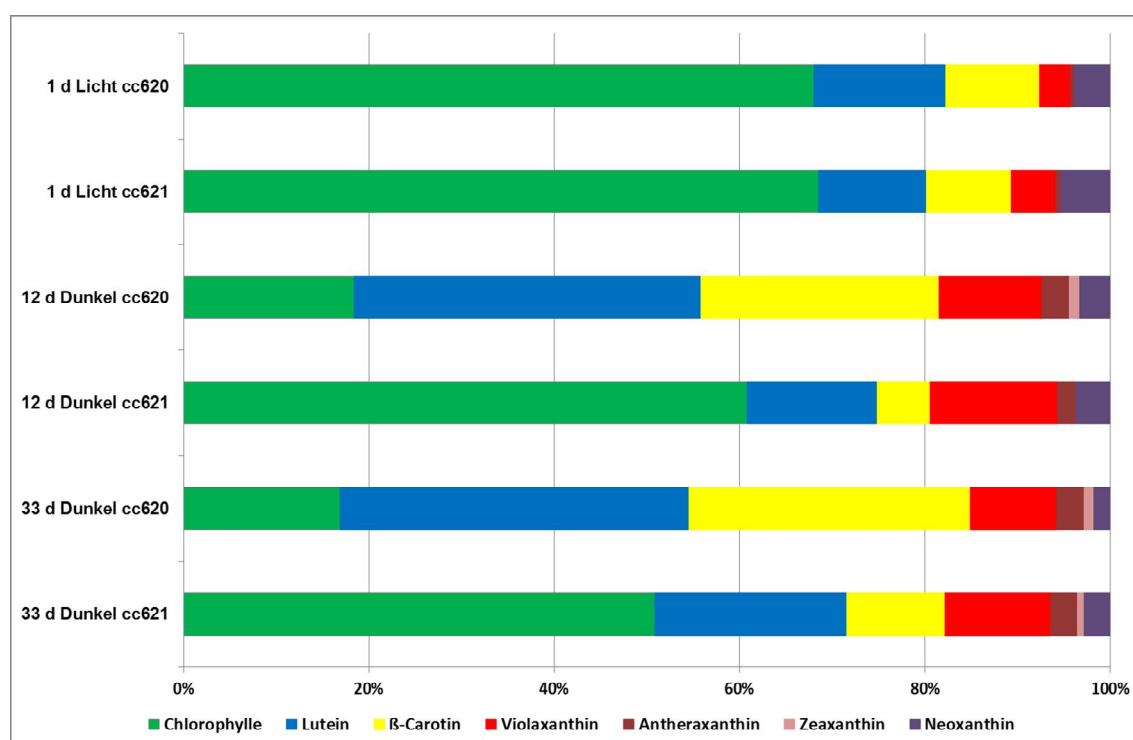


Abbildung III.3.4) Prozentuale Zusammensetzung der Pigmente in unterschiedlich lang gelagerten Gameten der beiden Stämme cc620 und cc621.

In länger gelagerten Gametenproben (12 bzw. 33 Tage Lagerung im Dunkeln bei 22 °C) wurde beobachtet, dass bei diesem Versuchsansatz die Gameten des Stammes cc620 deutlich schneller alterten als die des Stammes cc621. Als genereller Trend konnte aber beobachtet werden, dass sich das Mengenverhältnis von Carotinoiden und Chlorophyllen annähert.

		veg. Zellen		Gameten					
		6 Tage Licht		1 Tag Licht		12 Tage Dunkel		33 Tage Dunkel	
		cc620	cc621	cc620	cc621	cc620	cc621	cc620	cc621
Chlorophylle	Chl a	50,0	52,4	49,1	48,4	12,6	43,0	12,5	37,0
	Chl b	21,2	22,2	18,9	20,2	5,9	17,8	4,4	13,9
PS-Carotinoide	Lutein	11,9	9,3	14,3	11,6	37,4	14,0	37,7	20,7
	beta-Carotin	7,0	5,4	10,1	9,2	25,6	5,7	30,4	10,6
	Violaxanthin	4,0	5,6	3,4	4,8	11,1	13,7	9,3	11,4
	Antheraxanthin	0,5	0,4	0,4	0,5	3,0	2,0	3,0	2,8
	Zeaxanthin	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	1,0	0,7
	Neoxanthin	5,4	4,7	3,9	5,3	3,3	3,7	1,8	2,8
Keto-carotinoide	Ketocarotinoide	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe		100	100	100	100	100	100	100	100
Verhältnis	β- zu α-Carotinoiden	1,42	1,72	1,25	1,71	1,18	1,80	1,21	1,37

Tabelle III.3.2) Prozentuale Verteilung der Pigmente in vegetativen Zellen (6 Tage alte TAP-Schüttelkulturen bei 60 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und 18 °C) sowie unterschiedlich lang gelagerten Gameten der Stämme cc620 sowie cc621: 1 Tag im Licht in Schüttelkulturen mit TAP-N bei 60 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bei 18 °C, 12 bzw. 33 Tage lang im Dunkeln bei 22 °C auf TAP-N-Plattenkulturen gelagerte Gameten, Datenbasis molare Werte.

Auch für die Gameten wurde das Verhältnis von β -Carotinoiden zu α -Carotinoiden während der unterschiedlichen Alterung bestimmt. Zwischen den drei Stadien konnte zwar ein leichter Unterschied festgestellt werden (Tab. III.3.2), allerdings konnte kein Zusammenhang mit der Lagerzeit beobachtet werden.

3.1.2.3. Luteinester in gealterten Gameten von *C. reinhardtii*

In den gelagerten Gameten tauchten neue Peaks im HPLC-Chromatogramm auf. Diese eluierten zum gleichen Zeitpunkt von der Säule wie die Monoacylester in den Zygotenproben (Abb. III.3.5). Mittels spektraler Untersuchung wurde festgestellt, dass die Pigmente die gleichen Absorptionseigenschaften wie Lutein zeigten. Aufgrund dieser spektralen Eigenschaften sowie den Retentionszeiten wurde vermutet, dass diese Peaks Luteinester darstellten. Luteinester finden sich häufig in Früchten, wie z.B. in Papaya, Pfirsichen oder Kürbissen (Khachik et al. 1991).

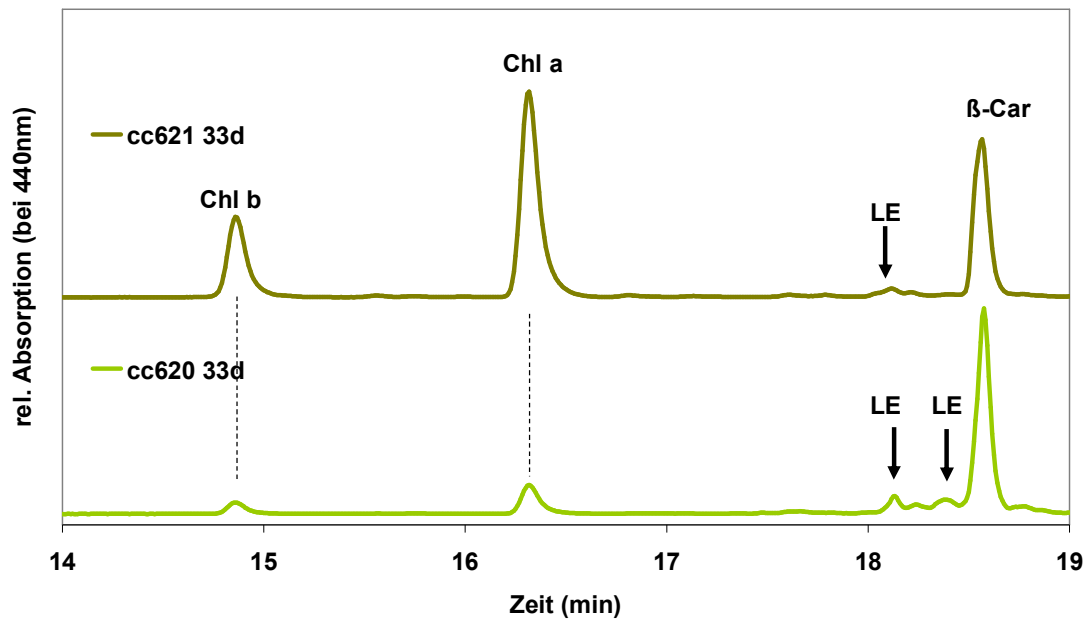


Abbildung III.3.5) HPLC-Chromatogramm von Pigmentextrakten 33 Tage alter Gameten (cc620 und cc621), gelagert im Dunkeln auf TAP-N-Platten: Hier wurden Luteinester (LE) detektiert. HPLC-Gradient 1B.

Auffällig ist, dass die putativen Luteinester knapp 10 % des Gesamtluteinanteils darstellen (Abb. III.3.6) und etwa 4 % am Gesamtcarotinoidgehalt. Dies würde bedeuten, dass ein wesentlicher Anteil des Luteins nicht mehr als freies Pigment vorliegt.

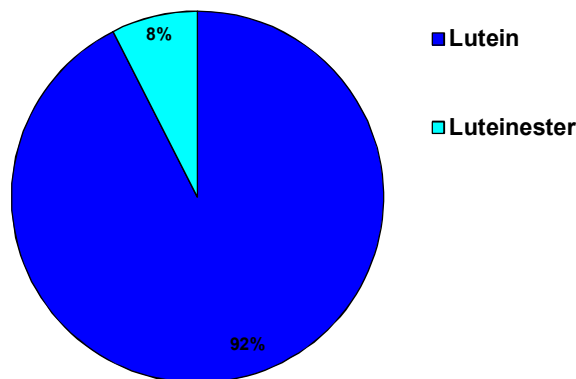


Abbildung III.3.6) Anteil der Luteinester am Gesamtluteingehalt in gealterten Gameten (cc620 und cc621) nach 33 Tagen Lagerung im Dunkeln auf TAP-N-Platten.

Auch bei weiteren Untersuchungen von gelagerten Gameten wurden diese putativen Luteinester beobachtet. Dabei gab es erste Hinweise, dass sie mit zunehmender Lagerdauer quantitativ anstiegen, so dass immer größere Anteile des Luteins in veresterter Form vorliegen würden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Pigmente aber nicht weiter charakterisiert.

3.2. Zygosporen von *C. reinhardtii*

Im Gegensatz zu den Gameten, bei denen im Laufe der Lagerung nur eine Verschiebung der Pigmentverhältnisse, aber keine Neubildung von weiteren Pigmenten stattfand, wurden im Laufe der Zygosporenreifung viele neue Pigmente beobachtet (Tab. III.3.3). So wurde der Pigmentgehalt der Zygosporen durch die Ketocarotinoide dominiert, jedes zweite Pigment in der Zelle war ein Ketocarotinoid. Dies führte zu einer Änderung der Zellfarbe hin zu einem kräftigen Orange. Der Anteil der Chlorophylle war außerordentlich reduziert, ihr Anteil lag bei unter 10 % des Gesamtpigmentgehaltes. Unter den PS-Carotinoiden war nun β -Carotin am häufigsten vertreten, gefolgt von den VAZ-Carotinoiden, Lutein und Neoxanthin.

Die Untersuchungen der Ketocarotinoidzusammensetzung zeigten, dass 4-Ketolutein mit 66 % den größten Anteil am Ketocarotinoidvorkommen besaß. Vor allem die Monoacyl-esterfraktion bestand überwiegend aus 4-Ketoluteinmonoacylestern.

Der Gehalt an Astaxanthin sowie an Canthaxanthin betrug 20 bzw. 14 % am Gesamtketocarotinoidvorkommen. Allerdings wurde Canthaxanthin ausschließlich als freies Pigment gefunden, währenddessen die wesentlichen Anteile des Astaxanthinvorkommens in der Diacyl-esterfraktion detektiert wurden.

		Zygosporen cc620 x cc621 33 Tage alt (Anteil in %)	Gameten MW cc620 + cc621 33 Tage alt (Anteil in %)
Chlorophylle	Chl a	7,3	24,7
	Chl b	1,7	9,1
PS-Carotinoide	Lutein	2,1	29,2
	beta-Carotin	11,4	20,5
	Violaxanthin	1,0	10,4
	Antheraxanthin	1,5	2,9
	Zeaxanthin	0,4	0,9
	Neoxanthin	1,1	2,3
Ketocarotinoide	4-Ketolutein	6,9	-
	4-K-Lut-Monoester	41,8	-
	Astaxanthin	8,6	-
	Asta-Monoester	0,1	-
	Asta-Diester	6,1	-
	Canthaxanthin	10,0	-
Summe		100	100
Verhältnis	β - zu α -Carotinoiden	0,96:1	1,29:1

Tabelle III.3.3) Prozentuale Zusammensetzung der Pigmente in Zygosporen (cc620 x cc621) und Gameten (Mittelwert aus cc620 und cc621). Alle Proben 33 Tage lang im Dunkeln bei 22 °C auf TAP-N-Plattenculturen gelagert, Datenbasis molare Werte, Zygosporen: Mittelwerte aus drei unabhängigen Plattenculturen, Gameten: Je eine Agarplattencultur pro Stamm.

3.2.1. Der zeitliche Verlauf der Zygotenreifung

Nachdem der Nachweis für die Ketocarotinoidbildung in Zygosporen von *C. reinhardtii* erbracht war, wurde der zeitliche Verlauf dieser Pigmentsynthese untersucht. Dazu wurden große Mengen an Zygoten (cc620 x cc621) hergestellt, nach unterschiedlichen Reifezeitpunkten geerntet und ihre Pigmentzusammensetzung untersucht.

Die Farbe der Zygoten änderte sich bereits wenige Tage nach der Paarung und der anschließenden Inkubation im Dunkeln bei 22 °C. Auf den Plattenkulturen war die Farbe der Zygosporen nur bedingt zu erkennen, da die ungepaarten Gameten mit ihrer grünlichen Farbe das Gesamtbild verfälschten. Daher wurden die Gameten abgespült, die Zygosporen geerntet und für Dokumentationszwecke eingengt. Im Vergleich zur Ausgangsprobe (T=0, d.h. 24 Stunden Paarung im Licht, noch nicht dunkel gestellt) ändert sich die Farbe im Wesentlichen zwischen Tag 6 und Tag 12 (Abb. III.3.7). Nach sechs Tagen im Dunkeln war noch eine überwiegend grünliche Farbe zu erkennen, ab Tag 8 änderte sich die Zellfarbe zu einem Orange, das nach zwölf Tagen kräftig ausgeprägt war.

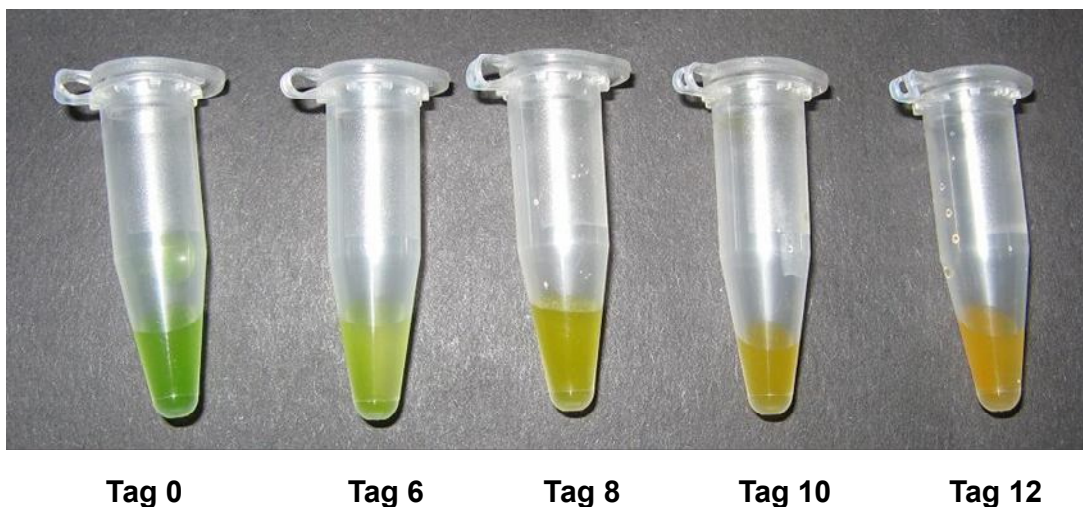


Abbildung III.3.7) Überblick über die Farbänderung von Zygosporen während der Reifung auf TAP-N-Agarplatten im Dunkeln. Abgeerntete Zygosporen wurden in TAP-N-Flüssigmedium resuspendiert. Als Tag 0 wurden Proben bezeichnet, die 24 Stunden im Licht gepaart, aber nicht Dunkel inkubiert wurden. Bei allen anderen Proben schloss sich an diese 24stündige Inkubation im Licht die Lagerung im Dunkeln über die beschriebene Dauer (6, 8, 10 oder 12 Tage) an.

Für die Untersuchungen dieser Zygotenreifung wurde eine Zeitreihe erstellt, bei der eine größere Menge an Zygosporen gepaart und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet wurde. Dabei wurde zu jedem Zeitpunkt neben einer Pigmentmessung auch eine Probe für TEM-Aufnahmen genommen. Es wurde immer eine einzelne Platte abgeerntet. Die geernteten Zygosporen wurden gezählt, eine kleine Menge auf einen Filter gesaugt und anschließend eingefroren. Die restlichen Zygosporen in Lösung wurden auf Eis gelagert, um mehrere Proben für die TEM-Aufnahmen parallel fixieren und bearbeiten zu können. Folglich

wurden die gesammelten Proben von T=0 bis T=6 am 6. Tag fixiert, die Proben T=8 bis T=12 am 12. Tag. An diesen beiden Messtagen wurde von jedem Ansatz eine weitere Probe der Zellen auf Filter gesaugt und mittels HPLC untersucht. Damit wurde überprüft, dass keine Änderung in der Pigmentzusammensetzung während der Lagerung auf Eis stattfand.

3.2.1.1. Zellmorphologische Änderungen während der Zygotenreifung

Der Verlauf der Zygotenreifung wurde mittels TEM-Aufnahmen durch Volker Schmitt dokumentiert (Abb. III.3.8). Die Bilder zeigten die Veränderung der Zellstrukturen, die während der Zellentwicklung vonstatten gingen, sehr deutlich. Die Probe T=0 stellte erneut den Ansatz dar, der unmittelbar nach der Paarung für 24 Stunden im Licht inkubiert worden war. Dort waren sehr deutlich die Thylakoidmembranen, große Stärkekörner und vermutlich erste Lipidtröpfchen zu erkennen. Die Zellen besaßen ausschließlich eine primäre Zygotenwand. Bereits nach 2 Tagen Inkubation im Dunkeln war eine sekundäre Zygotenzellwand zu erkennen. Die mit „Tag 1-2“ gekennzeichnete Probe stellte eine Zygote aus der „Tag 2“-Probe dar, allerdings schien die Entwicklung dieser Zelle verzögert, denn es war nur eine sehr dünne sekundäre Zellwand zu beobachten. Im Gegensatz zur „Tag 0“-Probe waren nach zwei Tagen weniger Stärkekörner, dafür aber mehr Lipidtröpfchen zu erkennen. Nach 4 Tagen waren nahezu keine Thylakoidmembranen mehr zu beobachten, die Zellen waren fast vollständig mit globulären Strukturen gefüllt, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Lipidtröpfchen handelte, die sich gegeneinander abplatteten. Einzelne Stärkekörner waren auch zu beobachten. Spätestens ab dem sechsten Reifungstag konnten keine wesentlichen morphologischen Unterschiede zu sehr lange gelagerten Zygosporien („Tag 49“) mehr beobachtet werden (Abb. III.3.8).

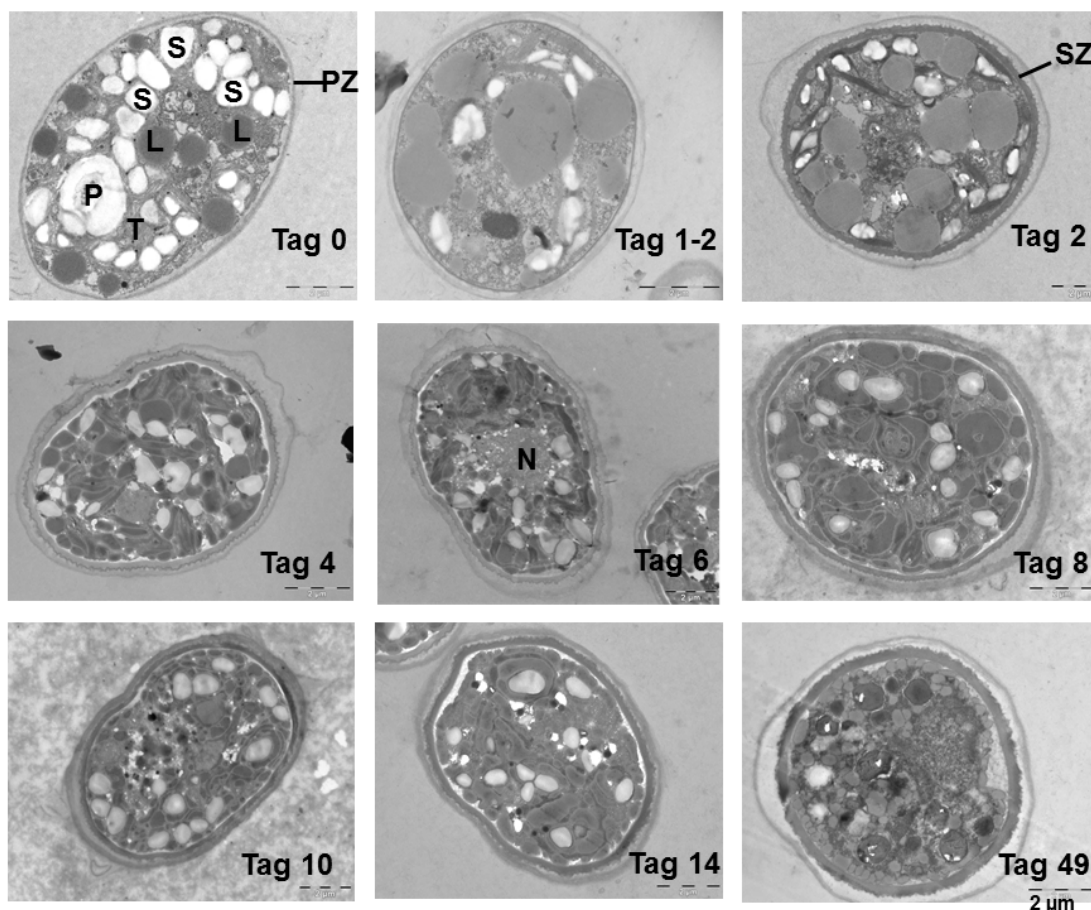


Abbildung III.3.8) Überblick über die zellmorphologischen Änderungen in den Zygoten von *C. reinhardtii* während der Reifung mittels TEM (Bilder: V. Schmitt). S: Stärkekorner, L: Lipidtröpfchen, P: Pyrenoid, T: Thylakoidmembranen, N: Nukleus, PZ: primäre Zellwand, SZ: sekundäre Zellwand.

3.2.1.2. Die Änderung der Pigmentzusammensetzung und -menge während der Zygotenreifung

3.2.1.2.1. Änderungen im Pigmentmuster

Die makroskopische sowie mikroskopische Betrachtung der Zygosporereifung wurde parallel mit Untersuchungen zum Pigmentgehalt der Zellen begleitet.

Wie oben beschrieben, wurden dazu zu jedem Zeitpunkt Zygosporen einer Agarplatte geerntet, ein Teil der Probe mittels HPLC (wasserfreies HPLC-Extraktionsmedium) untersucht und der Rest der Zellen auf Eis bis zum Fixierungstag gelagert. An diesem Tag wurde eine zweite Probe mittels HPLC (ebenfalls wasserfreies HPLC-Extraktionsmedium) untersucht. Nachdem sich zeigte, dass keine wesentliche Änderung im Pigmentgehalt zwischen den frisch geernteten und den auf Eis gelagerten Zellen stattfand (siehe Anhang 3.3), wurde diese zweite Messung als Duplikat für die Pigmentquantifizierung verwendet.

Bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass die Chlorophylle im Laufe der Zygosporereifung stark abgebaut wurden (Abb. III.3.9). Innerhalb von etwa zwei Wochen sank ihr Anteil auf weniger als 10 % der Ausgangsmenge. Der Anteil der photosynthetischen Carotinoide, also

der Carotinoide, die an der Photosynthese beteiligt sind und auch als Primärcarotinoide bezeichnet werden, sank auf unter 20 % der Ausgangsmenge. Der Gesamtcarotinoidgehalt lag dann bei etwa 75 % des Ausgangsgehaltes. Dies war auf die Bildung von Ketocarotinoiden zurückzuführen, die in dieser Zeitreihe erstmals nach vier Tagen detektiert wurden. Ihr Gehalt stieg im Laufe von etwa zwei Wochen auf 1 fmol pro Zelle an und überstieg nach dem 10. Reifungstag den Gehalt an PS-Carotinoiden.

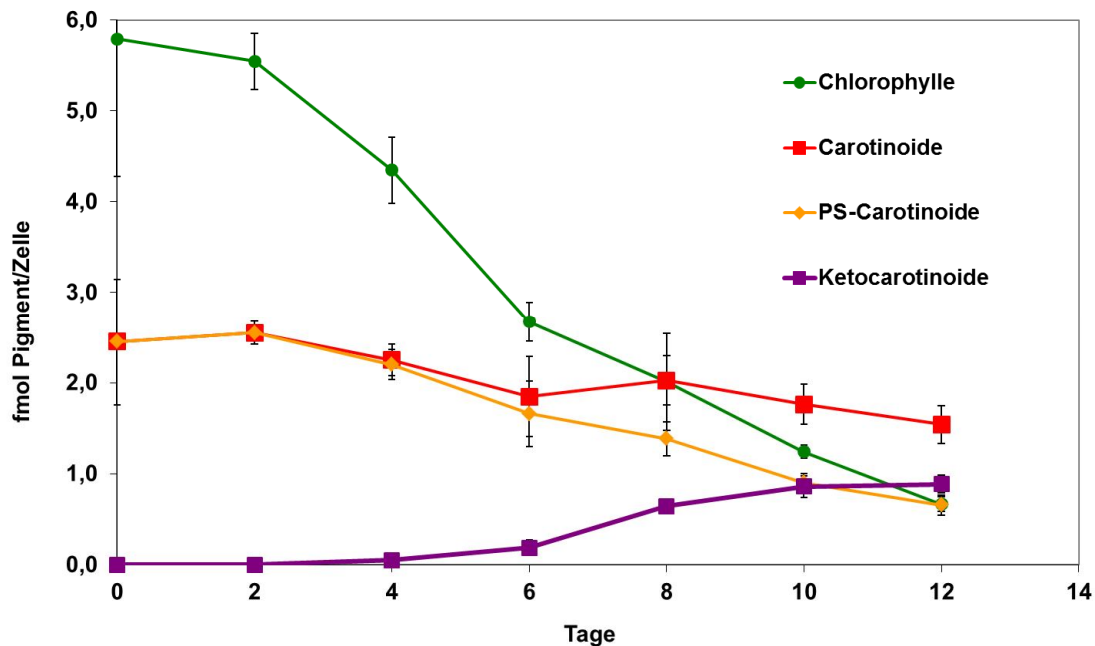


Abbildung III.3.9) Überblick über die Pigmentmengenänderung während der ersten zwölf Tage der Zygotenreife in *C. reinhardtii*, Lagerung der Zellen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten, Datenbasis der Fehlerberechnung: Zellen der gleichen Plattenkultur am Erntetag und am Fixierungstag in separaten HPLC-Messungen untersucht, einmalige Zellzahlbestimmung.

Für die detaillierte Bestimmung der Pigmentänderung im Laufe der Zygosporenreifung wurde die Zygosporenbildung bis zu 33 Tage nach Dunkelstellung untersucht. Dabei wurden die Daten so ausgewertet, dass die Menge der Pigmente pro Zygosporenzelle bestimmt wurde. Pro Messzeitpunkt wurden drei Platten einzeln abgeerntet, die Zygosporen gefiltert und mindestens eine Doppelbestimmung der Zellzahl jeder einzelnen Platte durchgeführt. Die Messwerte der drei Ansätze pro Messzeitpunkt wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet, die als Fehlerbalken in den Diagrammen dargestellt ist. Bei dieser Untersuchung zeigte sich erneut, dass die Chlorophyll im Laufe der Zygosporenreifung massiv abgebaut wurden (Abb. III.3.10). Innerhalb von etwa zwei Wochen sank ihr Anteil auf weniger als 5 % der Ausgangsmenge. Der Anteil der PS-Carotinoide sank auf unter 10 % der Ausgangsmenge. Der Gesamtcarotinoidgehalt lag dann bei etwa der Hälfte des Ausgangsgehaltes. Das war auf die Neusynthese von Ketocarotinoiden zurückzuführen, die in dieser Zeitreihe erstmals nach fünf Tagen detektiert wurden. Ihr Gehalt stieg im Laufe von etwa zwei Wochen auf 1,2 fmol pro Zelle an.

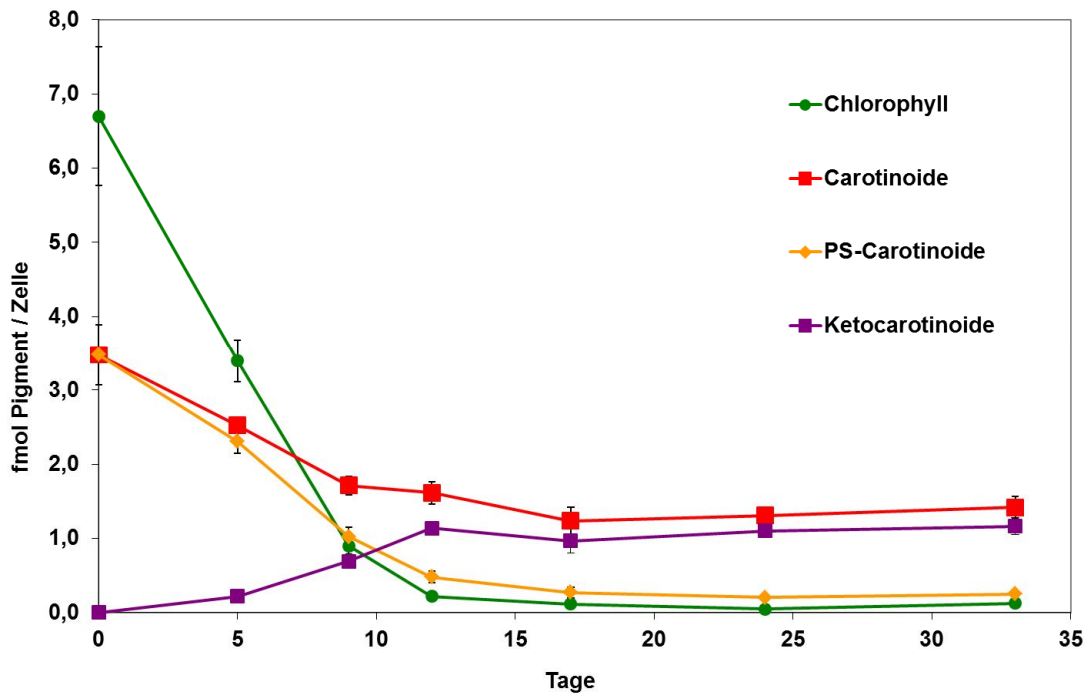


Abbildung III.3.10) Überblick über die Pigmentmengenänderung während der Zygotenreife in *C. reinhardtii* Lagerung der Zellen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten, Datenbasis der Fehlerberechnung: Zu jedem Zeitpunkt drei Plattenkulturen geerntet, jeweils unabhängige Zellzahlbestimmung und HPLC-Untersuchung.

Im Vergleich zur ersten Zeitreihe fällt auf, dass die Pigmentkonzentration zu Beginn der Zeitreihe etwas höher war. Während die Chlorophyllwerte noch innerhalb der Fehler-toleranzbereiche liegen, sind nun höhere Carotinoidkonzentrationen pro Zelle vorhanden. Ein möglicher Grund für die Abweichung kann in der geringeren statistischen Absicherung der ersten Zeitreihe liegen, bei der nur eine einzelne Platte untersucht wurde und einmalig die Zellzahlbestimmung für beiden HPLC-Untersuchungen durchgeführt wurde.

Der zeitliche Verlauf der Pigmentänderungen ist bei beiden Zeitreihen sehr ähnlich. Der Abbau der Chlorophylle war sehr stark, währenddessen der der Carotinoide prozentual wesentlich geringer war. Ab dem neunten Reifungstag überstieg der Carotinoidgehalt den Anteil der Chlorophylle. Geringe Mengen an Ketocarotinoiden wurden erstmals zum Zeitpunkt nach etwa vier bis fünf Tagen detektiert. Ab dem 12. Tag war der Ketocarotinoidgehalt deutlich höher als der der PS-Carotinoide.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fanden auch Untersuchungen zu Schwankungen in den Pigmentzusammensetzungen von Zygosporenkulturen des gleichen Paarungsansatzes statt. Diese sind in Anhang 3.3.2 dargestellt und zeigen, dass leichte Schwankungen auftreten. Diese können aber mit einem leicht unterschiedlichen Feuchtegehalt in den verschiedenen Agarplatten erklärt werden, die zu eine leicht verzögerten Reifung führen. Daher wurden alle Pigmentuntersuchungen, soweit möglich, als Duplikate oder Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

3.2.1.2.2. Änderungen in der Ketocarotinoidzusammensetzung

Die Änderung der Ketocarotinoidzusammensetzung während des Reifungsprozesses wurde zusätzlich detailliert untersucht (Abb. III.3.11 und III.3.12). Der Anteil des 4-Ketoluteins, summiert als freies wie auch als mit Fettsäuren verestertes Pigment, betrug konstant etwa zwei Drittel des Gesamtketocarotinoidgehaltes. Bezüglich der vom β -Carotin abgeleiteten Ketocarotinoide Canthaxanthin und Astaxanthin fiel auf, dass in den ersten Tagen zunächst Canthaxanthin nachzuweisen war und erst etwas später Astaxanthin (Abb. III.3.11). Nach etwa acht Tagen wurde der Anstieg des Canthaxanthingehaltes flacher, währenddessen die Menge an Astaxanthin deutlich anstieg und dann konstant höher als die Menge des Canthaxanthins war.

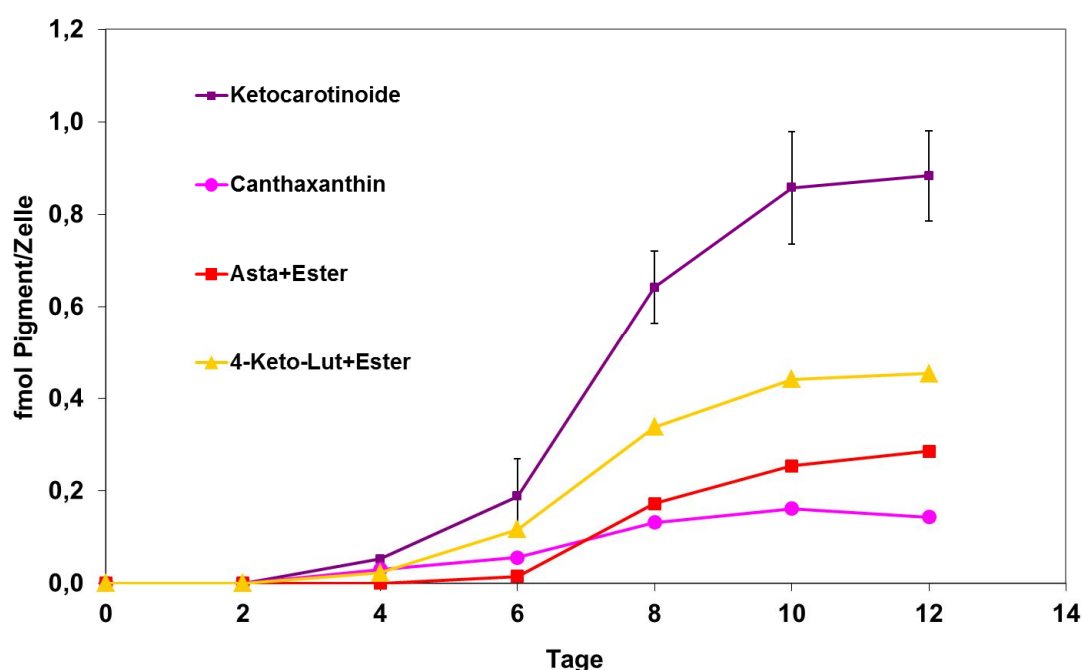


Abbildung III.3.11) Zeitlicher Verlauf des zellulären Ketocarotinoidgehaltes während der Zygotenreife in *C. reinhardtii*, Datenbasis der Fehlerberechnung: Zellen der gleichen Plattenkultur am Erntetag und am Fixierungstag in separaten HPLC-Messungen untersucht, einmalige Zellzahlbestimmung.

Die detaillierten Untersuchungen der zweiten Zeitreihe spiegelten die gleiche Entwicklung der Ketocarotinoidzusammensetzung wider (Abb. III.3.12). Nach zwei Wochen Zygotenreife war die Menge an Ketocarotinoide in der Zelle relativ konstant. 4-Ketolutein stellte mit etwa 60 % das häufigste Ketocarotinoid dar. Während Canthaxanthin zu Beginn der Zygotenentwicklung in höheren Konzentrationen als Astaxanthin vorlag, nahm es im Verhältnis zu Astaxanthin und 4-Ketolutein ab dem sechsten Reifungstag geringer zu und stellte nach etwa drei Wochen nur noch die Hälfte des Astaxanthingehaltes dar. Es schien, dass Canthaxanthin im Laufe der Zygotenreife sogar etwas abnahm, währenddessen die Astaxanthinkonzentration leicht anstieg. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass Canthaxanthin in der Zygote eine Synthesestufe des Astaxanthins darstellt.

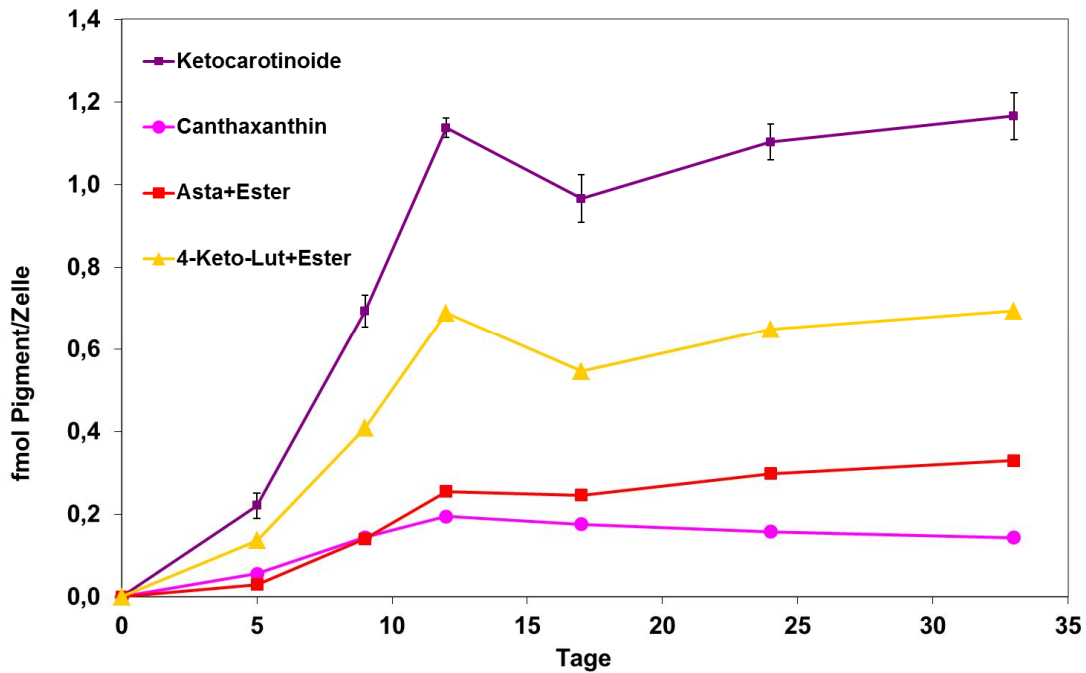


Abbildung III.3.12) Zeitlicher Verlauf des zellulären Ketocarotinoidgehaltes während der Zygotenreife in *C. reinhardtii*, Datenbasis der Fehlerberechnung: Zu jedem Zeitpunkt drei Plattenkulturen geerntet, jeweils unabhängige Zellzahlbestimmung und HPLC-Untersuchung.

Zusätzlich wurde auch die zeitliche Entwicklung des Verhältnisses der Ketocarotinoide in der *cis*- sowie *all-trans*-Konformation untersucht (Abb. III.3.13). Der Anteil der Ketocarotinoide, die in der *cis*-Konformation vorlagen, steigerte sich im Laufe der Zygotenentwicklung. Dabei wurde aber auch deutlich, dass 4-Ketolutein überwiegend in der *cis*-Konformation vorlag, während bei Astaxanthin und Canthaxanthin die *all-trans*-Konformation dominierte.

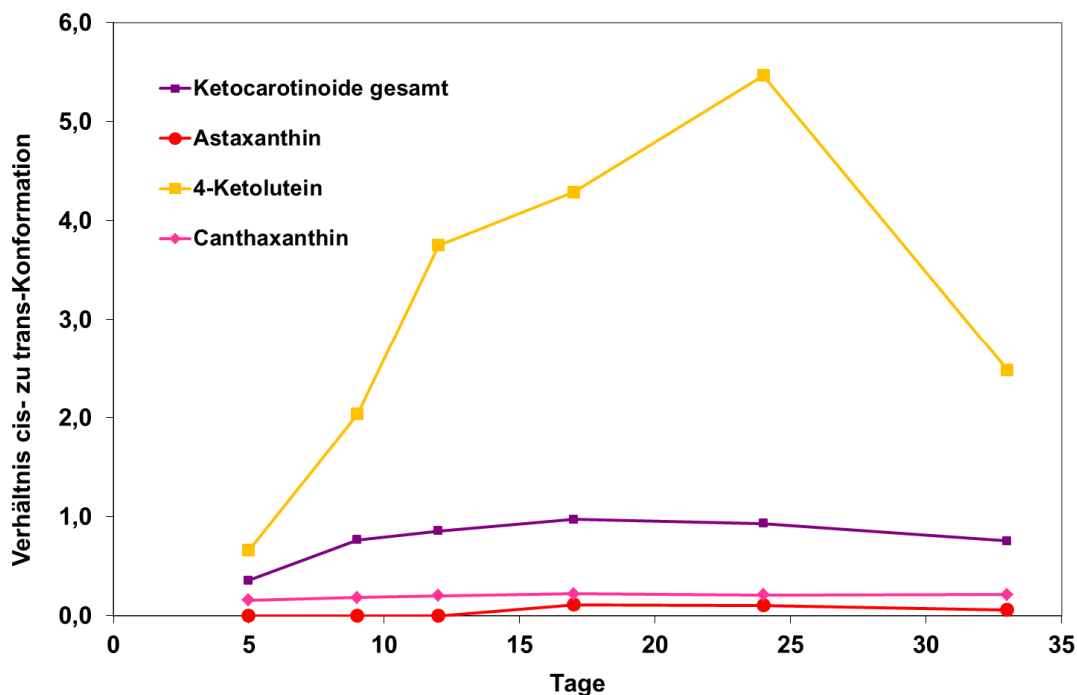


Abbildung III.3.13) Zeitlicher Verlauf des Verhältnisses von Ketocarotinoiden in der *cis*- zu *all-trans*-Konformation während der Zygotenreife in *C. reinhardtii*.

3.2.1.2.3. Änderungen in den Pigmentverhältnissen

Das Auftreten von großen Mengen an 4-Ketolutein wurde in ketocarotinoidproduzierenden Grünalgen bisher selten nachgewiesen. Hauptsächlich findet man Astaxanthin, das sich, im Gegensatz zum 4-Ketolutein vom β -Carotin und nicht vom α -Carotin ableitet. Bei *H. pluvialis* steigt der Anteil des β -Carotinoid- zu α -Carotinoid-Verhältnis im Laufe der Aplanosporentwicklung deutlich an (20:1). Daher wurde für *C. reinhardtii* eine Entwicklung des β -Carotinoid- zu α -Carotinoidverhältnisses genauer untersucht. Dazu wurde dieses Verhältnis getrennt für Gesamtcarotinoidgehalt, PS-Carotinoidgehalt und für Ketocarotinoidgehalt bestimmt (Abb. III.3.14). Die Verhältnisse der PS-Carotinoide zu späten Reifungszeitpunkten unterlagen größeren Schwankungen, da aufgrund der geringen Gehalte dieser Pigmente nur eine näherungsweise Quantifizierung möglich war.

Die Daten zeigten, dass das β - zu α -Verhältnis sowohl für Gesamtcarotinoide als auch für die Ketocarotinoide nach ca. 12 Tagen Zygosporereifung konstant blieb. Das β - zu α -Verhältnis der Ketocarotinoide war geringer als das der Gesamtcarotinoide, so dass im Verhältnis die Ketocarotinoide aus mehr α -Carotinoiden bestanden als die PS-Carotinoide. Deren β - zu α -Verhältnis stieg deutlich an, allerdings hatte dies nur geringe Auswirkungen auf das Verhältnis der Gesamtcarotinoide, da der Anteil der PS-Carotinoide am Gesamtcarotinoidgehalt deutlich abnahm (Abb. III.3.10).

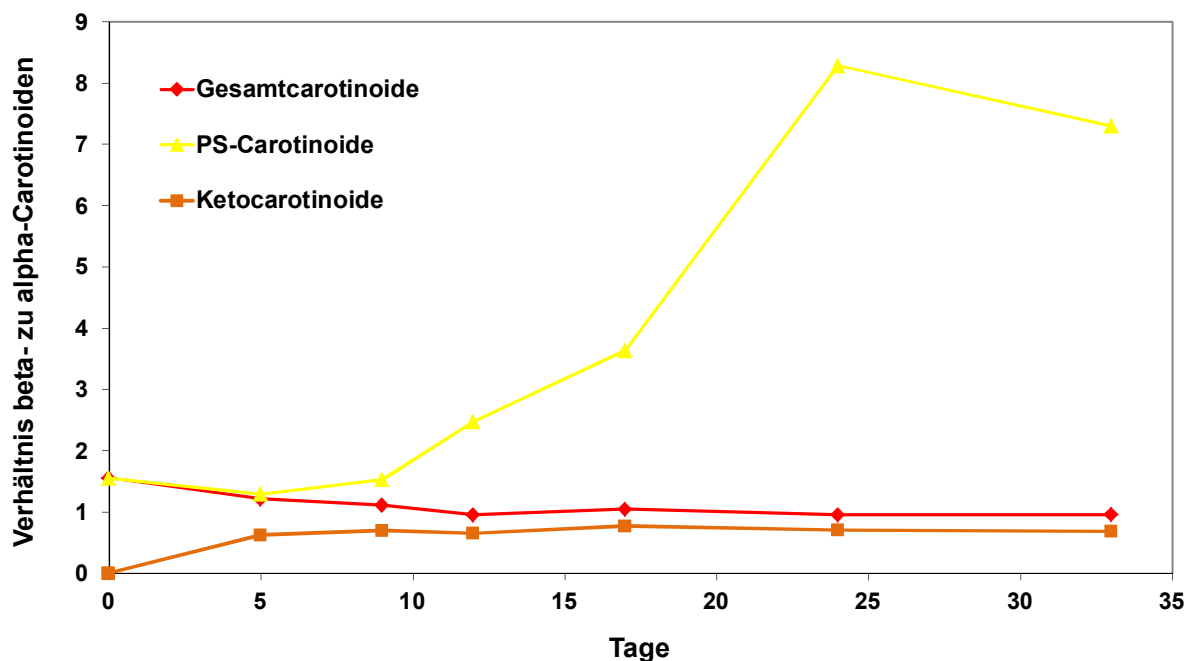


Abbildung III.3.14) Verhältnis von beta- zu alpha-Carotinoiden während der Zygosporereifung von *C. reinhardtii* (cc620 x cc621), Mittelwerte aus drei Proben eines Paarungsansatzes zu jedem Zeitpunkt (separate Zellzahl-Bestimmung sowie HPLC-Messung).

Des Weiteren wurde auch eine Verschiebung der Chlorophyllverhältnisse während der Zygotenreifung beobachtet. Dabei stieg das Verhältnis Chl a/ Chl b an, so dass der Anteil des Chlorophyll a zunahm bzw. der Anteil des Chlorophyll b abnahm (Abb. III.3.15).

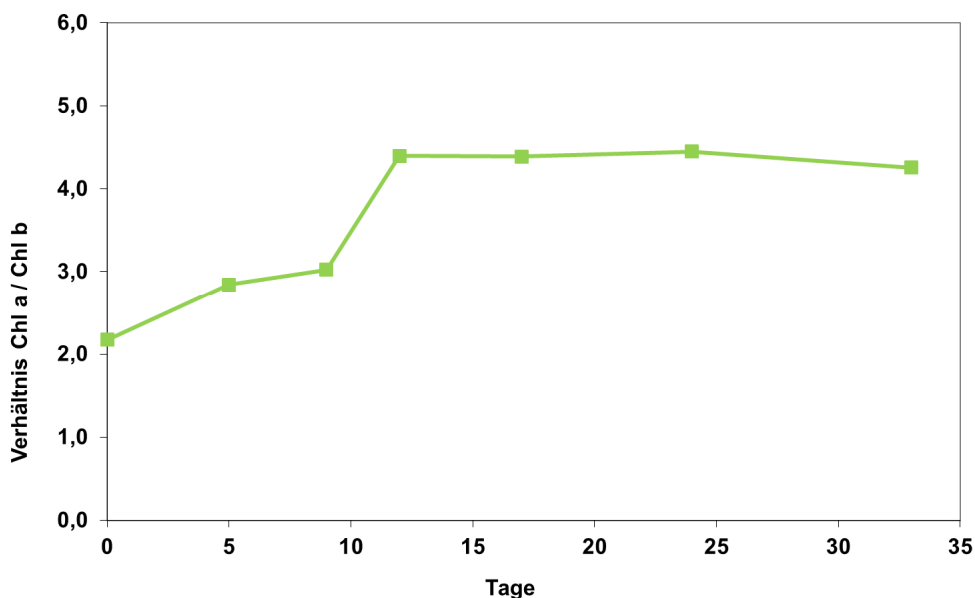


Abbildung III.3.15) Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b während der Zygosporereifung von *C. reinhardtii* (cc620 x cc621), Mittelwerte aus drei Proben eines Paarungsansatzes zu jedem Zeitpunkt (separate Zellzahl-Bestimmung sowie HPLC-Messung).

Neben den Verhältnissen zwischen α - sowie β -Carotinoiden wurden auch die Entwicklungen innerhalb der α - bzw. β -Carotinoiden untersucht.

Die bisherigen Daten zeigten, dass in der Reifungsuntersuchung Canthaxanthin vor Astaxanthin gebildet wird. In der vorliegenden Darstellung wird aber auch deutlich, dass die Abnahme von β -Carotin der Zunahme von Canthaxanthin entspricht (Abb. III.3.16). Des Weiteren entspricht die Bildung von Astaxanthin, sowohl als freies wie auch als verestertes Pigment, etwa der Hälfte der Pigmentmengenabnahme der Pigmentsummen von Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin (VAZ).

Innerhalb der α -Carotinoide wird ersichtlich, dass die Menge des gebildeten 4-Ketolutein, zusammengesetzt aus freiem wie auch mit Fettsäuren verestertem Pigment, etwa zu zwei Dritteln der Abnahme des Luteins entspricht (Abb. III.3.17).

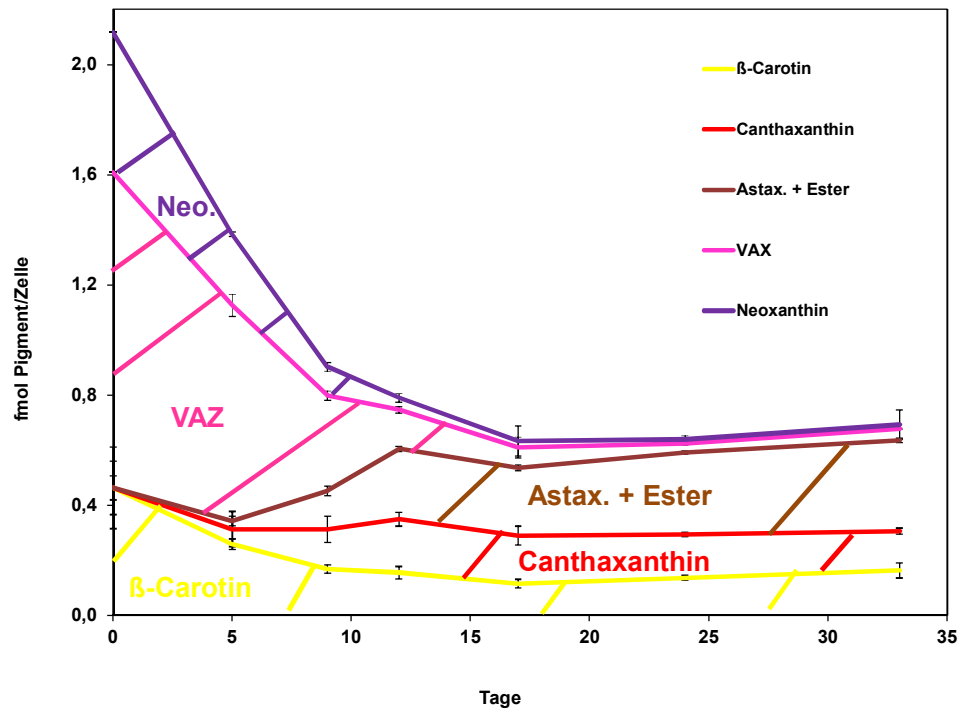


Abbildung III.3.16) Überblick über die Änderung der verschiedenen beta-Carotinoide während der Zygotenreife in *C. reinhardtii*, Lagerung der Zellen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten, Datenbasis der Fehlerberechnung: Zu jedem Zeitpunkt drei Plattenkulturen geerntet, jeweils unabhängige Zellzahlbestimmung und HPLC-Untersuchung.

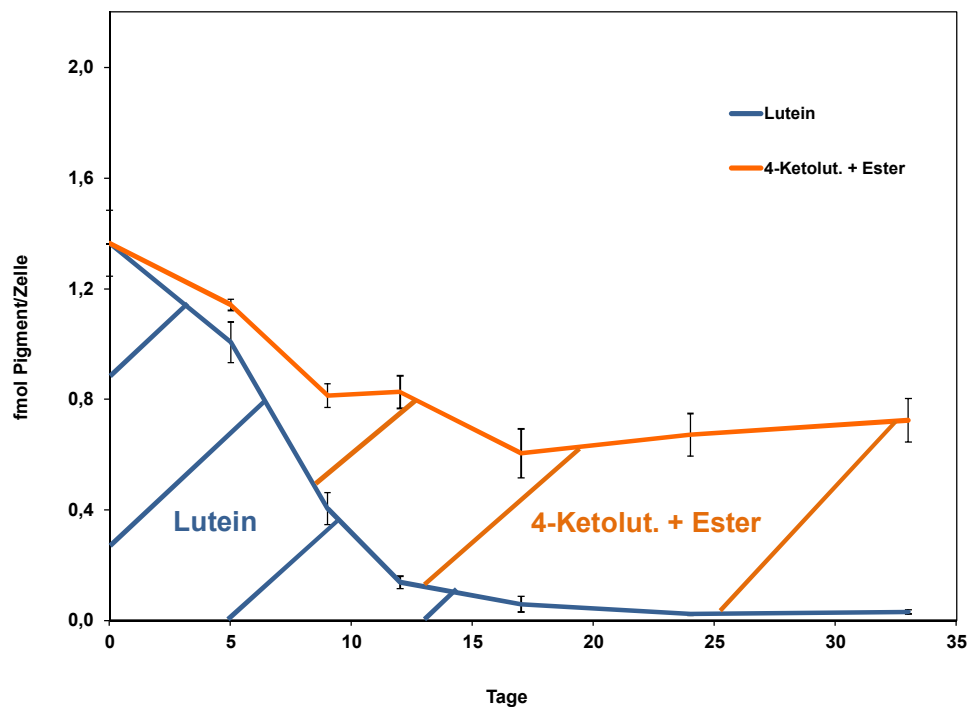


Abbildung III.3.17) Überblick über die Änderung der verschiedenen alpha-Carotinoide während der Zygotenreife in *C. reinhardtii*, Lagerung der Zellen bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten, Datenbasis der Fehlerberechnung: Zu jedem Zeitpunkt drei Plattenkulturen geerntet, jeweils unabhängige Zellzahlbestimmung und HPLC-Untersuchung

3.3. Übersicht über die Pigmentzusammensetzung verschiedener Zellstadien von *C. reinhardtii* sowie der Aplanosporen von *H. pluvialis*

Im folgenden Kapitel werden die Pigmentzusammensetzungen von verschiedenen Zellstadien der Grünalge *C. reinhardtii* sowie den Aplanosporen von *H. pluvialis* gegenübergestellt, so dass die in den vergangenen Kapiteln beschriebenen Unterschiede noch einmal verdeutlicht werden. Die Ketocarotinoidbildung ist in *C. reinhardtii* auf das Zellstadium Zygosporien beschränkt. Die Gameten dieser Alge zeigen zwar auch eine Änderung in der Pigmentzusammensetzung im Vergleich zu den vegetativen Zellen, allerdings werden in den Gameten keine neuartigen Pigmente gebildet. Hier ist der Mittelwert der 33 Tage lang gelagerten Gameten von cc620 und cc621 dargestellt, da die Mischung dieser beiden Gameten die Pigmentbasis für die Zygoten darstellen, da immer Partner beider Stämme zu einer Zygote verschmelzen.

Die Ketocarotinoidzusammensetzung der Zygosporien von *C. reinhardtii* und die der Aplanosporen von *H. pluvialis* unterscheiden sich deutlich. Während in *C. reinhardtii* das Ketocarotinoid 4-Ketolutein dominiert, wird in *H. pluvialis* überwiegend Astaxanthin detektiert.

		<i>C. reinhardtii</i>				<i>H. pluvialis</i>
		veg. Zellen cc620 6Tage alt	veg. Zellen cc621 6Tage alt	Gameten MW cc620,cc621 33 Tage alt	Zygosporien cc620 x cc621 33 Tage alt	Aplanosporen SAG 192.80 35 Tage alt
Chlorophylle	Chl a	50,0	52,4	24,7	7,3	16,5
	Chl b	21,2	22,2	9,1	1,7	4,7
PS-Carotinoide	Lutein	11,9	9,3	29,2	2,1	3,7
	beta-Carotin	7,0	5,4	20,5	11,4	6,0
	Violaxanthin	4,0	5,6	10,4	1,0	0,6
	Antheraxanthin	0,5	0,4	2,9	1,5	-
	Zeaxanthin	-	-	0,9	0,4	0,1
	Neoxanthin	5,4	4,7	2,3	1,1	0,8
Ketocarotinoide	4-Ketolutein	-	-	-	6,9	-
	4-K-Lut-Monoester	-	-	-	41,8	-
	Astaxanthin	-	-	-	8,6	0,3
	Asta-Monoester	-	-	-	0,1	51,9
	Asta-Diester	-	-	-	6,1	13,9
	Canthaxanthin	-	-	-	10,0	1,4
Summe		100	100	100	100	100
Verhältnis	β- zu α-Carotinoiden	1,42:1	1,72:1	1,29:1	0,96:1	20,3 : 1

Tabelle III.3.4) Prozentuale Zusammensetzung der Pigmente von *C. reinhardtii* sowie von *H. pluvialis*.
C. reinhardtii: Vegetative Zellen: 6 Tage alte TAP-Schüttelkulturen, Lagerung bei 18 °C und 60 μmol Photonen·m⁻²s⁻¹, Gameten: MW aus cc620 und cc621, 33 Tage lang im Dunkeln bei 22 °C auf TAP-N-Plattenkulturen gelagert, Zygosporien (cc620 x cc621), 33 Tage lang im Dunkeln bei 22 °C auf TAP-N-Plattenkulturen gelagert.
H. pluvialis: Aplanosporen 35 Tage in Desmidiaceen-Medium in Standkultur bei 30 μmol Photonen·m⁻²s⁻¹ und 18 °C gelagert. Datenbasis molare Werte.

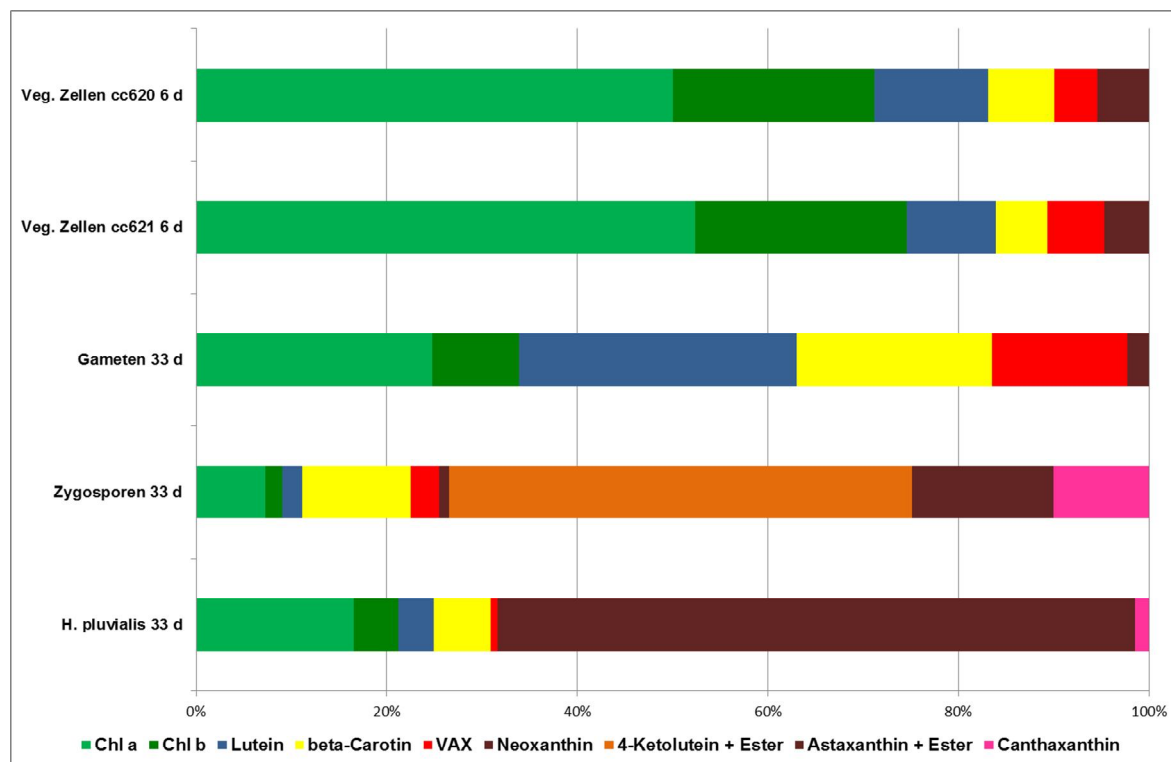


Abbildung III.3.18) Überblick über die Pigmentzusammensetzung in verschiedenen Zellstadien von *C. reinhardtii* sowie von *H. pluvialis*.

***C. reinhardtii*:**

Vegetative Zellen: 6 Tage alte TAP-Schüttelkulturen, Lagerung bei 18 °C und 60 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Gameten: MW aus cc620 und cc621, 33 Tage lang im Dunkeln bei 22 °C auf TAP-N-Plattenkulturen gelagert,

Zygosporen (cc620 x cc621), 33 Tage lang im Dunkeln bei 22 °C auf TAP-N-Plattenkulturen gelagert.

***H. pluvialis*:**

Aplanosporen 35 Tage in Desmidiaceen-Medium in Standkultur bei 30 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und 18 °C gelagert.

Datenbasis molare Werte.

4. Der Einfluss des Inhibitors Norflurazon auf die Zygotenentwicklung von *C. reinhardtii*

Nachdem der zeitliche Verlauf der Ketocarotinoidsynthese genauer untersucht wurde, stellte sich die Frage nach den Vorläuferpigmenten der Ketocarotinoide in den Zellen. Zentrale Fragestellung war im Folgenden, ob die Ketocarotinoide de novo synthetisiert wurden oder bereits in der Zelle vorhandene Carotinoide als Vorläufer dienen konnten.

Nachdem in den Untersuchungen zur Zygotenreifung aufgezeigt wurde, dass der Gesamtcarotinoidgehalt in den Zygosporien sank und die PS-Carotinoidkonzentrationen zugunsten der Ketocarotinoidmengen abnahmen, wurde vermutet, dass gar keine Neusynthese der Substrate erfolgen musste. Vielmehr könnten die Carotinoide, die infolge des Thylakoidabbaus frei wurden, zu Ketocarotinoiden umgewandelt werden.

Um diese Idee zu untersuchen, wurde ein Versuchsaufbau mit Zugabe des Inhibitors Norflurazon entwickelt. Norflurazon wirkt als Inhibitor auf das Enzym Phytoendesaturase über eine nicht-kompetitive Hemmung (Sandmann et al. 1989). Dabei verhindert es die Synthese von Lycopin, welches durch eine mehrfache Desaturierung des Phytoens gebildet wird. Somit wird eine Neusynthese von Carotinoiden verhindert. Dies führt dazu, dass nur noch solche Carotinoide als BKT-Substrat dienen können, die bereits in der Zelle vorhanden sind.

4.1. Der Einfluss von Norflurazon auf die Pigmentzusammensetzung während der Zygotenreifung

Für dieses Experiment wurden erneut Gameten der Stämme cc620 und cc621 miteinander gekreuzt und die frisch gepaarten Zygoten (2 h Lichtinkubation) auf TAP-N-Agarplatten gegeben. Diese waren zusätzlich mit 5 μM , 10 μM oder 25 μM Norflurazon behandelt. Als Kontrolle dienten Platten, die mit Ethanol, dem Lösungsmittel des Norflurazons, bestrichen waren („Ethanol“) sowie Platten, die keine weiteren Zusätze enthielten („Kontrolle“).

Die Ansätze wurden für 24 Stunden im Licht (Tag 0-Probe) und anschließend für 3, 5 sowie 8 Wochen im Dunkeln inkubiert. Zu jedem Messzeitpunkt wurden zwei Platten jedes Ansatzes geerntet, die Zellzahlbestimmung mindestens im Duplikat durchgeführt und die Pigmente extrahiert.

Zum Zeitpunkt 0, d.h. nach 24 Stunden Inkubation der Plattenkulturen im Licht, zeigten alle Ansätze eine ähnliche Pigmentzusammensetzung (Abb. III.4.1). Geringe Mengen von Phytoen konnten bei allen Norflurazonproben nachgewiesen werden. Dieses häuft sich im Carotinoidbiosyntheseweg an, wenn das Norflurazon durch die Inhibition der Phytoendesaturase einen Einfluss auf die Zellen ausübt. Allerdings wurde keine von der Norflurazonkonzentration abhängige Anhäufung des Phytoens beobachtet.

Nach drei Wochen Lagerung der Zellen im Dunkeln zeigte sich bei der Kontrolle eine für reife Zygosporen typische Pigmententwicklung. Die PS-Carotinoide hatten abgenommen, während die Ketocarotinoide stark angestiegen waren. Sie stellten die mengenmäßig größte Pigmentgruppe in den Zygosporen dar. Bei den Inhibitoransätzen konnte eine leichte Akkumulation von Phytoen beobachtet werden, so dass der hemmende Effekt des Norflurazons auf die Phytoendesaturase sichtbar war. Zusätzlich zeigten sie ebenfalls eine deutliche Akkumulation an Ketocarotinoiden und belegten somit, dass trotz Inhibitoreinfluss eine Synthese von Ketocarotinoiden möglich war. Somit schien es, als ob die vorhandenen PS-Carotinoide als Ketocarotinoidvorstufen dienen konnten. Im Vergleich zu den Kontrollproben waren in den Inhibitoransätzen jedoch die Ketocarotinoidkonzentrationen nur etwa so hoch wie die Mengen an PS-Carotinoiden und damit deutlich geringer als bei der Kontrolle. Auch stellten in diesen Zellen die Chlorophylle immer noch die größte Pigmentfraktion dar. Allerdings wurde die gleiche Pigmentzusammensetzung bei der Ethanolkontrolle beobachtet.

Nach 5 Wochen Inkubation der Zygoten im Dunkeln zeigte sich ein ähnliches Bild wie nach drei Wochen, allerdings wurde in allen Ansätzen eine Zunahme der Ketocarotinoidmengen und eine Abnahme sowohl der Chlorophyll- wie auch der PS-Carotinoidmengen beobachtet. Die Inhibitoransätze und die Ethanolkontrolle zeigten eine größere Menge an Ketocarotinoiden, allerdings wiesen sie im Verhältnis noch höhere Chlorophyll- und PS-Carotinoidanteile auf als der Kontrollansatz.

Die 8 Wochen alten Proben zeigten im Wesentlichen ein sehr ähnliches Bild wie die 5 Wochen alten Proben. Bei allen Ansätzen war eine deutliche Ketocarotinoidakkumulation zu beobachten, die sich zwischen der 5. und 8. Woche nicht mehr wesentlich gesteigert hatte. Allerdings besaßen sowohl die Ethanolkontrolle als auch alle Inhibitoransätze weiterhin größere Mengen an Chlorophyllen und PS-Carotinoiden als die Kontrolle ohne Ethanol- oder Norflurazonzusatz. Die Phytoenkonzentrationen der Inhibitoransätze waren über alle gemessenen Zeitpunkte ähnlich.

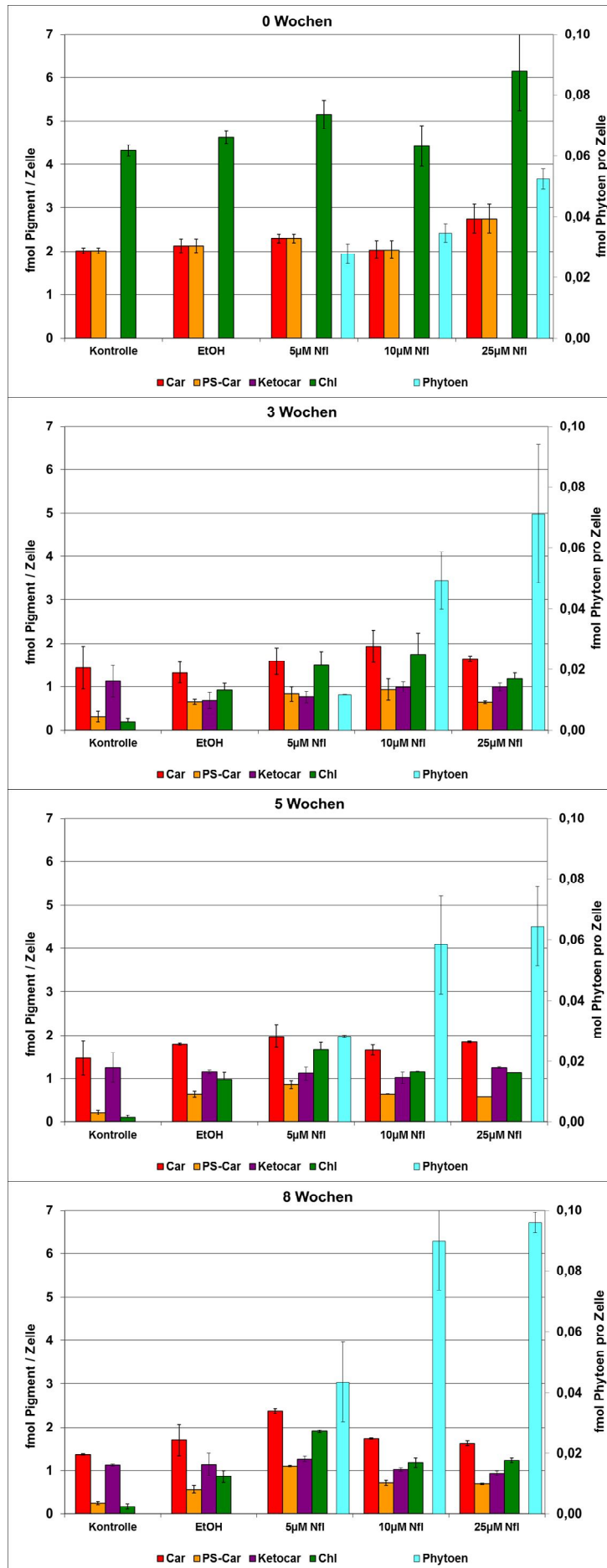


Abb. III.4.1) Pigmentzusammensetzung der Zygosporen von *C. reinhardtii* unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen des Inhibitors Norflurazon, Phytoengehalt ist auf der sekundären Vertikalachse dargestellt.

Inkubation der Zellen im Dunkeln bei 22 °C auf TAP-N-Agrplatten, Kontrolle: Ohne Zusatz von Ethanol oder Norflurazon, Ethanol: Zusatz von Ethanol (Lösungsmittel des Inhibitors), 5 µM Nfi: 5 µM Norflurazon, 10 µM Nfi: 10 µM Norflurazon, 25 µM Nfi: 25 µM Norflurazon. Fehlerberechnung: Für jeden Ansatz wurden von zwei Agarplatten separat die Zellzahl und die Pigmentmengen bestimmt.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass trotz Inhibitoreinfluss, dessen erfolgreiche Hemmung der Phytoendesaturase durch den Phytoennachweis belegt wurde, eine Synthese und Akkumulation von Ketocarotinoiden in den Zygosporen nachzuweisen war. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die in den Zellen vorhandenen PS-Carotinoide zumindest teilweise als Ketocarotinoidvorstufen dienen können.

5. Einfluss des Nährmediums auf die Zygotenreife von *C. reinhardtii*

Die Reifung der Zygoten von *C. reinhardtii* wurde gemäß verschiedener Protokolle auf TAP-N-Medium durchgeführt. Es war bekannt, dass *C. reinhardtii* im Dunkeln sowohl überleben als auch wachsen kann, wenn dem Medium Acetat zugefügt wurde. Da diese Nährstoffversorgung in der Natur fraglich ist, wurde die Zygosporenreifung unter Abwesenheit einer organischen Kohlenstoffquelle untersucht. Dazu wurde Minimalmedium verwendet, da dieses keine Zusätze enthielt, die *C. reinhardtii* als alternative Energiequelle dienen konnten. So waren rein autotrophe (Wachstums-) Bedingungen gegeben.

5.1. Morphologische Besonderheiten von auf Minimalmedium gereiften Zygoten

Für diese Untersuchungen wurden vegetative Zellen der Stämme cc620 und cc621 gemäß dem Protokoll aus Kapitel II.2.5.1.1-II.2.5.1.3 gepaart und auf MIN-N-Agarplatten für 5 Monate im Dunkeln inkubiert (Kapitel II.2.5.1.5). Eine erfolgreiche Zygotenbildung und -reifung wurde durch auf TAP-N-Agarplatten gelagerten Zygoten kontrolliert. Die mikroskopische Untersuchung dieser Zygoten erfolgte zum einen mittels DIK-Mikroskop, zum anderen mittels TEM.

Im DIK-Mikroskop waren intakte Zellen zu erkennen, die aber ein hyalines Aussehen zeigten. Der Chloroplast schien etwas verkleinert. Kleine globuläre Strukturen waren zu erkennen (Abb. III.5.1).

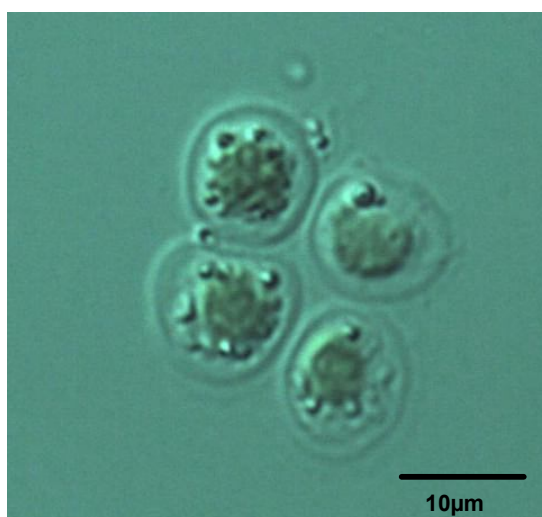


Abbildung III.5.1) DIK-Aufnahmen Zygosporen von *C. reinhardtii* auf MIN-N-Platten, Zygosporen: Stämme cc620 x cc621, 5 Monate lang auf MIN-N-Platten im Dunkeln bei 22 °C gelagert.

Bei Untersuchungen im TEM konnten deutliche Unterschiede zu Zygosporen beobachtet werden, die den gleichen Zeitraum auf dem acetathaltigen TAP-N-Medium gelagert wurden (Abb. III.5.2). Es fehlte die sekundäre Zellwand und nur wenige Lipidtröpfchen waren zu erkennen. Im Vergleich zu völlig abgestorbenen Zygoten wie den *lor1*-Mutanten E3.6 x C12

konnten in den auf MIN-N-Medium inkubierten Zygoten aber mehr intakte zelluläre Strukturen erkannt werden. Allerdings erinnerten diese Zellen an Zygoten, die in einem frühen Reifestadium die Entwicklung abgestoppt hatten.

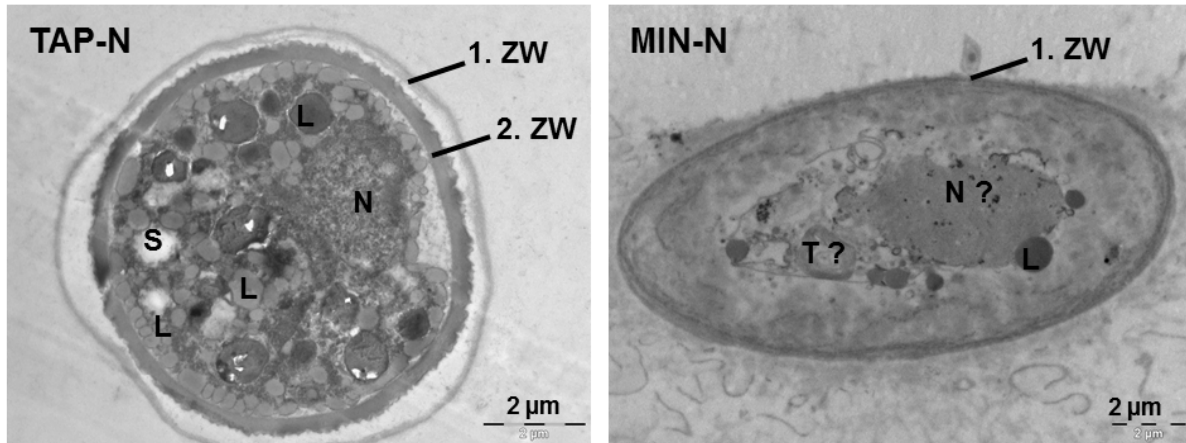


Abbildung III.5.2) TEM-Aufnahmen von Zygosporen, inkubiert auf verschiedenen Medien:
 Links: Zygosporen auf TAP-N-Agarplatten, 7 Wochen im Dunkeln bei 22 °C gelagert;
 Rechts: Zygosporen auf MIN-N-Agarplatten 9 Monate bei 22 °C im Dunkeln gelagert;
 1. ZW: Primäre Zellwand, 2. ZW: Sekundäre Zellwand, L: Lipidtröpfchen, S: Stärkekörner, N: Nukleus,
 T: Thylakoidmembranen (Bilder V. Schmitt).

Die fehlende sekundäre Zellwand steht auch mit der Beobachtung in Zusammenhang, dass diese Zellen keine Stabilität gegenüber dem Lösungsmittel Methanol aufwiesen.

5.2. Pigmentzusammensetzung von auf Minimalmedium gereiften Zygoten

Die auf MIN-N-Medium gelagerten Zygoten wurden mittels HPLC untersucht. Dazu wurden die Pigmente gemäß Standardprotokoll (Kapitel II.3.1.5) extrahiert. Die MIN-N-Zygoten zeigten eine Pigmentzusammensetzung, bei der die Chlorophylle dominierten (Abb. III.5.3). Bei den Carotinoiden dominierten Lutein und β -Carotin, Neoxanthin und Violaxanthin wurden zusätzlich detektiert. Es wurden keine Ketocarotinoide nachgewiesen. Folglich kam diese Pigmentzusammensetzung der aus vegetativen Zellen oder Gameten sehr nahe.

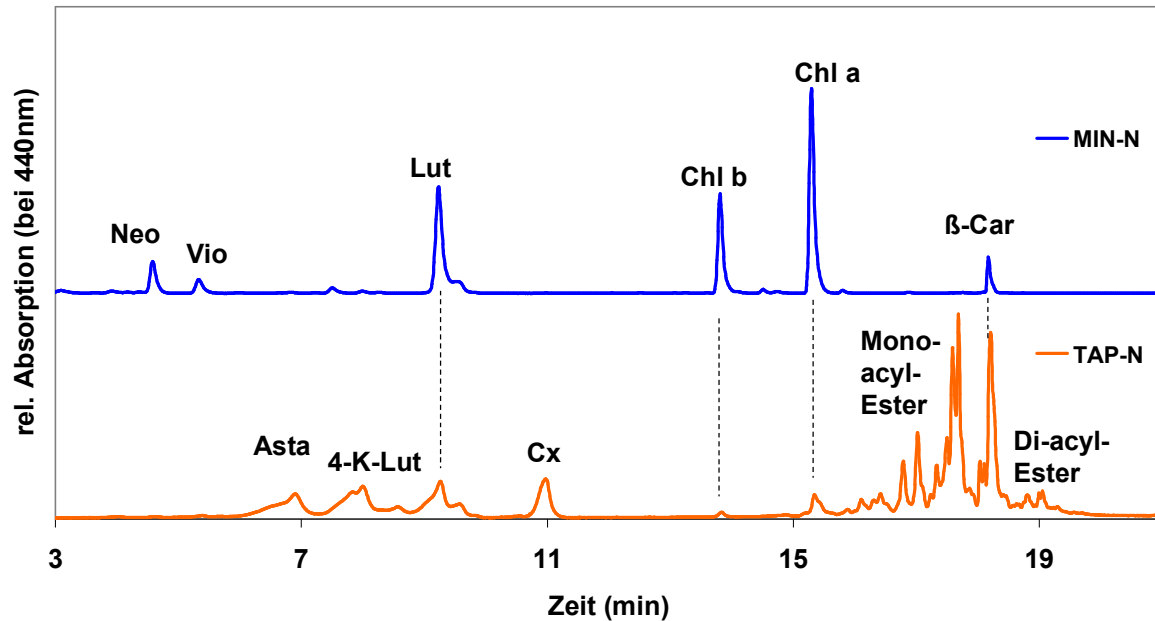


Abbildung III.5.3) HPLC-Chromatogramm von Pigmentextrakten aus Zygosporen von *C. reinhardtii* nach Reifung auf verschiedenen Medien.
 Stämme cc620 mt+ x cc621 mt-; 5 Monate lang gelagert bei 22 °C im Dunkeln auf Agarplatten.
 Oben: MIN-N-Medium; Unten: TAP-N-Medium, HPLC-Gradient 1B.

Somit konnte beobachtet werden, dass die auf MIN-N-Medium gereiften Zygoten von *C. reinhardtii* keine sekundäre Zellwand und nur wenige Lipidtröpfchen ausbildeten. Es wurden keine Ketocarotinoide detektiert. Folglich schien die Reifung in diesen Zygoten in einem sehr frühen Stadium unterbrochen. Daher kann postuliert werden, dass Acetat für eine Zygotenreifung im Dunkeln essentiell ist. Dies könnte bedeuten, dass das Acetat für die sekundäre Zellwandsynthese und / oder die Lipidsynthese benötigt wird.

6. Der Einfluss verschiedener Lagerungstemperaturen auf die Zygoten von *C. reinhardtii*

In den ersten Experimenten zur Zygosporienbildung bei *C. reinhardtii* wurden Protokolle verwendet, die eine Lagerung der Zellen bei 22 °C vorsahen. Nachdem die Zygosporienbildung bei dieser Temperatur erfolgreich nachgewiesen war, wurden die frisch gepaarten Zygoten auch bei anderen Temperaturen gelagert. Die Zellen wurden sowohl bei deutlich kühleren Temperaturen (6 - 9 °C) als auch bei deutlich höheren Temperaturen (30 °C bzw. 37 °C) inkubiert.

6.1. Die Lagerung bei 9 °C

Mit den Experimenten zur Zygosporienreife bei kühlen Temperaturen wurde untersucht, ob sich unter diesen Bedingungen Zygosporien entwickeln konnten. Lagerbedingungen von 9 °C stellen bei einer bodenlebenden Grünalgen zwar eine seltene, aber mögliche physiologische Bedingung dar.

Für diese Experimente wurden die Gameten der Stämme cc620 und cc621, wie unter Kapitel II.2.5.1.1-II.2.5.1.2 beschrieben, gepaart und nach der 24 stündigen Inkubation im Licht bei 22 °C ins Dunkle transferiert und anschließend bei 9 °C, in einigen Fällen bei 6 °C, im Kühlschrank gelagert.

6.1.1. Der Einfluss auf die Zellmorphologie

Nach mindestens vier Wochen Lagerzeit wurden die Gameten von den Agarplatten gespült und die Zygoten mittels Zellschaber geerntet. Zunächst wurden die Zygoten im Mikroskop betrachtet. Die DIK-Aufnahmen zeigten Zellen mit morphologischen Änderungen im Vergleich zu den bei 22 °C gelagerten Zygosporien (Abb. III.6.1). Die Zellen waren zwar kreisrund und besaßen auch keine Geißeln mehr, was auf eine erfolgreiche Zygotenbildung hinwies. Jedoch waren die Zellen immer noch grün gefärbt und zusätzlich waren globuläre Strukturen in den Zellen zu erkennen, die größer als bei den 22 °C Zygosporien erschienen. Einige Zellen zeigten ein hyalines Aussehen. Beim Extrahieren fiel auf, dass die Zellen nicht stabil gegenüber dem Lösungsmittel Methanol waren. Dies war ein Unterschied zu den 22 °C-Zygosporien, deren Pigmente durch eine Spülung mit Methanol nicht extrahiert werden konnten.

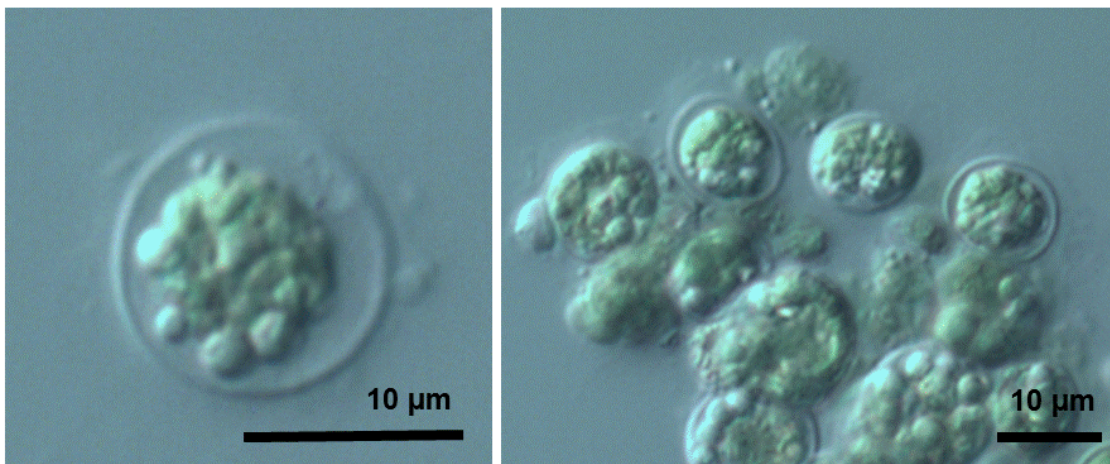


Abbildung III.6.1) DIK-Mikroskopische Aufnahmen von Zygoten, die 14 Wochen lang bei 9 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert wurden.

In den TEM-Aufnahmen wurden Ansammlungen von Lipidtröpfchen beobachtet bei gleichzeitiger Präsenz von großen Mengen an Thylakoidmembranen (Abb. III.6.2 mittig). Auch waren Stärkekörner sichtbar. Die Lipidtröpfchen besaßen einen größeren Durchmesser als die der bei 22 °C gelagerten Zygosporen. Bei den kalt gelagerten Zygoten war keine sekundäre Zellwand zu erkennen. Bei den 9 °C-Zygoten wurde aber auch eine Heterogenität in der Zellmorphologie beobachtet. Einige der Zygoten zeigten eine zu den DIK-Aufnahmen konforme hyaline Struktur (Abb. III.6.2 rechts).

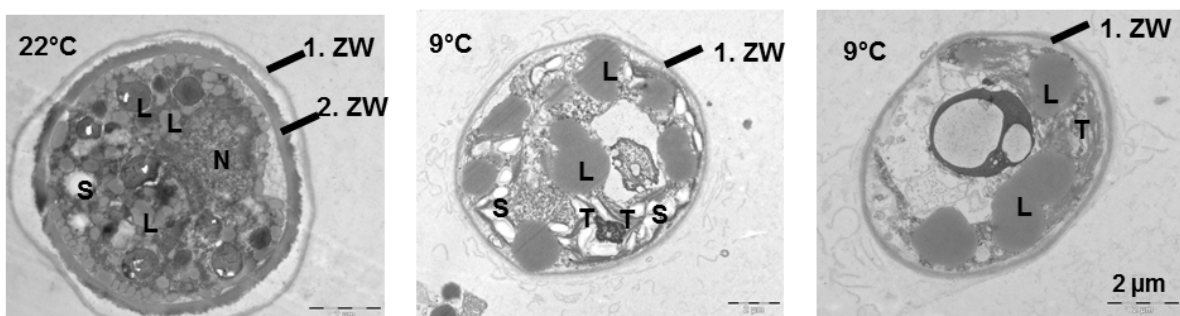


Abbildung III.6.2) TEM-Aufnahmen von Zygoten, die bei 9 °C oder bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert wurden, wobei unterschiedliche Zellmorphologien bei den 9 °C-Zygoten beobachtet wurden (mittig und rechts), 9 °C-Zygoten beide 14 Wochen lang gelagert, 22 °C Zygoten 7 Wochen gelagert.

S: Stärkekorn, L: Lipidtröpfchen, T: Thylakoidmembranen, N: Nukleus, 1. ZW: primäre Zellwand, 2. ZW: sekundäre Zellwand.

6.1.2. Der Einfluss auf die Pigmentzusammensetzung

Bei den Pigmentuntersuchungen der 9 °C-Zygoten zeigte sich, dass diese auch nach mehrwöchiger Lagerzeit nur geringe Mengen an Ketocarotinoiden akkumulierten (Abb. III.6.3). Lediglich kleine Mengen an 4-Ketolutein, Canthaxanthin und Astaxanthin wurden detektiert. Diese lagen nicht als Fettsäureester, sondern als freie Pigmente vor. Dieses Bild wurde in drei unabhängigen Versuchsreihen reproduzierbar beobachtet. Auch konnte in Kontrollversuchen gezeigt werden, dass Zygoten des gleichen Paarungsansatzes bei einer Lagerung von 22 °C wie unter Kapitel III.3 beschrieben große Mengen an Ketocarotinoiden bildeten, während die 9 °C-Proben nur geringe Mengen an Ketocarotinoiden synthetisierten (Abb. III.6.3). Die bei 22 °C gelagerten Zygosporen zeigten das gewohnte Pigmentspektrum, so dass das Pigmentbild der 9 °C-Zygoten nicht als Artefakt einer Misspaarung angesehen werden musste. Die 9 °C-Zygoten zeigten ein sehr ähnliches Pigmentspektrum wie vegetative Zellen oder junge Gameten, allerdings wurden zusätzlich geringe Mengen der freien Ketocarotinoide detektiert.

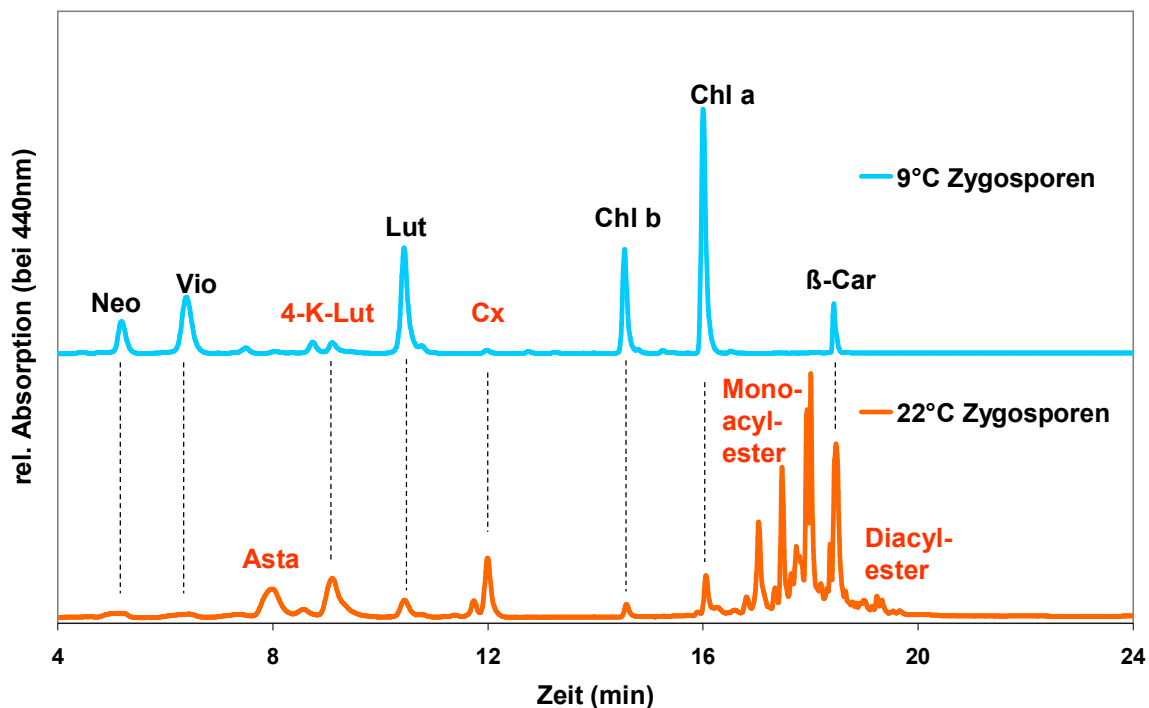


Abbildung III.6.3) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten von Zygoten des gleichen Paarungsansatzes, zum einen bei 22 °C, zum anderen bei 9 °C für 33 Tage im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert, HPLC-Gradient 1B.

Beim prozentualen Pigmentvergleich wurde deutlich, dass in den kalt gelagerten Zygoten die Chlorophylle die dominierende Fraktion darstellten (Tabelle III.6.1). Auch wurde die in den 22 °C-Zygosporen beobachtete Reduktion des PS-Carotinoidanteils nicht festgestellt. Allerdings zeigten die Verhältnisse der PS-Carotinoid untereinander ein anderes Bild als bei den 22 °C-Zygoten. Dort überwog der Anteil des β -Carotins, während bei den 9 °C-Zygoten

Lutein und Violaxanthin diese Pigmentgruppe dominierten. Die 9 °C-Zygoten enthielten nur geringe Mengen an Ketocarotinoiden (4 % des Gesamtpigmentanteils). Ketocarotinoid-Fettsäureester wurden nicht detektiert. Innerhalb der geringen Mengen an Ketocarotinoiden stellte 4-Ketolutein die größte Fraktion dar. Wie auch bei jungen Zygosporen der bei 22 °C gelagerten Zygoten fand sich ein etwas größerer Anteil an Canthaxanthin als an Astaxanthin. Auffällig war, dass das β - zu α -Carotinoidverhältnis der beiden unterschiedlich gelagerten Zygotenproben fast identisch war und sich von dem der gleich lang gelagerten Gameten deutlich unterschied, da dies 1,29:1 betrug (siehe Kapitel III.3.1).

		9 °C- Zygosporen (cc620 x cc621) 33 Tage alt	22 °C- Zygosporen (cc620 x cc621) 33 Tage alt
Chlorophylle	Chl a	46,8	7,3
	Chl b	18,3	1,7
PS-Carotinoide	Lutein	13,0	2,1
	beta-Carotin	3,3	11,4
	Violaxanthin	8,1	1,0
	Antheraxanthin	1,6	1,5
	Zeaxanthin	0,9	0,4
	Neoxanthin	4,1	1,1
Ketocarotinoide	4-Ketolutein	2,0	6,9
	4-K-Lut-Monoester	-	41,8
	Astaxanthin	0,5	8,6
	Asta-Monoester	-	0,1
	Asta-Diester	-	6,1
	Canthaxanthin	1,5	10,0
Summe		100	100
Verhältnis	β - zu α -Carotinoiden	0,95:1	0,96:1

Tabelle III.6.1) Prozentuale Pigmentzusammensetzung von Zygoten, die bei 9 °C oder bei 22 °C gelagert wurden: 33 Tage Lagerung im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten, Datenbasis molare Werte.

Insgesamt erinnerte das Pigmentspektrum der 9 °C-Zygoten an das von jungen 22 °C-Zygoten, wie es in der zeitlichen Reifungsuntersuchung am Tag 4 zu beobachten war. Es schien, als ob diese Zygoten ihre Ketocarotinoidsynthese stark gedrosselt oder sogar völlig abgestoppt hatten.

Zygoten, die bei 6 °C anstatt 9 °C gelagert worden waren, unterschieden sich nicht in ihrer Pigmentzusammensetzung. Auch bei ihnen wurde eine geringere Ketocarotinoidproduktion festgestellt. Allerdings wiesen sie keine geringeren Mengen auf als die bei 9 °C gelagerten Zellen.

6.1.3. Der zeitliche Verlauf der Änderung im Pigmentgehalt

Wie schon die 22 °C-Zygosporen wurden auch die 9 °C-Zygoten auf Ihre Änderung der Zellmorphologie und der Pigmentzusammensetzung während der Reifung untersucht. So wurden Proben von den ersten 12 Tagen nach der Paarung mittels TEM-Aufnahmen betrachtet. Zusätzlich wurden noch 3 Monate bei 9 °C im Dunkeln gelagerte Zygoten untersucht.

Bei den TEM-Untersuchungen zeigten die Zellen bis zur 3-Monatsprobe (98 Tage) noch deutlich sichtbare und intakt erscheinende Thylakoidmembranen (Abb. III.6.4). Im Vergleich zur Ausgangsprobe enthielten die Zellen aber große globuläre Strukturen, die vermutlich Lipidtröpfchen darstellten. Auch wurden in den Zellen vermehrt Stärkekörner beobachtet.

Bei detaillierten Aufnahmen der Zygotenzellwand wurde sichtbar, dass die bei 9 °C gelagerten Zygosporen keine sekundäre Zygotenzellwand besaßen (Abb. III.6.4). Nur die Primärwand war zu erkennen. Dies lieferte einen Hinweis, warum die Zygoten das Spülen mit Methanol nicht unbeschadet überstanden und deutete gleichzeitig darauf hin, dass diese sekundäre Zygotenzellwand für die besondere Widerstandsfähigkeit der Zygosporen verantwortlich sein könnte.

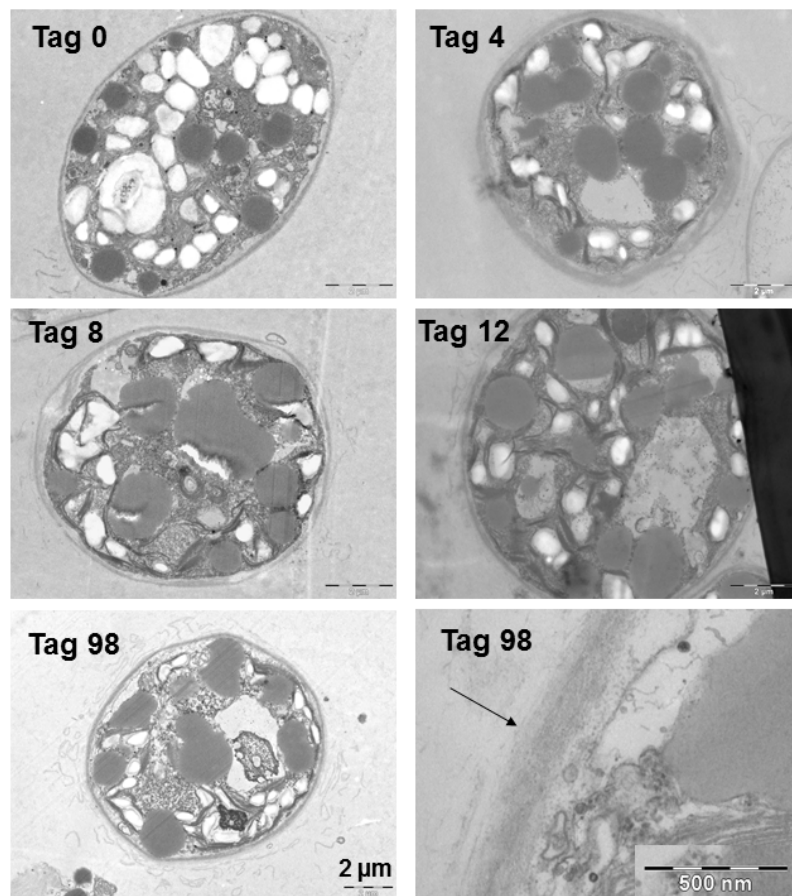


Abbildung III.6.4) Die Änderung der Zellmorphologie der bei 9 °C gelagerten Zygoten von *C. reinhardtii*, gelagert im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten.

L: Lipidtröpfchen, N: Nukleus, S: Stärkekorn, T: Thylakoidmembranen.

Unten rechts ist der Aufbau der Zellwand dargestellt, kalt gelagerte Zygoten besitzen nur die primäre Zellwand und keine sekundäre (Bilder V. Schmitt). Skala: 2 µm (außer abweichend angegeben).

Bei den Pigmentuntersuchungen wurden über 30 Tage Lagerung der Zellen hinweg keine wesentlichen Änderungen im Pigmentgehalt detektiert (Abb. III.6.5). Es fand kein nennenswerter Abbau der Chlorophylle oder der Carotinoide statt. Zwar reduzierte sich der Anteil der PS-Carotinoide leicht, im gleichen Maße wurden aber auch kleine Mengen an Ketocarotinoiden nachgewiesen. Diese Beobachtung deutet darauf, dass die PS-Carotinoide nicht abgebaut, sondern lediglich zu Ketocarotinoiden umgewandelt wurden. Erstmals konnten Ketocarotinoide aber erst in der 33 Tage lang gelagerten Probe detektiert werden. Sie traten somit wesentlich später auf als bei den 22 °C-Zygosporen. Bei den 22 °C-Zygosporen hatte die Ketocarotinoidakkumulation nach 4 Tagen begonnen und nach rund zwei Wochen ihr Maximum erreicht.

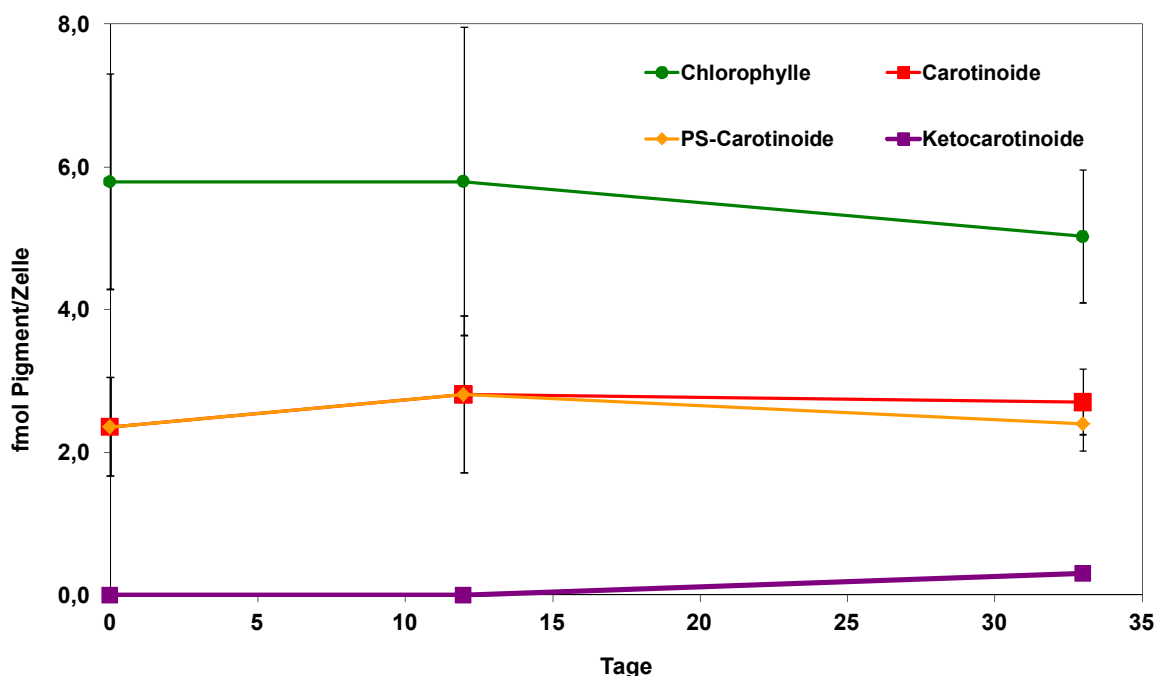


Abbildung III.6.5) Änderung der Pigmentgehalte während der Reifung von Zygoten, die bei 9 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert wurde, Datenbasis der Fehlerberechnung: Zu jedem Zeitpunkt drei Plattenkulturen geerntet, jeweils unabhängige Zellzahlbestimmung und HPLC-Untersuchung.

Beim Vergleich der Ketocarotinoidquantitäten fiel erneut auf, dass diese Pigmentzusammensetzung an die der jungen 22 °C-Zygosporen erinnerte (Abb. III.6.6). Wie schon bei jenen Zellen zeigten die 9 °C-Zygoten eine höhere Canthaxanthin- als Astaxanthinmenge. 4-Ketolutein stellte allerdings immer die größte Fraktion dar.

Bei diesen Zygoten wurden alle Ketocarotinoide in der *all-trans*-Konformation nachgewiesen.

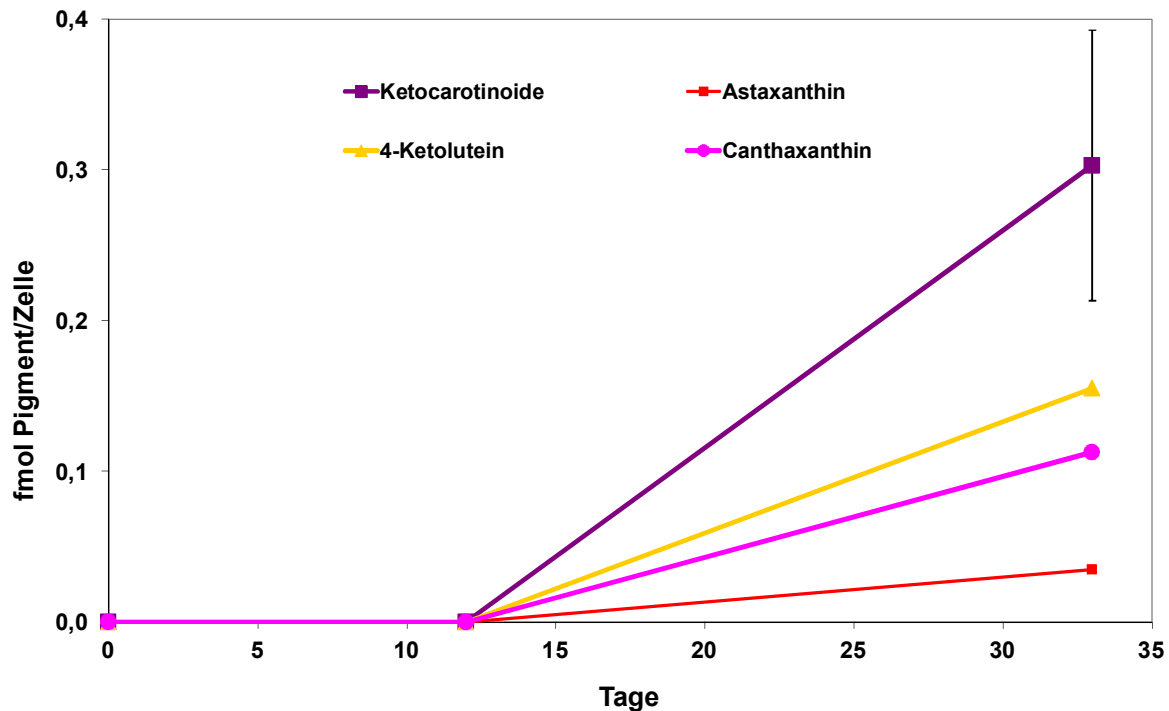


Abbildung III.6.6) Änderung der Ketocarotinoidgehalte während der Reife von Zygoten, die bei 9 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert wurden. Datenbasis der Fehlerberechnung: Zu jedem Zeitpunkt drei Plattenkulturen geerntet, jeweils unabhängige Zellzahlbestimmung und HPLC-Untersuchung.

Somit kann festgehalten werden, dass in den 9 °C-Zygoten ebenso wie bei den 22 °C-Zygosporen ein deutlicher zellmorphologischer Umbau stattfindet. Dieser ist allerdings nicht so gravierend wie bei den 22 °C-Zygosporen. Auffällig sind die großen Mengen an Thylakoidmembranen, aber auch das Fehlen der sekundären Zellwand. Im Gegensatz zur Zellmorphologie wurden in den Pigmentstöchiometrien keine vergleichbar großen Änderungen wie in den 22 °C-Zygosporen detektiert. Die Pigmentmengen sowie -verhältnisse unterscheiden sich wenig zu jungen Gameten (siehe Kapitel III.3.2).

6.1.4. Ketocarotinoide werden nicht bei allen 9 °C-Zygoten gebildet

In einigen Fällen konnten bei den 9 °C-Zygoten auch nach längerer Inkubation im Dunkeln keine Ketocarotinoide detektiert werden (Abb. III.6.7), obwohl sie bei der Untersuchung im DIK-Mikroskop ein typisches Erscheinungsbild zeigten.

Nachdem keine offensichtlichen Probleme bei der Paarung auftraten, wurde vermutet, dass es eine andere Erklärung für diese Phänomene geben musste. Dieses wird in Kapitel IV.7. diskutiert.

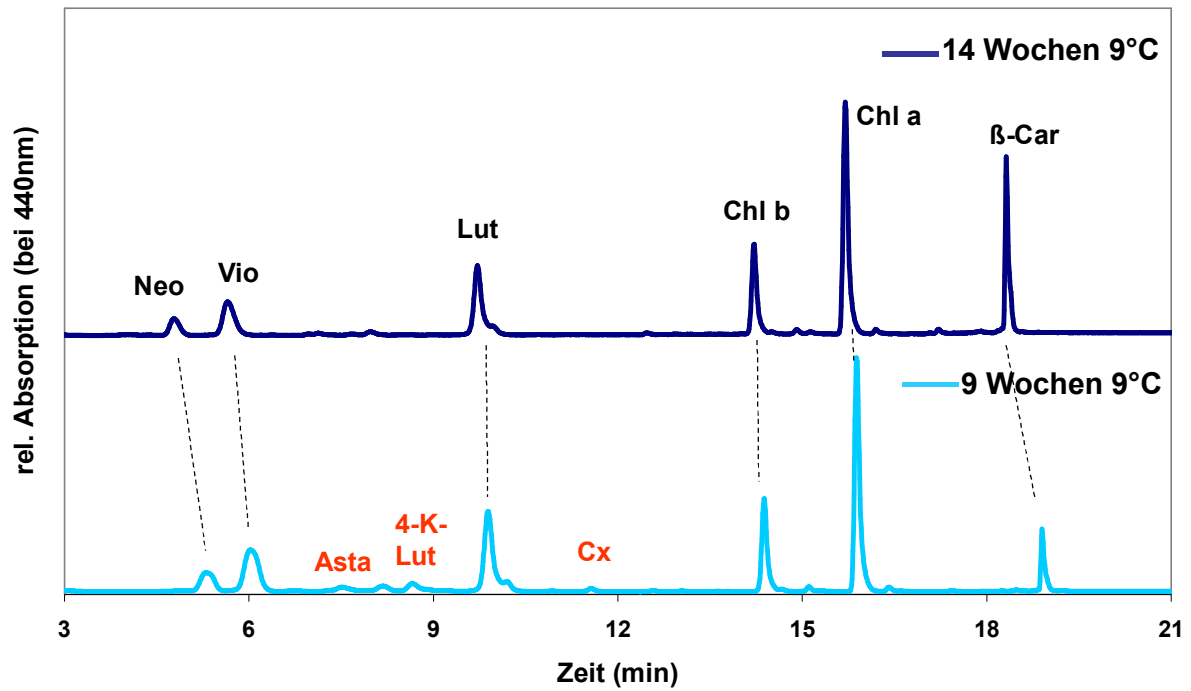


Abbildung III.6.7) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten verschiedener Zygoten, die bei 9 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert wurden, mit und ohne Ketocarotinoidpräsenz, HPLC-Gradient 1.

6.2. Die Lagerung bei 30 °C

Nachdem nachgewiesen wurde, dass niedrige Temperaturen einen massiven Einfluss auf die Pigmentzusammensetzung von Zygosporen ausüben, wurden auch die Pigmente von Zygoten untersucht, die bei 30 °C gelagert worden waren.

Bei dieser Pigmentuntersuchung zeigte sich, dass diese 30 °C-Zygosporen eine sehr ähnliche Pigmentzusammensetzung wie die 22 °C-Zygosporen besaßen (Abb. III.6.8). Es fand eine deutliche Synthese von Ketocarotinoiden statt, die auch in großen Mengen mit Fettsäuren zu Mono- und Diacylestern verestert wurden.

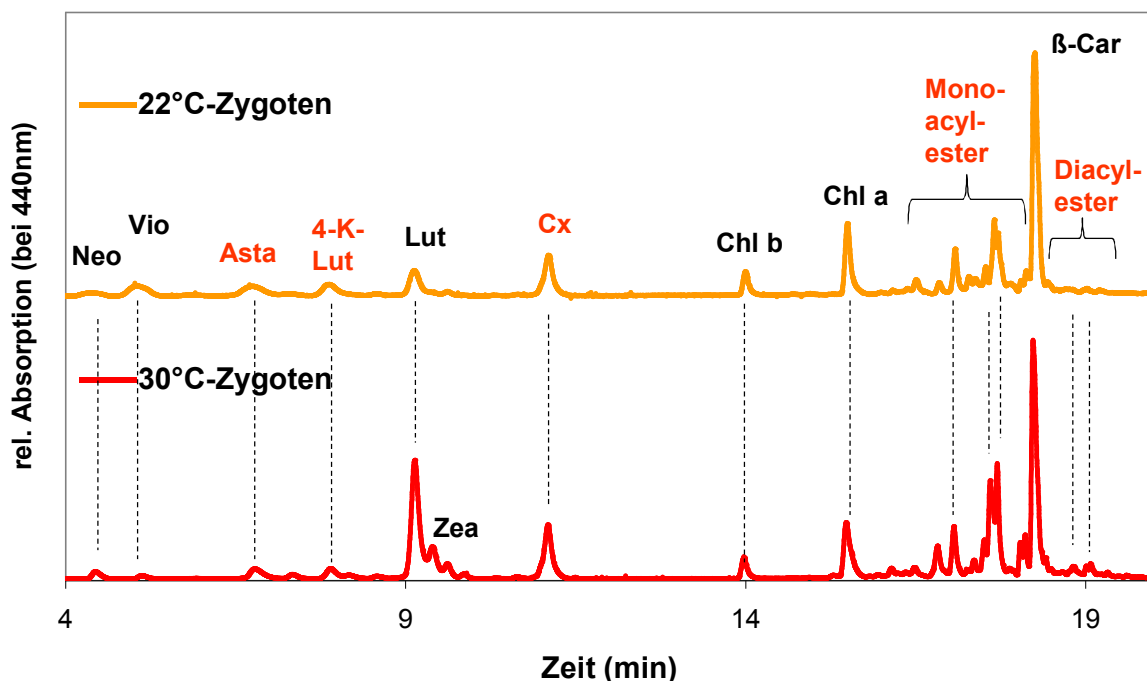


Abbildung III.6.8) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten des gleichen Paarungsansatzes, zum einen bei 22 °C, zum anderen bei 30 °C gelagert, jeweils für 18 Tage im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten, HPLC-Gradient 1.

Bei den Untersuchungen wurde aber festgestellt, dass die Homogenisierung der bei 30 °C gelagerten Zygosporen schwieriger war und längerer Homogenisierungszeiten gewählt werden mussten. Unter dem Mikroskop wurde beobachtet, dass trotz groberer Homogenisierungskriterien viele Zellen noch nicht aufgebrochen waren. Des Weiteren fand auf den Platten eine deutlich stärkere Verdunstung statt, die innerhalb der ersten beiden Wochen zu einer sehr starken Austrocknung des Mediums führte. Dies äußerte sich durch eine starke Feuchtigkeitssammlung am Deckel der Petrischalen, was dazu führte, dass nach ca. zwei Wochen die Zellen durch die Rückkondensation in einem Wasserfilm lagen. Diese Zellen ließen sich deutlich schwieriger von der Platte kratzen, was in der stärkeren Austrocknung der Agarplatten in den ersten Reifungstagen begründet sein könnte.

Aufgrund dieser praktischen Schwierigkeiten wurde für die weiteren Versuche davon abgesehen die Zellen bei 30 °C zu lagern, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Zellen schneller und evtl. sogar mehr Ketocarotinoide produzieren. Die größeren

Schwierigkeiten beim Zellaufschluss deuten darauf hin, dass die sekundäre Zellwand dieser Zygosporen noch dicker ist. Dies würde einen erhöhten Transpirationsschutz bewirken und könnte mit der höheren Lagertemperatur in Verbindung stehen. Daher sollten diese Zellen bei den nächsten TEM-Experimenten untersucht werden.

6.3. Weitere Lagerungstemperaturen

Im Rahmen eines F2-Praktikums mit Susanna Dietz und Alexandra Fischer wurde der Einfluss der Temperatur auf die Zygotenreife näher untersucht. Dazu wurde ein großer Paarungsansatz erstellt, die auf TAP-N-Agarplatten transferierten Zellen nach einer 24 stündigen Lichtinkubation (22 °C) dunkel gestellt und auf unterschiedliche Lager-temperaturen verteilt (9 °C, 18 °C, 22 °C, 30 °C und 37 °C). Nach 19 Tagen wurden die Platten geerntet und die extrahierten Pigmente mittels HPLC untersucht (Abb. III.6.9).

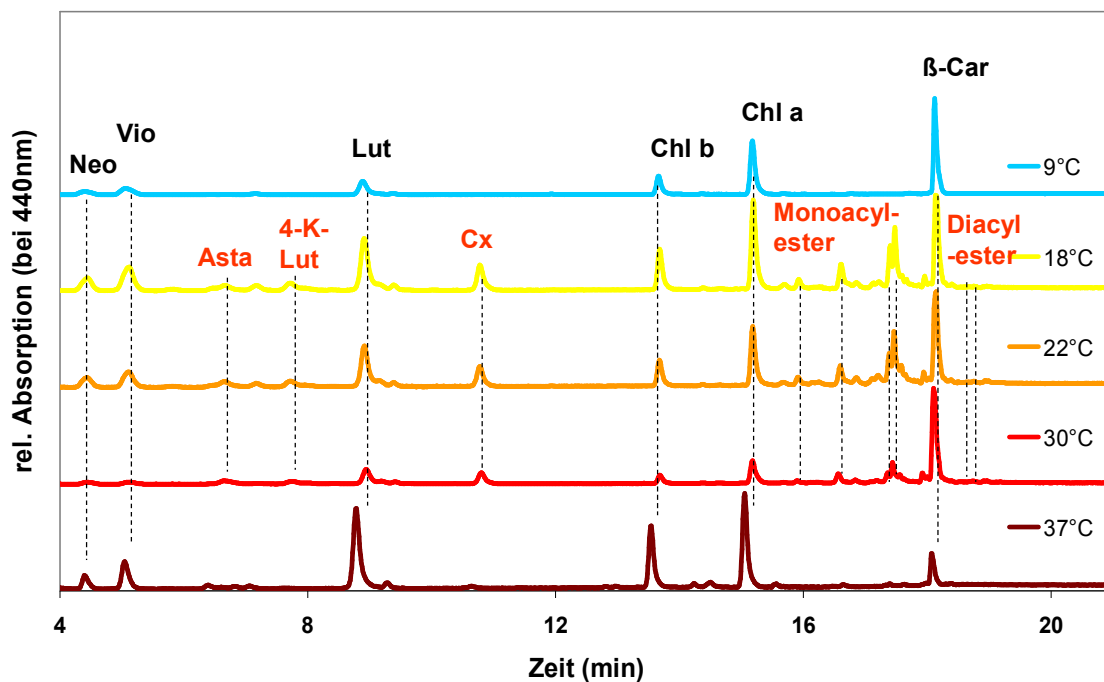


Abbildung III.6.9) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten aus Zygosporen des gleichen Paarungsansatzes, bei verschiedenen Temperaturen gelagert, jeweils für 19 Tage im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten, HPLC-Gradient 1.

In diesem Experiment konnten bei kalt gelagert Zygoten keine Ketocarotinoide detektiert werden. Bei Lagerung unter 18 °C sowie 22 °C fanden sich dagegen große Mengen dieser überwiegend veresterten Pigmente, bei den bei 30 °C gelagerten Zygoten etwas kleinere Mengen. Im 22 °C-Ansatz wurden die größten Mengen an Ketocarotinoiden im Vergleich zum Gesamtpigmentgehalt gefunden. Je weiter die Temperaturen die 22 °C überstiegen, umso weniger Ketocarotinoide wurden detektiert. Bei 37 °C gelagerte Zygosporen zeigten kein Ketocarotinoidvorkommen.

7. Lipidakkumulation in vegetativen Zellen, Zygoten und 9 °C Zygoten sowie *lor1*-Zygoten

7.1. Übersicht über Lipidvorkommen in vegetativen Zellen und Zygosporen

Ketocarotinoide sind sehr lipophile Substanzen, die nicht in wässrigen Bedingungen, wie z.B. dem Cytoplasma, akkumulieren können. Sie benötigen eine lipophile Umgebung, wie sie zum Beispiel Membranen oder Lipidtröpfchen darstellen. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Lipidvorkommen in den verschiedenen Zellstadien von *C. reinhardtii* untersucht. Beim Vergleich von TEM-Aufnahmen der vegetativen Zellen sowie gereiften Zygosporen wurde ein unterschiedliches Lipidvorkommen festgestellt. Während man in vegetativen Zellen die Lipide überwiegend in den Thylakoidmembranen des Chloroplasten findet, waren diese in den Aufnahmen der Zygosporen nicht mehr nachzuweisen. Dagegen fanden sich viele globuläre Strukturen, die in der Literatur als orange-rot gefärbte Lipidtröpfchen beschrieben worden waren (Cavalier-Smith 1976) und als mögliche lipophile Orte der Ketocarotinoidakkumulation postuliert wurden. In der Abbildung III.7.1 sind in blau die entsprechenden Zellkompartimente markiert, die einen hohen Gehalt an Lipiden besitzen.

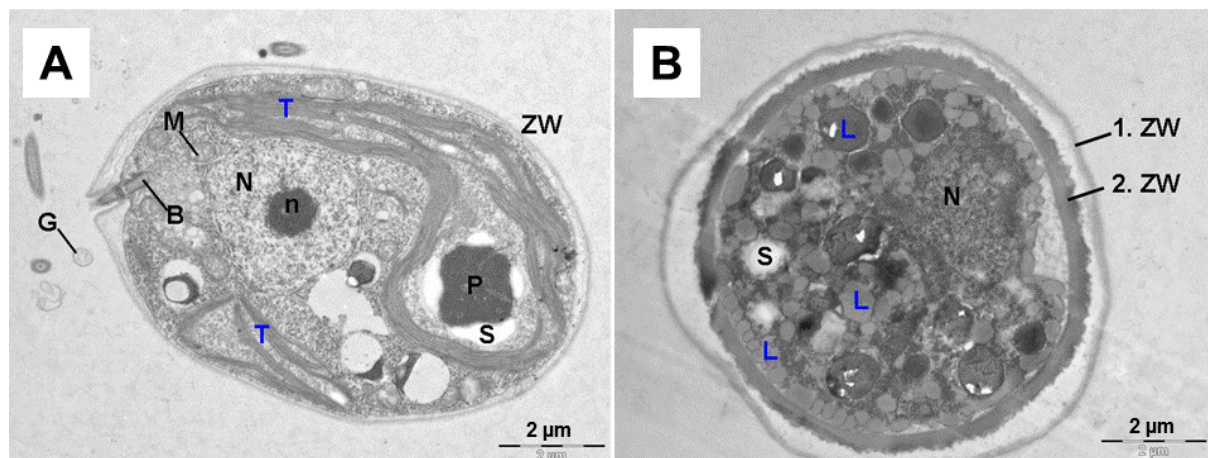


Abbildung III.7.1) TEM-Aufnahmen verschiedener Zellstadien von *C. reinhardtii*.

A: vegetative Zelle von cc621 mt-, 5 Tage alt in TAP-Flüssigkultur bei 18 °C gelagert,

B: Zygospore cc620 x cc621 mt-, 6 Wochen auf TAP-N-Agarplatten im Dunkeln bei 22 °C gelagert,

B: Basalapparat, G: Geißel angeschnitten, L: Lipidtröpfchen, M: Mitochondrium, N: Nukleus, n: Nukleolus, P: Pyrenoid, S: Stärke, T: Thylakoidmembranen, ZW: Zellwand vegetativ, 1. ZW: Primäre Zygotenzellwand, 2. ZW: Sekundäre Zygotenzellwand (Fotos V. Schmitt).

7.2. Akkumulation von Lipiden während der Zygosporenreifung von *C. reinhardtii* bei 22 °C

Um einen weiteren Beleg für die Akkumulation von Lipiden während der Zygotenreife von *C. reinhardtii* zu erhalten, wurden die unterschiedlich lang gereiften Zygosporenproben mit Sudanschwarz B gefärbt. Dieser Diazofarbstoff färbt Triglyceride. Die sichtbar stärkste Zunahme an Lipiden fand innerhalb der ersten vier Tage der Reifung statt, ab diesem Zeitpunkt schienen die Zellen dicht mit Lipidtröpfchen gefüllt (Abb. III.7.2). Mittels TEM-Aufnahmen wurde beobachtet, dass zeitgleich zur Sudanschwarz-Färbung der Zygosporen die Zellen die globulären Strukturen über das gesamte Zelllumen verteilt akkumulierten, so dass dies als Beleg für deren Identität als Lipidtröpfchen gesehen wurde.

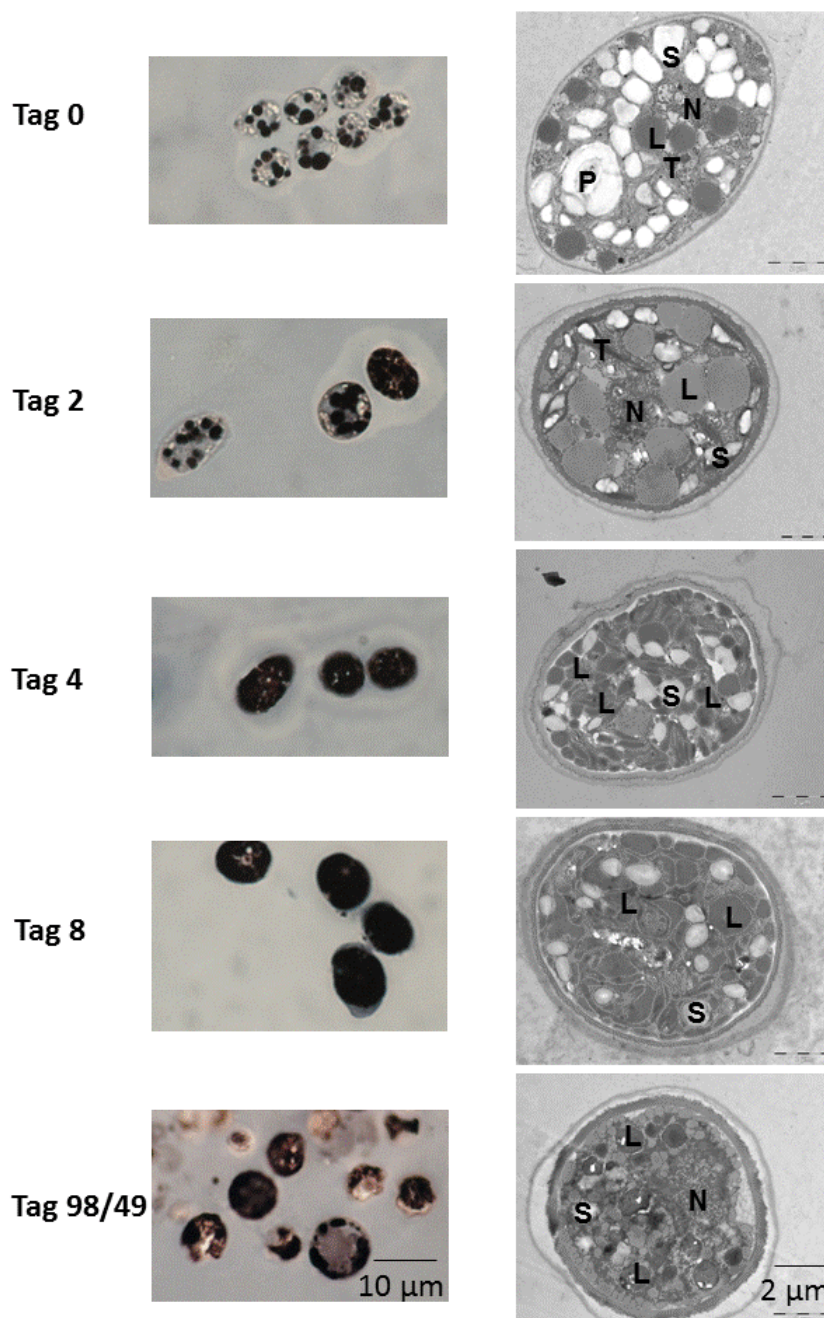


Abbildung III.7.2)
Lipidanfärbung von unterschiedlich lang bei 22 °C gelagerten Zygoten von *C. reinhardtii*.

Links: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Semidünnschnitten (1 μm) gefärbt mit Sudanschwarz B (SBB).

Rechts: TEM-Aufnahmen.

Tag 0 entsprach der Probe ohne Dunkellagerung aber 48 h Stickstoffmangel, Tag 2-98 mit entsprechend langer Lagerung im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten.

Tag 98/49: SBB-Färbung von 98 Tagen lang gelagerten Zygosporen, TEM von 49 Tage lang gelagerten Zygosporen,

L: Lipidtröpfchen
N: Nukleus, P: Pyrenoid,
S: Stärke,
T: Thylakoidmembran.

(Fotos V. Schmitt)

Bei genauerer Betrachtung der globulären Strukturen in den Zygosporen fiel auf, dass diese nicht zu einem großen Lipidtropfen verschmolzen, sondern viele kleine globuläre Strukturen vorhanden waren. Sie flachten sich gegeneinander ab (Abb. III.7.1B).

Bei Aufnahmen, die mit starker Vergrößerung durchgeführt wurden, kann vermutet werden, dass die Tröpfchen von einer einschichtigen Membran umgeben waren (Abb. III.7.3).

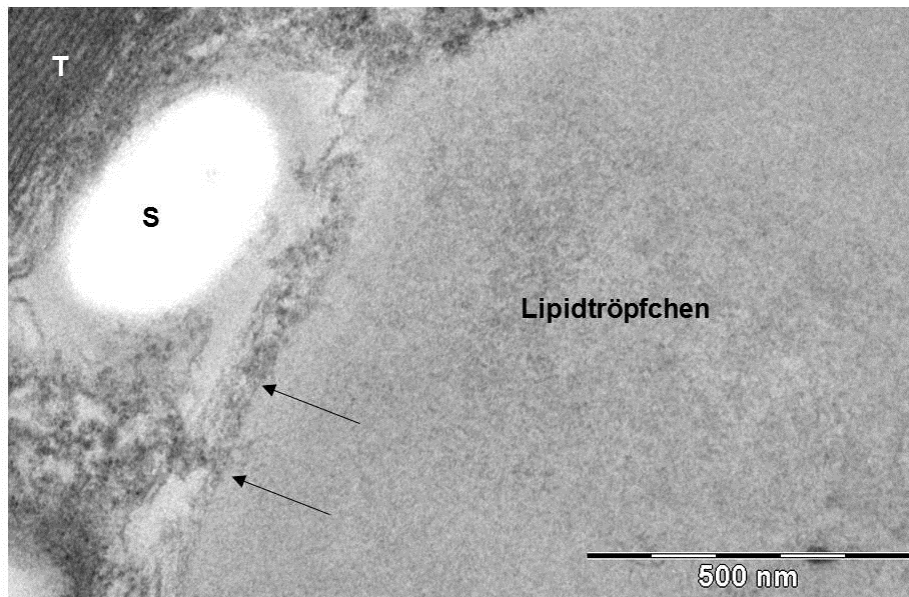


Abbildung III.7.3) TEM-Aufnahme einer für 2 Tage bei 22 °C gereiften Zygote von *C. reinhardtii*. Lipidtröpfchen; T: Thylakoidmembranen; S: Stärkekorn, Pfeil verdeutlicht eine dünne semimembranartige Struktur um den Lipidtröpfchen (Foto: V. Schmitt).

7.3. Akkumulation von Lipiden während der Zygosporenreifung bei 9 °C

Auch die bei 9 °C gelagerten Zygosporen wurden mittels SBB-Färbung sowie TEM-Aufnahmen auf ihr Lipidvorkommen untersucht. Die 9 °C-Zygoten zeigten während ihrer Lagerung auch eine deutliche Akkumulation von globulären Strukturen, die nach Behandlung mit Sudanschwarz B eine schwarze Farbe aufwiesen und somit ebenfalls als Lipidtröpfchen angesehen werden können (Abb. III.7.4).

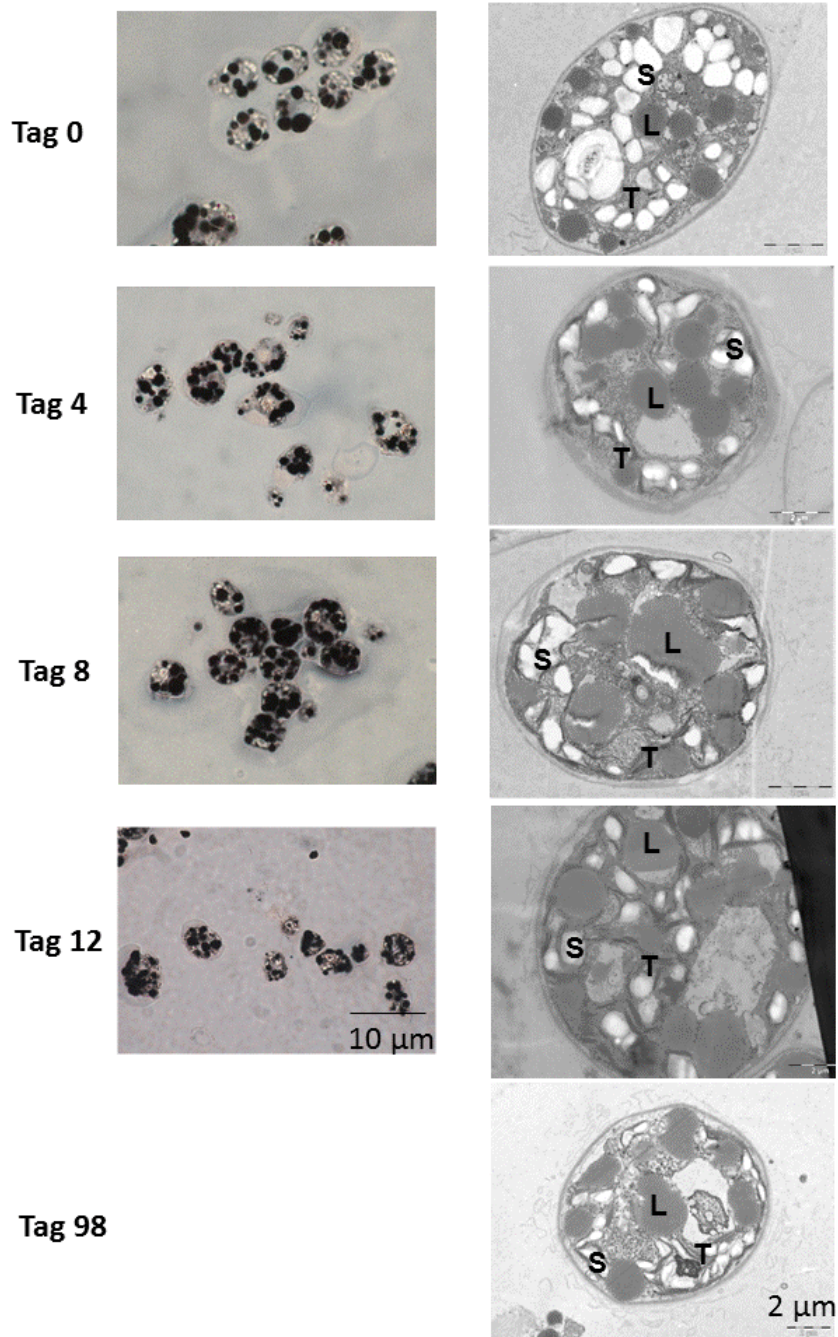


Abbildung III.7.4)
Lipidanfärbung von unterschiedlich lang bei 9 °C gelagerten Zygoten von *C. reinhardtii*.

Links: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Semindünnschnitten (1µm) gefärbt mit Sudanschwarz B (SBB).

Rechts: TEM-Aufnahmen.

Tag 0 entsprach der Probe ohne Dunkellagerung aber 48 h Stickstoffmangel, Tag 4-98 mit entsprechend langer Lagerung im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten.

L: Lipidtröpfchen, S: Stärke, T: Thylakoidmembran.

(Fotos V. Schmitt)

Mittels TEM-Aufnahmen konnten, wie schon bei den 22 °C-Zygosporen, globuläre Strukturen in den Zellen detektiert werden, deren Uranylacetat-Färbungsverhalten auf Lipidtröpfchen hindeutete. Diese erschienen größer als bei den 22 °C-Zygosporen, ihre Anzahl war aber geringer (Vergleiche Abb. III.7.2 und III.7.4). Zwischen Tag 8 und 98 konnte kein wesentlicher Unterschied entdeckt werden. Dies spricht dafür, dass ab ca. einer Woche Lagerung der Zellen bei 9 °C die Lipidakkumulation in den Zygoten stagnierte.

Wie auch bei den bei 22 °C gelagerten Zygosporen wurde bei den kalt gelagerten Zellen eine hemimembranähnliche Struktur um die Zellen beobachtet (Abb. III.7.5).

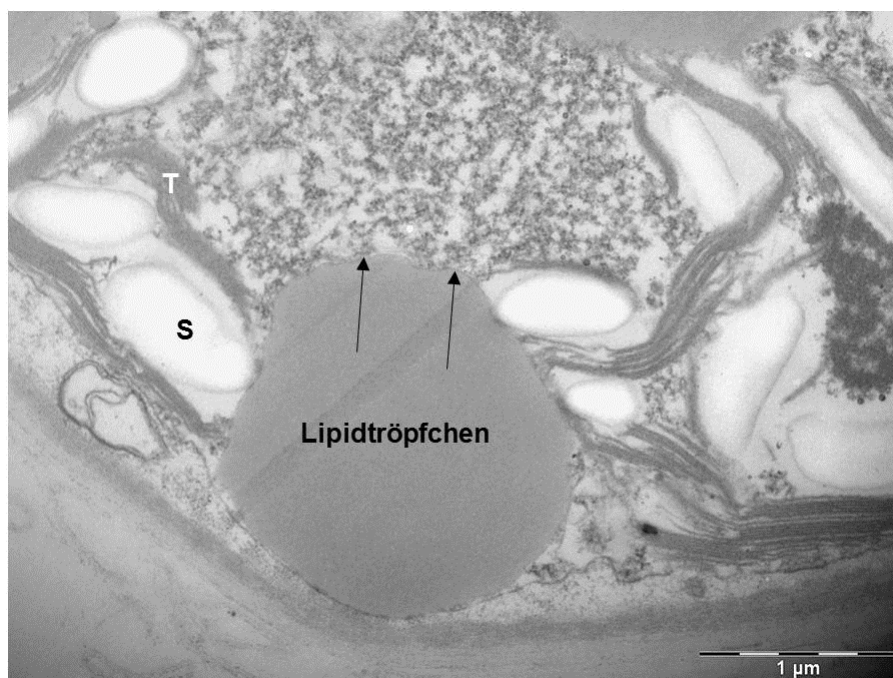


Abbildung III.7.5) TEM-Aufnahme einer für 14 Wochen bei 9 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatte gelagerten Zygote von *C. reinhardtii*. Lipidtröpfchen; T: Thylakoidmembranen; S: Stärkekorn, Pfeil verdeutlicht eine dünne semimembranartige Struktur um den Lipidtröpfchen (Foto: V. Schmitt).

7.4. Identifizierung der unterschiedlichen Lipidklassen mittels Dünnschichtchromatographie

Sowohl die SBB-Färbung als auch die TEM-Aufnahmen wiesen auf die starke Akkumulation von Lipiden in den Zygosporen hin. Zur genaueren Untersuchung der Lipidzusammensetzung wurde eine spezielle dünnschichtchromatographische Auftrennung der lipophilen Zellbestandteile durchgeführt. Mittels dieses Verfahrens konnte zwischen Membranlipiden und Neutralfetten, vor allem den sog. Triacylglycerolen (TAG), unterschieden werden.

Hierfür wurden nach dem Zellaufschluss die unpolaren Zellbestandteile wie Lipide und Carotinoide mittels Chloroform:Methanol-Lösungsmittelgemisch extrahiert. Die Extrakte wurden auf HPTLC-Kieselgel-Platten aufgetragen und mittels eines zweiphasigen Laufmittels aufgetrennt. Es wurden zusätzlich Referenzsubstanzen aufgetragen: Eine Bahn enthielt verdünntes Sonnenblumenöl als TAG-Standard und die zweite Bahn ein Gemisch aus verschiedenen, kommerziell erhältlichen Membranlipiden (Lipid Products, South Nutfield, Großbritannien).

Dieses Verfahren wurde für die folgenden verschiedenen Zellen durchgeführt:

6 Tage alte vegetative Zellen des Stammes cc621, 14 Wochen alte Zygosporen der Stämme cc620 x cc621 bei 22 °C gelagert sowie Zygosporen des gleichen Paarungsansatzes, die aber bei 9 °C gelagert worden waren.

Alle Zellen wurden nach dem Protokoll (Kapitel II.3.2.) extrahiert und jeweils solche Mengen aufgetragen, die gleichen Zellzahlen entsprachen. Aufgrund der Intensität der Färbung

konnten mit Hilfe der Referenzsubstanzen vergleichende Rückschlüsse auf die Konzentrationen der verschiedenen Lipide in den unterschiedlichen Zellstadien gezogen werden.

In Abbildung III.7.6 ist die gleiche Platte vor und nach dem Entwickeln mittels Godin's Sprühreagenz dargestellt. Vor dem Entwickeln waren die gefärbten Banden der Zellpigmente zu erkennen. Nach dem Entwickeln hatten sich die Lipide dunkel gefärbt. In vegetativen Zellen (**V**) dominierten die Membranlipide sehr deutlich, vor allem Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) und Diacylglyceryltrimethylhomoserin (DGTS) dominierten diese Bahn. Für DGTS war kein Standard verfügbar, daher wurde es durch Literaturvergleiche bestimmt und mit ** versehen (Grünwald et al. 2001). Neutralfette in Form der TAGs wurden nur in geringen Mengen detektiert. Ein anderes Bild zeigte sich für die Zygosporien bei 22 °C (**Z**). Dort waren nur noch geringe Mengen an Membranlipiden zu erkennen. Der Unterschied zu den vegetativen Zellen wird noch deutlicher, wenn man beachtet, dass immer zwei Gameten zu einer Zygote verschmolzen waren und somit die Konzentration den Membranlipide beider Gameten als quantitativer Vergleich herangezogen werden müsste. Auffällig war bei den Zygosporien die dicke Bande der TAGs. Dieses Zellstadium besaß somit große Mengen an Neutralfetten. Bei den 9 °C-Zygosporien (**9°CZ**) waren etwas intensivere Banden der TAGs sowie der polaren Galactolipide im Vergleich zu den 22 °C-Zygosporien erkennbar. Dieses Ergebnis deckt sich mit den vorausgegangenen Untersuchung mittels TEM- und Sudanschwarzfärbungen; 9 °C-Zygoten zeigten Lipidakkumulation bei gleichzeitiger Erhaltung größerer Mengen an Thylakoidmembranen.

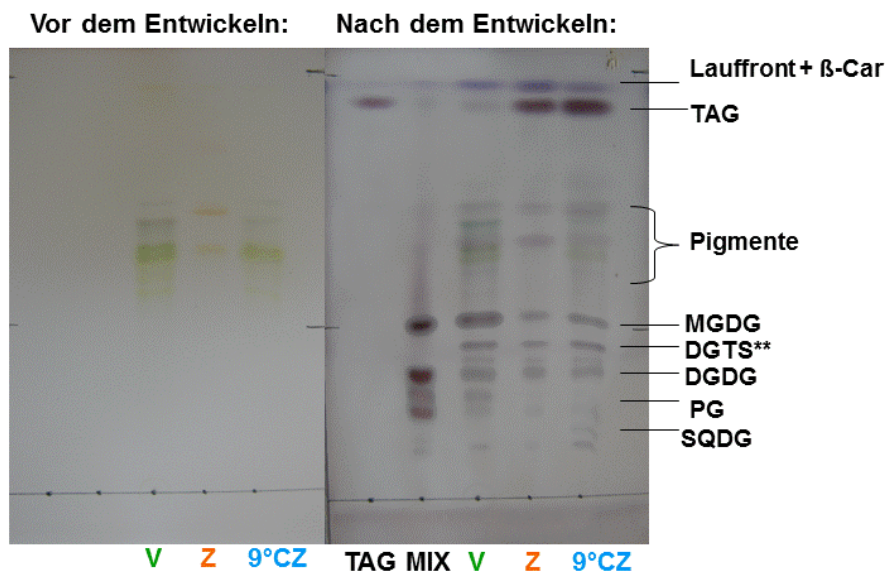


Abbildung III.7.6) Dünnschichtchromatographie zum Nachweis der verschiedenen Lipide bei veg. Zellen (V), Zygosporien bei 22 °C gelagert (Z) und Zygosporien bei 9 °C gelagert (9 °CZ). Als Referenzpigmenten wurde ein Sonnenblumenöl als TAG-Standard verwendet und ein MIX aus MGDG, DGDG, PG und SQDG (jeweils 1 µg/µl Auftrag). DGTS** ohne Standard über die Veröffentlichung von Grünwald und Mitarbeitern (2001) bestimmt.

Es kann somit zusammengefasst werden, dass vegetativen Zellen und Zygosporen sich sehr deutlich in ihrer Lipidqualität und auch in der -quantität unterscheiden. In den vegetativen Zellen dominieren Membranlipide, während die Zygosporen große Mengen an Neutralfetten enthalten. Diese sind wahrscheinlich in den globulären Strukturen in Form von Lipidtröpfchen lokalisiert.

7.5. Akkumulation von Lipiden während der Zygosporenenreifung der *lor1*-Mutante von *C. reinhardtii* bei 22 °C

Für die homozygoten *lor1*-Zygosporen wurden ebenfalls Lipidnachweise durchgeführt. Da aufgrund der begrenzten Zellmenge keine DC-Untersuchung erfolgen konnte, wurden die Zellen mittels SBB-Färbung und TEM-Aufnahmen analysiert.

Die SBB-gefärbten Zygosporen zeigten eine deutliche Schwarzfärbung, die aber nicht für alle Zellen gleich intensiv war. Einige Zellen schienen komplett mit Lipiden gefüllt und erinnerten dabei an WT-Zygosporen, andere enthielten lediglich einzelne schwarze Flecken (Abb. III.7.7A).

Ein dazu passendes Bild zeigte sich auch in den TEM-Aufnahmen. Einige *lor1*-Zygosporen waren dicht gefüllt mit Lipidtröpfchen (Abb. III.7.7C), andere enthielten auch noch große Mengen an Cytosol und Thylakoidmembranen (Abb. III.7.7B). In den TEM-Aufnahmen waren sehr viele unterschiedlich gereifte Zygosporen zu erkennen, so dass von einem unterschiedlichen Reifungsprozess in diesen Zellen ausgegangen werden muss.

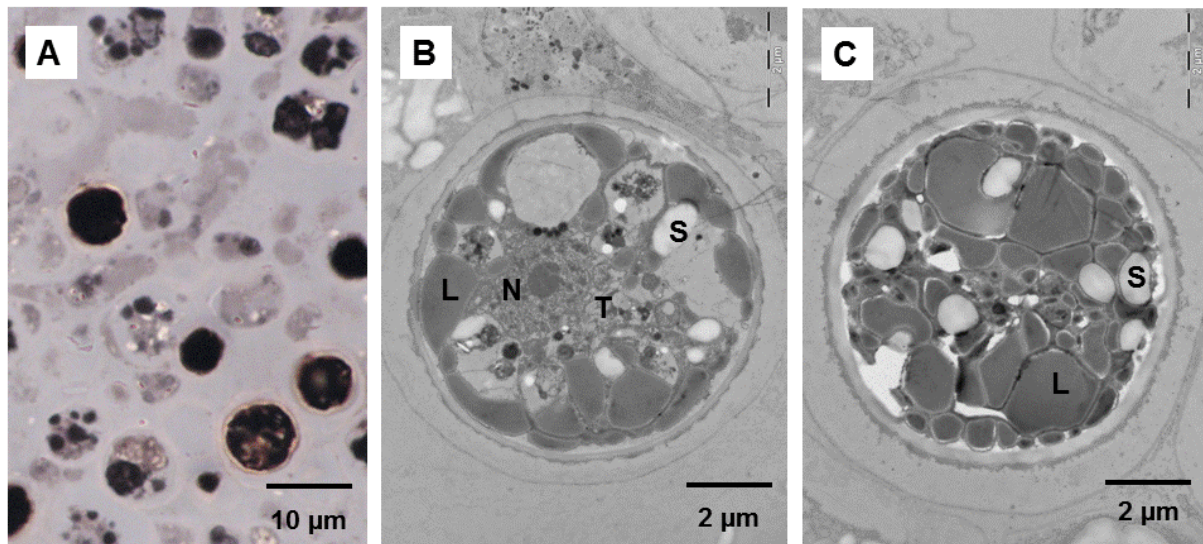


Abbildung III.7.7) A: Lipidanfärbung von Zygosporen der *lor1*-Mutante von *C. reinhardtii*, gelagert für 14 Wochen bei 22 °C; Semidünnschnitte (1 µm), gefärbt mit SBB; B und C: TEM-Aufnahmen von gleich lang aber unterschiedlich weit gereiften Zygosporen eines Paarungsansatzes. L: Lipidtröpfchen; T: Thylakoidmembranen; S: Stärkekörnern (Fotos V. Schmitt).

Eine mögliche Ursache für den unterschiedlichen Reifegrad der Zygosporen könnte in dem Untersuchungsobjekt homogener Pelliculastücken liegen. Für die *lor1*-Zygosporen waren während dieser Arbeit die Versuche gescheitert, vereinzelte Zygosporen zu gewinnen. Alle reifen *lor1*-Zygosporen waren in Form von Pellicula gewonnen worden. Bei Pelliculauntersuchungen von WT-Zygosporen war allerdings bereits festgestellt worden, dass dort eine große Anzahl von unterschiedlich gereiften Zellen anzutreffen waren (Kapitel III.1). Daher wurden beim WT die Arbeiten mit Pellicula nicht mehr durchgeführt. Somit muss die unterschiedliche Reifung der *lor1*-Zygosporen nicht zwangsläufig mit der Mutation und dem damit veränderten Pigmentspektrum in Verbindung stehen, sondern kann auch in dem aus Pellicula bestehenden Zellmaterial begründet liegen.

7.6. Auftrennung der Lipidfraktionen mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation

7.6.1. Zygosporen von *C. reinhardtii*

Die Akkumulation von großen Mengen an Ketocarotinoiden benötigt Zellstrukturen, in die sich diese unpolaren Substanzen ein- oder anlagern können. Für *H. pluvialis* wurde gezeigt, dass sich diese Pigmente überwiegend in cytosolischen Lipidtröpfchen befinden. Für *C. reinhardtii* wurden diese Lipidtröpfchen im Rahmen dieser Arbeit hinreichend bewiesen, allerdings konnte die Lokalisation der Pigmente bisher nicht sicher belegt werden. Es wird vermutet, dass sich die Ketocarotinoide, vor allem die Ketocarotinoidacyclester ebenfalls in den cytosolischen Lipidtröpfchen einlagern. Um dies näher zu untersuchen, wurde der folgende Versuchsaufbau entwickelt:

Die reifen Zygosporen sollten aufgebrochen und die Zellbestandteile mit Hilfe einer Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt werden. Diese Fraktionen konnten mittels HPLC auf ihren Pigmentgehalt und mittels DC auf die Lipidbestandteile untersucht werden. Sollten Fraktionen identifiziert werden, die überwiegend aus TAGs und Ketocarotinoiden bestehen würden, so wäre dies ein Beleg für die Präsenz von ketocarotinoidhaltigen Lipidtröpfchen.

Als Grundlage für dieses Experiment diente ein Protokoll von Georg Kreimer (Universität Erlangen), nach dem erfolgreich der Augenfleck von *C. reinhardtii* von den restlichen Membranen und Pigmenten der vegetativen Zellen getrennt werden kann. Augenflecke von *C. reinhardtii* sind pigmentierte Lipidtröpfchen, die zwischen Membranen eingelagert sind, und somit den vermuteten cytosolischen Lipid-Pigment-Tröpfchen ähneln.

Nachdem eine erfolgreiche Etablierung des Versuchsprotokolls im Labor mit vegetativen Zellen von *C. reinhardtii* erfolgt war, wurden die Zygosporen untersucht. Dazu wurden 4 Wochen alte Zygosporen auf GF6-Filter gezogen und in Homogenisierungspuffer mittels

MSK-Zellhomogenisator (B.Braun) aufgeschlossen. Nach verschiedenen Aufreinigungsschritten (siehe Protokoll Kapitel II.4) wurden die Zellen auf einen Saccharosestufengradienten aufgetragen und bei 100.000 x g aufgetrennt. Dabei entstanden 6 Fraktionen, deren Pigmente mittel Butanolextraktion isoliert und anschließend mittels HPLC untersucht wurden (Abb. III.7.8). Dabei lag das Augenmerk auf Fraktionen, bei denen die Ketocarotinoide im Vergleich zum Ausgangsextrakt angereichert worden waren. War eine Aufreinigung der Zellfraktionen erfolgreich, so sollten in einigen Fraktionen keine PS-Carotinoide und keine Chlorophylle mehr anzutreffen sein. Dies war aber in keiner Fraktion der Fall. Zwar zeigte sich in den oberen Fraktionen des Gradienten eine leichte Erhöhung des Ketocarotinoideanteils im Vergleich zum Ausgangszellhomogenisat, jedoch konnten auch in diesen Fraktionen noch alle Pigmente dieses Rohextraktes nachgewiesen werden.

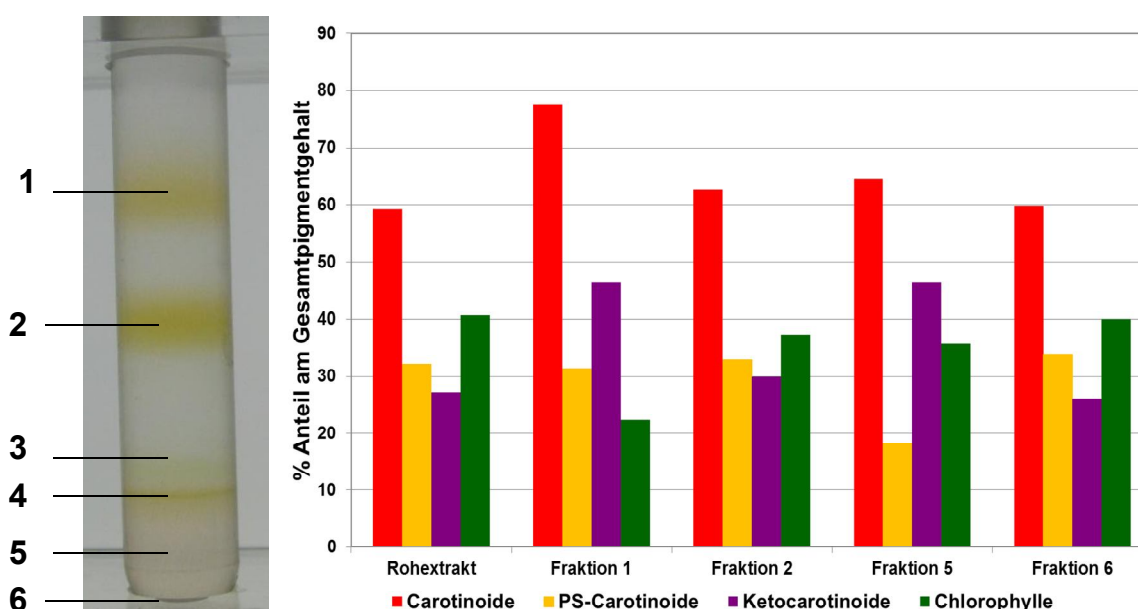


Abbildung III.7.8) Auftrennung der Lipid-Membran-Fraktionen von Zygosporen von *C. reinhardtii* (4 Wochen lang im Dunkeln bei 22°C auf TAP-N-Agarplatten gelagert) mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation, mit einer Übersicht über die Pigmentgehalte in den verschiedenen Fraktionen vor und nach der Auftrennung mittels UZ.

Bei genauerer Untersuchung des Versuchsaufbaus wurde deutlich, dass der Zellaufbruch mittels des verwendeten Zellhomogenisators eine sehr harsche Methode darstellte. Es wurde vermutet, dass bei dieser Homogenisierung die Zellen einer so starken mechanischen Belastung ausgesetzt waren, dass alle Membranstrukturen nicht mehr intakt blieben, sondern vielmehr miteinander verschmolzen. Aufgrund der dicken und sehr widerstandsfähigen sekundären Zygosporenzellwand musste sehr hohe mechanische Energie aufgewendet werden, um die Zellwand aufzubrechen. War dieser Zellaufbruch erfolgreich, wurden aber viele zelluläre Strukturen zerstört.

Um dieses Problem zu lösen, wurde die Zellhomogenisierungsmethode variiert. Dazu wurden die Zellen auf grobmaschigere Filter (GF92) gezogen und dann mittels Zelldismembrator U (B.Braun) mit Wolframkugel in einem Kunststoffgefäß unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Bei der Untersuchung dieses Zellhomogenisats mittels Lichtmikroskop wurde erneut eine sehr starke Zerstörung der Zellen beobachtet, so dass keine weiteren Versuche mit dieser Methode durchgeführt wurden.

7.6.2. Aplanosporen von *H. pluvialis*

Parallel zu den Experimenten mit Zygosporen von *C. reinhardtii* wurden die gleichen Versuche mit Aplanosporen von *H. pluvialis* durchgeführt. Diese Ergebnisse sollten als Vergleiche für die aus *C. reinhardtii* gewonnenen Daten dienen.

Auch für *H. pluvialis* konnte keine erfolgreiche Auftrennung der Lipidfraktionen gezeigt werden (Abb. III.7.9). Es fanden sich zwar erneut pigmentierte Banden, bei denen zum Teil eine Anreicherung von Ketocarotinoiden gegenüber dem Rohextrakt stattfand. Wie aber schon bei *C. reinhardtii* zeigten alle Fraktionen noch das gesamte Pigmentspektrum des Ausgangsextraktes.

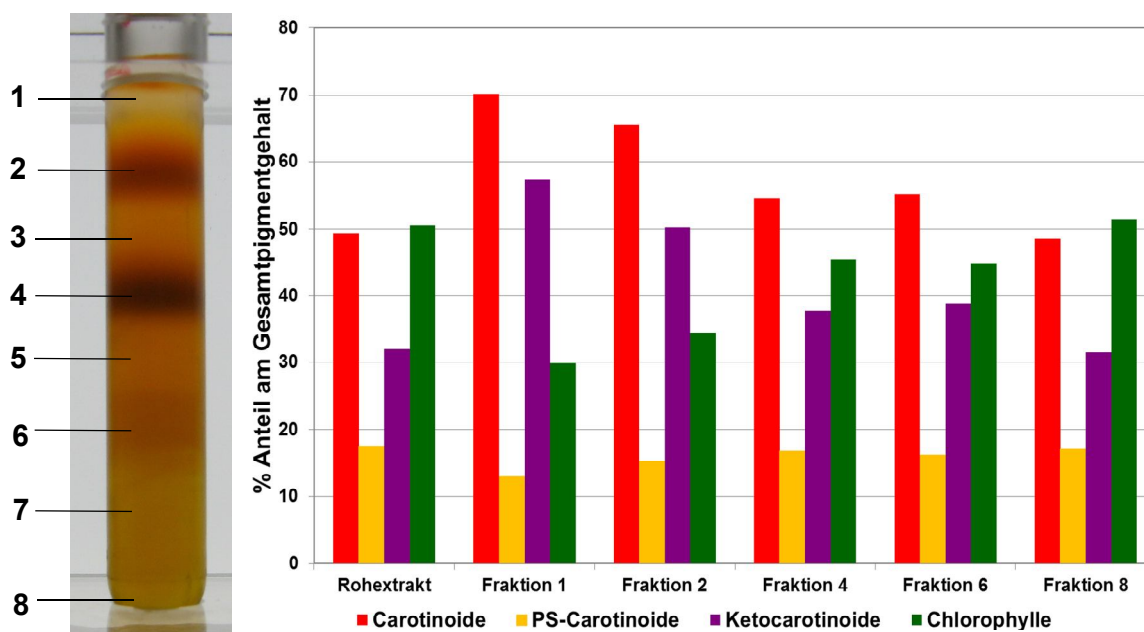


Abbildung III.7.9) Auftrennung der Lipid-Membran-Fractionen von Aplanosporen von *H. pluvialis* (12 Tage lang in Desmidiaceenmedium als Standkultur bei 18°C und 60 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ gelagert) mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation, mit einer Übersicht über die Pigmentgehalte in den verschiedenen Fraktionen vor und nach der Auftrennung mittels UZ

Sowohl für die Zygosporen von *C. reinhardtii* wie auch für die Aplanosporen von *H. pluvialis* konnte keine erfolgreiche schonende Zellhomogenisierung erfolgen. Daher wurden mit dieser Methode keine weiteren Experimente durchgeführt.

8. 9 °C-Zygoten können Ketocarotinoide synthetisieren, wenn man sie in eine 30 °C warme Umgebung transferiert.

Die besonderen Eigenschaften der 9 °C-Zygoten wurden in den Kapiteln III.6 und III.7 dargestellt. Als nächster Versuchsansatz wurde getestet, ob in diesen Zygoten die Ketocarotinoidsynthese wieder aktiviert werden konnte. Dazu wurden die für sechs Monate bei 9 °C gelagerten Zygoten in eine 30 °C warme Umgebung transferiert. Nach drei Wochen Lagerung bei 30 °C im Dunkeln wurden die Zellen geerntet und die Pigmente analysiert. Als Vergleich dienten 9 °C-Zygoten des gleichen Paarungsansatzes, die während der drei Wochen weiterhin in den 9 °C kalten Lagerbedingungen verblieben waren. Für das Experiment wurden zwei Zygosporenplatten bei 30 °C inkubiert. Nach drei Wochen Lagerung zeigte eine Platte eine deutlich orangefarbene Färbung, währenddessen die zweite eher olivgrün erschien. Die Zygoten auf der Kontrollplatte, die während der drei Wochen weiterhin bei 9 °C gelagert worden waren, hatten eine grüne Färbung.

8.1. Mikroskopische Beobachtungen dieser Zygosporen

Die geernteten Zygoten wurden zunächst mittels DIK-Mikroskop morphologisch untersucht. Die konstant bei 9 °C gelagerten Zygoten zeigten die bereits unter Kapitel III.6 vorgestellte Morphologie: Die Zellen erschienen hyalin, der grüne Chloroplast war erkennbar, ebenso wie einige globuläre Einschlüsse, bei denen es sich vermutlich um Lipidtröpfchen handelte. Die beiden bei 30 °C nachgelagerten Proben zeigten einen auffälligen Unterschied: Die Zellen schienen von zwei Hüllen bzw. Zellwänden umgeben, die eindeutig dicker als die der 9 °C-Proben waren (Abb. III.8.1). Die grüne Färbung des Chloroplasten konnte weniger beobachtet werden. Die Zellen erscheinen zwar immer noch etwas hyalin, aber das Cytoplasma war dicht gefüllt mit kleineren globulären Strukturen. Zwischen den olivfarbenen und den orangefarbenen Proben konnte kein wesentlicher Unterschied beobachtet werden.

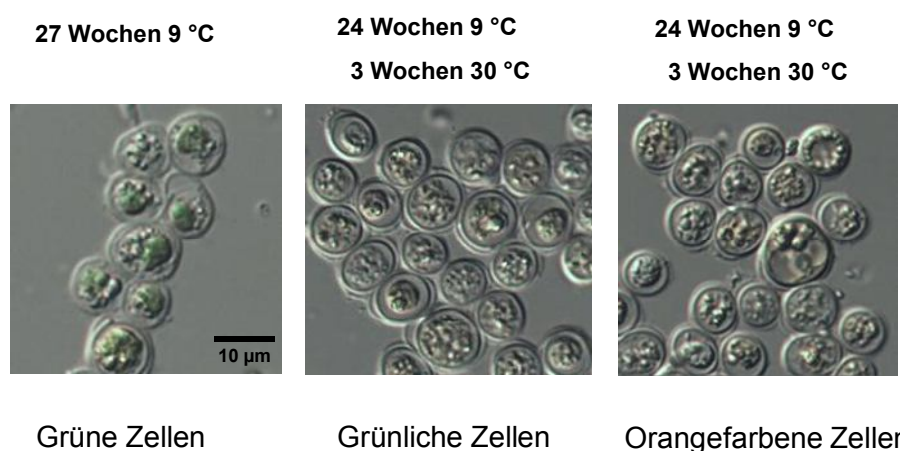


Abbildung III.8.1) DIK-Aufnahmen verschiedener Zygosporen von *C. reinhardtii* (cc620 x cc621), alle bei 9 °C im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten gelagert, zum Teil im Anschluss daran bei 30 °C inkubiert.

8.2. Die Pigmentzusammensetzung in den kalt gelagerten Zygosporen ändert sich durch die Lagerung unter warmen Bedingungen deutlich

Die Pigmente der verschiedenen Zygosporen wurden gemäß Standardprotokoll (Kapitel II.3.1.5) extrahiert und mittels HPLC untersucht. Dabei zeigten die sechs Monate alten Zygosporen, die konstant bei 9 °C gelagert worden waren, nur geringe Mengen an Ketocarotinoiden (Abb. III.8.2). Die beiden Proben, die zusätzlich bei 30 °C inkubiert worden waren, zeigten einen deutlich höheren Gehalt an Ketocarotinoiden, die nicht nur als freie Pigmente, sondern auch mit Fettsäuren verestert vorlagen. Es wurden sowohl Monoacyl- als auch Diacyl ester detektiert. Bezüglich der PS-Carotinoide wurden in den 9 °C - 30 °C-Proben überdurchschnittlich viel Lutein und β -Carotin gefunden.

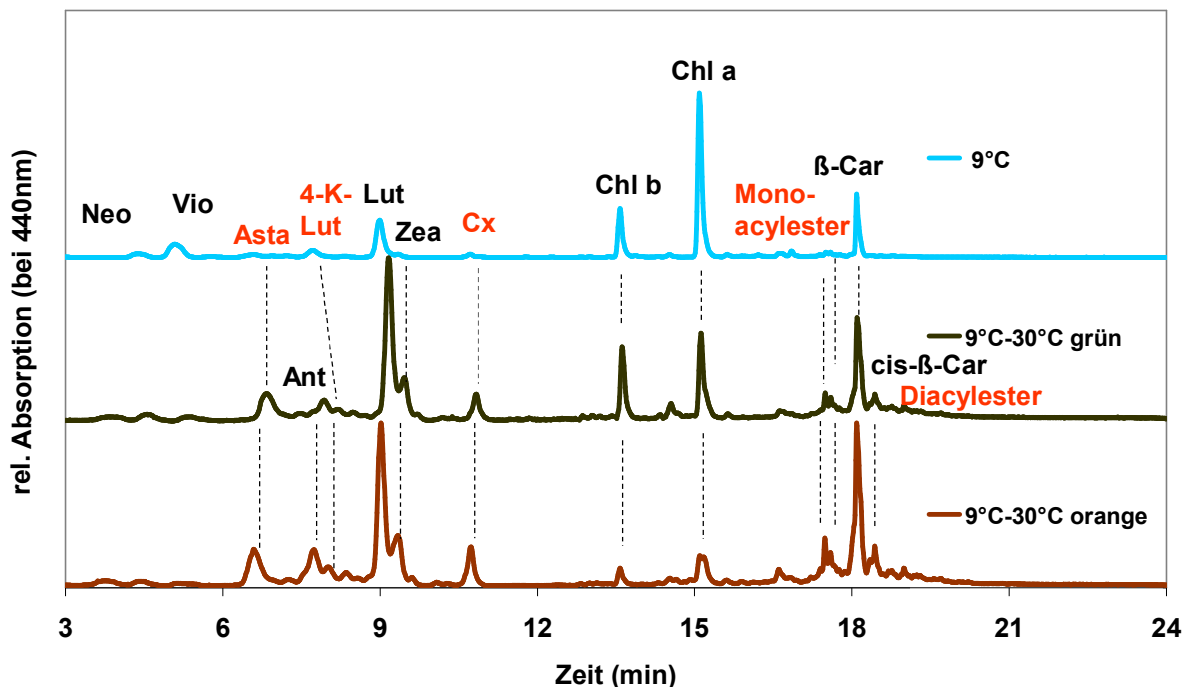


Abbildung III.8.2) HPLC-Chromatogramme der Pigmentextrakte von Zygosporen von *C. reinhardtii*, die entweder für 27 Wochen konstant bei 9 °C gelagert wurden oder zunächst für 24 Wochen bei 9 °C und anschließend für 3 Wochen bei 30 °C, Lagerung im Dunkeln auf TAP-N-Agarplatten, HPLC-Gradient 1B.

Des Weiteren wurden die Pigmentverhältnisse untereinander bestimmt. Dazu wurden molaren Pigmentmengen miteinander ins Verhältnis gesetzt. Es zeigte sich, dass bei beiden 9° - 30 °C-Proben der Anteil der Chlorophylle am Gesamtpigmentgehalt deutlich abgenommen hatte (Abb. III.8.3). Dabei war der Anteil der Chlorophylle bei den orangefarbenen Zellen noch geringer als der der grün-olivfarbenen Zygoten (11 bzw. 28 %). Bei den Kontrollzygoten lag dieser Anteil bei 68 %. Bei beiden Zygoten dominierten die Carotinoide die Pigmentzusammensetzung der Zellen (89 bzw. 72 % am Gesamtpigmentgehalt). Bei den orangefarbenen Zygoten waren etwa gleich viele Ketocarotinoide wie PS-Carotinoide

vorhanden, während bei den grün-olivfarbenen Zellen die PS-Carotinoide dominierten. Die Kontrollzygoten besaßen einen Ketocarotinoidanteil von 8 %.

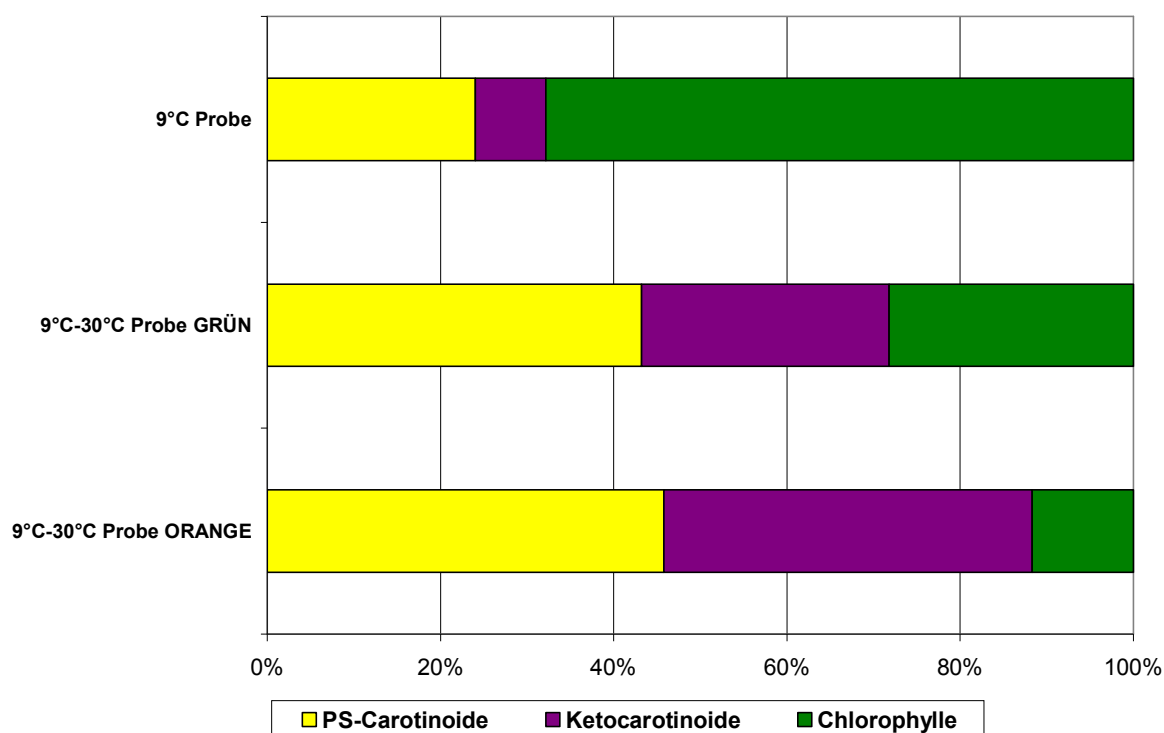


Abbildung III.8.3) Prozentualer Pigmentanteil am Gesamtpigmentgehalt in Zygosporangien, die 24 Wochen bei 9 °C und anschließend für drei Wochen bei 30 °C gelagert worden waren. Als Kontrolle wurde ein Ansatz konstant bei 9 °C gelagert. Datenbasis molare Werte.

9. Untersuchungen der BKT und Vergleichsgenen in verschiedenen Zellstadien

Neben pigmentbiochemischen Experimenten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch das ketolierende Enzym BKT in der Grünalge *C. reinhardtii* untersucht. Um Hinweise auf die Regulation dieses Enzym zu erhalten, wurden Nachweise des Gens der BKT auf Transkriptebene in verschiedenen Zellstadien durchgeführt. Als Kontrolle dienten die Gene der Enzyme Chlorophyllid-A-Oxygenase (CAO) sowie β -Carotin-Hydroxylase (CHYB). Die CAO katalysiert die Einführung der Hydroxygruppe am Porphyrinring des Chlorophyll a zum Chlorophyll b, so dass deren Transkript in photosynthetisch aktiven Zellen zu finden sein sollte. Die CHYB katalysiert dagegen die Synthese des PS-Carotinoids Zeaxanthin aus β -Carotin und sollte ein Indiz für die Transkriptaktivität von an der Carotinoidbiosynthese beteiligten Genen sein.

9.1. Nachweis der BKT und Kontrollgenen in vegetativen Zellen mittels RT-PCR

Der Nachweis der BKT aus *C. reinhardtii* erfolgte mittels PCR zunächst mit DNA als Template für Vergleichs- und Kontrollversuche und später mit cDNA. Die Primer wurden so gewählt, dass die amplifizierte Sequenz mindestens ein Intron überspannte, um über einen Größenvergleich die Art des Templates zu kontrollieren. Wurde DNA amplifiziert, war das PCR-Produkt um die Introngröße länger als bei einer Amplifikation von cDNA, die keine Intronsequenzen enthielt. Der reverse Primer wurde im 3'untranslatierten Bereich (3'UTR) gewählt. Dies sollte eine falsch-positive Amplifikation aufgrund von Kontaminationen verhindern, da in der Arbeitsgruppe sehr viel mit BKT-Gensequenzen gearbeitet wurde. Da in den Arbeiten der Arbeitsgruppe allerdings ausschließlich translatierte Genbereiche amplifiziert wurden, stellte die in den vorliegenden Versuchen isolierten Nukleinsäuren die einzige Quelle für BKT-Sequenzen mit 3'UTR dar.

Für die Amplifikation wurde als Template DNA, bzw. cDNA von 5 Tagen lang unter Standardbedingungen angezogene Zellen des Stammes cc621 mt- verwendet, wobei die Einsatzmengen 1 μ l DNA bei der PCR (entsprach ca. DNA aus 1×10^5 Zellen/ μ l) sowie 1 μ l cDNA für PCR (entsprach ca. 23 ng cDNA pro Ansatz) beim Einsatz von 450 ng RNA in der Erststrangsynthese betragen (methodische Details siehe Kapitel II.6, Sequenz siehe Anhang 3.4.2).

Die BKT konnte mit der Primerkombination CrBKT-end-a2p und CrBKT-3UTR-e1m durch die Amplifikation mit dem GC-RICH Kit (Roche) in den vegetativen Zellen von *C. reinhardtii* (cc621) sowohl auf Gen- als auch auf Transkriptebene zweifelsfrei nachgewiesen werden (Abb. III.9.1). Die Banden lagen im erwarteten Größenbereich von 987 bp für DNA und 688 bp für cDNA. Die Negativkontrolle, bei der statt Nukleinsäure ddH₂O als Template verwendet wurde, zeigte wie erwartet keine Amplifikation.

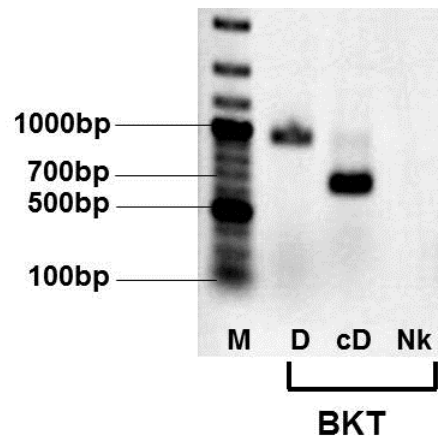


Abbildung III.9.1) Nachweis des Gens BKT aus DNA und cDNA von vegetativen Zellen: cc621 mt+ Standardanzucht; D: DNA als Template; cD: cDNA als Template, Nk: Negativkontrolle mit ddH₂O als Template; M: Marker Laddermix (Fermentas), Gel: TAE, 1 % Agarose.

Zusätzlich wurde die BKT-Expression auch in vegetativen Zellen des Stammes CLS 31-10 untersucht. Bei Verwendung von zwei unterschiedlichen RNA-Extraktionskits wurde eine Amplifikation der BKT für cDNA gezeigt (siehe Anhang 3.4.1). Die von Matthias Bauch zur Verfügung gestellten Primer banden beide im ORF der BKT und amplifizierten über Introns hinweg. Die Länge der Amplifikate entsprach den erwarteten Größen von cDNA und nicht von DNA. Das zeigte, dass die BKT in mehreren Stämmen von *C. reinhardtii* bereits in vegetativen Zellen transkribiert wird.

Für den Nachweis der Vergleichsgene CAO und CHYB wurden wie auch für die BKT intronüberspannende Primerkombinationen gewählt, zusätzlich lag ein Primer im 3'UTR-Bereich (Sequenzen siehe Anhang 3.4.2). Beide Gene konnten, wie die BKT, in vegetativen Zellen von *C. reinhardtii* sowohl auf Gen- als auch auf Transkriptebene nachgewiesen werden (Abb. III.9.2). Die Banden lagen für die CAO im erwarteten Größenbereich von 927 bp für DNA und 765 bp für cDNA (Primerkombination: CrCAO-end-a2p und CrCAO-3UTR-e1m) bzw. für die CHYB bei 1407 bp für DNA und 627 bp für cDNA (Primerkombination: CrCHYB-end-a2p und CrCHYB-3UTR-e2m). Die Amplifikation der CHYB lieferte beim Einsatz von cDNA nur schwach gefärbte Banden. Dies sprach für nur eine geringe Anzahl an CHYB-Kopien in der Template cDNA-Mischung und folglich für eine geringe Anzahl an CHYB-Transkripten in der mRNA von *C. reinhardtii*, was wiederum für eine erschwerten Nachweis in den Untersuchungen zum Gennachweis in verschiedenen Zellstadien sprach.

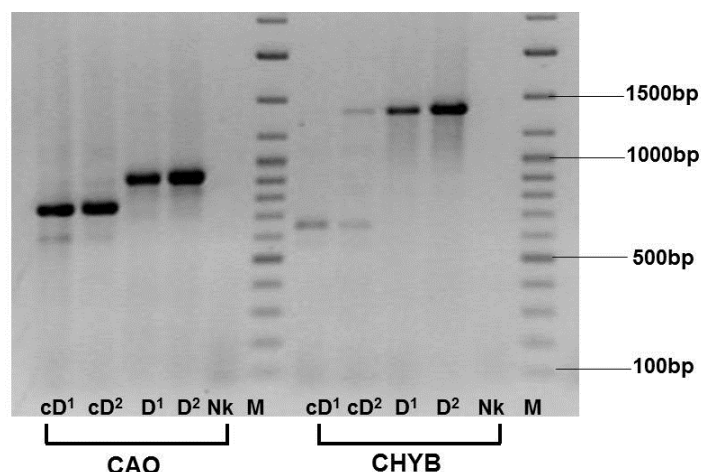


Abbildung III.9.2) Nachweis der Gene CrCAO und CrCHYB in DNA (D) und cDNA (cD) aus vegetativen Zellen der Stämme cc621 (1) und cc620 (2), Zellen aus Standardanzucht, NK: Negativkontrolle mit ddH₂O als Template, Marker (M): Laddermix (Fermentas), Gel: TAE, 1 % Agarose.

9.2. Nachweis der Expression der BKT und Kontrollgenen in Zygoten mittels RT-PCR

Obwohl Ketocarotinoide lediglich in den Zygosporen von *C. reinhardtii* detektiert wurden, konnte das postulierte ketocarotinoidsynthetisierende Enzym BKT bereits in vegetativen Zellen auf Transkriptionslevel nachgewiesen werden. Der Nachweis entsprach den Vermutungen, da die Identifikation der BKT aus *C. reinhardtii* in Untersuchungen von EST-Sequenzen erfolgt war. Um zu untersuchen, wie sich die Transkriptionsrate der BKT in den Zygosporen ändert, wurden vergleichende cDNA-Untersuchungen aus vegetativen Zellen und Zygoten durchgeführt.

Dazu wurde RNA sowohl aus vegetativen Zellen als auch aus Zygoten extrahiert und als Basis für eine Erststrangsynthese eingesetzt. Mit dieser wurde eine PCR durchgeführt. Als Primer wurden die bereits unter Kapitel III.9.1 erfolgreich verwendeten Primerkombinationen eingesetzt.

Schwierigkeiten traten bei der Extraktion der RNA aus Zygosporen auf. Die mehrschichtige sekundäre Zellwand erschwerte das Aufbrechen der Zellen massiv, in vielen Fällen konnten nur geringe Zellmengen tatsächlich aufgebrochen werden. Die harschen Homogenisierungsmethoden mit der Glaskugelmühle (B.Braun) rief Probleme mit den Puffern der Extraktionskits hervor. Die enthaltenden Detergenzien führten zu einem intensiven Aufschäumen, so dass nur noch geringe Lösungsmengen rückgewonnen wurden. Wurde auf den Einsatz der Pufferlösungen verzichtet und nur unter CO₂-Kühlung homogenisiert, kam es zur Degradation der RNA, vermutlich infolge von RNasen.

Somit fiel die Wahl auf spezielle 2 ml-Gefäße (ICN/peqlab), die mit 0,1 mm großen Kunststoffkugeln gefüllt und ursprünglich für die Homogenisierung von Bakterien vorgesehen waren. Die Zygosporen wurden zunächst auf GF6-Filter (Whatman) transferiert und dann zusammen mit einem TRIS-Puffer und der vorgesehenen Lysislösung des Kits im Bead Beater aufgeschlossen. Ebenso gute Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Zellen pelletiert,

direkt im Homogenisierungspuffer resuspendiert und mit Zugabe eines Stücks des GF6-Filters in den Tubes aufgeschlossen wurden. Von der gewonnenen RNA wurden 220 ng in die Erststrangsynthese eingesetzt.

In den ersten Experimenten zur Amplifikation der BKT aus Zygoten-cDNA wurden Primerkombinationen verwendet, die zwar nicht intronüberspannend waren, aber bei dem der reverse Primer im 3'UTR lag (CrBKT-end-a1p und CrBKT-3UTR-e2m). Als Vergleichszellstadium wurden in diesem Versuch ungepaarte Gameten gewählt, die von der Zygotenplatte angespült worden waren (Abb. III.9.3). Sie waren somit unter identischen Bedingungen gelagert worden. In beiden Proben wurde die BKT nachgewiesen, allerdings zeigten die Bahnen mehrere Banden, von denen eine im erwarteten Größenbereich von 389 bp lag. Bei diesem Versuch waren die Annealingtemperaturen noch nicht optimal ausgewählt. Auffällig war, dass beim Einsatz der beiden verschiedenen Templates in etwa gleich intensive Banden zu erkennen waren. Für die Erststrangsynthese wurden für die Zygotenprobe 450 ng gRNA und für die Gametenprobe 750 ng gRNA eingesetzt. Unklar war jedoch, wie hoch der mRNA-Anteil der Proben war.

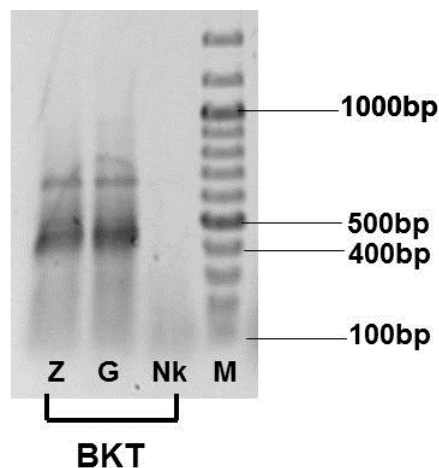


Abbildung III.9.3 Nachweis des Gens CrBKT in cDNA aus Zygosporen (Z) und ungepaarte Gameten (G) Stämme cc620 und cc621;
 Zygosporen: 5 Tage bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Platten gelagert,
 Gameten: abgespülte Gametenzellen einer Zygotenplatte: 5 Tage bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Platten gelagert,
 Nk: Negativkontrolle mit ddH₂O als Template,
 Gel: TAE, 1 % Agarose, Marker (M): Laddermix (Fermentas).

Für die späteren Experimente wurden, wie unter Kapitel III.9.1 beschrieben, intron-überspannende Primerkombinationen gewählt, von denen der reverse Primer zusätzlich im 3'UTR band. Bei diesen Versuchen wurden als vergleichendes Zellstadium vegetative Zellen untersucht.

Dafür wurde die RNA der vegetativen Zellen mit dem gleichen Verfahren wie bei den Zygoten extrahiert. Dazu wurden 700 ng RNA in die Erststrangsynthese eingesetzt, da bei

vegetativen Zellen die verfügbare RNA-Menge im Gegensatz zu den Zygosporen nicht begrenzt war.

Sowohl von Zygoten-cDNA als auch von vegetativer Zellen-cDNA wurden 2 µl pro 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

Mit Hilfe der unter Kapitel III.9.1 beschriebenen Primerkombinationen konnten beide Gene in den vegetativen Zellen auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden (Abb. III.9.4). Zusätzlich wurde die BKT auch in der Zygoten-cDNA detektiert, während die CAO dort nicht mehr nachgewiesen wurde. Bei der BKT zeigte die resultierende Bande der PCR mit Zygosporen-cDNA eine deutlich intensivere Färbung als die mit cDNA aus vegetativen Zellen.

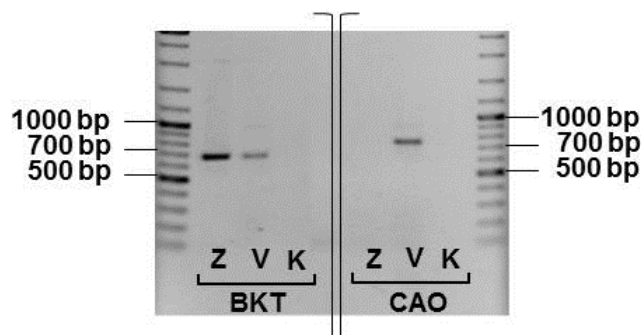


Abbildung III.9.4) Nachweis der Gene CrBKT und CrCAO in cDNA aus Zygosporen (Z) und veg. Zellen (V);

Zygosporen: cc620 x cc621, 5 Tage bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Platten gelagert,

Vegetative Zellen: cc621, Standardanzucht,

K: Negativkontrolle mit ddH₂O als Template,

Gel: TAE, 1 % Agarose, Marker (M): Laddermix (Fermentas).

Der Nachweis der BKT in Zygoten von *C. reinhardtii* wurde in drei unabhängigen Versuchen bestätigt.

9.3. Nachweis von zygotenspezifischen Transkripten: Das Gen Zym C

Obwohl die Enzymaktivität der BKT auf die Zygoten beschränkt ist, war das Transkript des Gens bereits in den vegetativen Zellen nachgewiesen worden (Abb. III.9.4). Daher wurde ein Vergleichsgen untersucht, das als zygotenspezifisch beschrieben worden war (Wegener und Beck 1991). Dieses Gen sollte demonstrieren, ob im Rahmen der durchgeführten Experimente ausschließlich zygotenspezifische Gene nachgewiesen werden konnten. Dieses ZymC-Gen war im Rahmen von Northern Blot-Analysen identifiziert worden, die auf Zygotenextrakten basierten, welche zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Paarung gewonnen wurden.

Ein Plasmid, das das Gen von ZymC enthielt, wurde freundlicherweise von Christoph Beck, Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt. Die Sequenzierung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit vektorspezifischen Sequenzierungsprimern durchgeführt (Sequenz siehe Anhang 3.4.2).

Mit Hilfe der Primerkombination CrZymC_a2p und CrZymC_e2m wurde cDNA von Zygoten und vegetativen Zellen auf die Existenz des Transkripts von ZymC untersucht, nachdem die Positivkontrolle mit der Plasmidprobe erfolgreich war (erwartete Amplifikatlänge für cDNA 283 bp, für DNA 730 bp).

Das Gen ZymC konnte sowohl in der cDNA von Zygoten aber auch von vegetativen Zellen detektiert werden (Abb. III.9.5). Dies war unerwartet, da Wegener und Beck gezeigt hatten, dass dieses Gen ausschließlich in mindestens zwei Tage alten Zygoten transkribiert wurde (Wegener und Beck 1991).

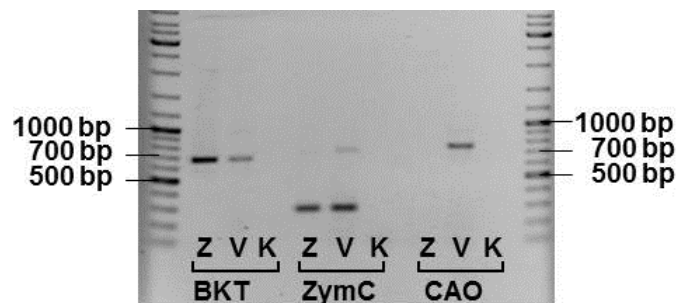


Abbildung III.9.5) Nachweis der Gene CrBKT, CrZymC und CrCAO in cDNA aus Zygosporen (Z) und vegetativen Zellen (V);
 Zygosporen: cc62 β x cc621, 5 Tage bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Platten gelagert,
 Vegetative Zellen: cc621, Standardanzucht,
 K: Negativkontrolle mit Wasser als Template,
 Gel: TAE, 1 % Agarose, Marker (M): Laddermix (Fermentas).

Die Northern Blot-Analysen von Wegener und Beck waren mit Zygoten der Stämme 137c mt+ und 137c mt- durchgeführt worden und folglich mit anderen als der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zygoten. Möglicherweise wird das Gen ZymC in dem Stamm cc621 bereits in vegetativen Zellen transkribiert. Eine Klärung könnte eine Wiederholung des Versuches mit neu synthetisierter cDNA geben.

9.4. Nachweis von frühen Zygotengenen: Das Gen EZY 15

Nachdem das Transkript der BKT bereits in vegetativen Zellen nachgewiesen werden konnte, wurden auch Transkripte weiterer Gene untersucht, deren Hochregulation in den Zygoten beschrieben worden war (Kubo et al. 2008). Die Wahl fiel dabei auf das early zygote expressed (EZY) Gen 15, das aufgrund von Sequenzhomologien zu *Arabidopsis thaliana* als putatives Calmodulin-verwandtes Protein beschrieben worden war (Sequenz siehe Anhang 3.4.2). Dieses hatte in den Northern-Blot-Analysen durch Kubo und Kollegen keine Bande in der Gametenfraktion gezeigt, so dass eine reine Transkription in den Zygoten vermutet wurde (Kubo et al. 2008).

Dieses Gen wurde allerdings in den eigenen Untersuchungen sowohl in vegetativen Zellen, in Gameten als auch in Zygoten nachgewiesen. Die Negativkontrolle zeigte dabei keine Amplifikation (Abb. III.9.6).

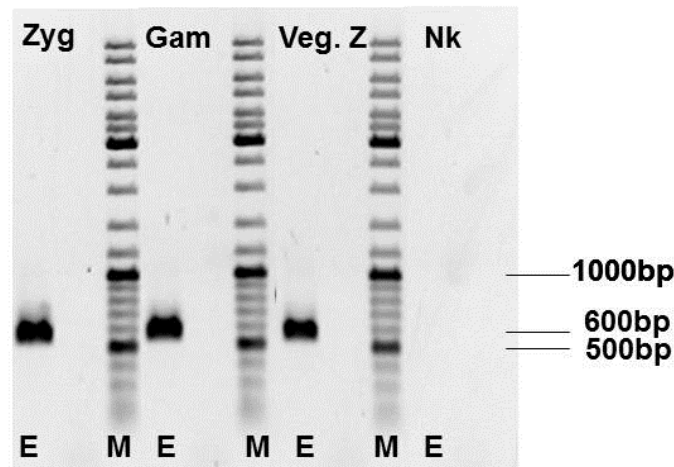


Abbildung III.9.6) Nachweis des Transkriptes des Gens CrEZY15 (E) in cDNA aus Zygosporen, Gameten und vegetativen Zellen;
Zygosporen 5 Tage bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Platten gelagert,
Gameten: ab gespülte Gametenzellen einer Zygotenplatte: 5Tage bei 22 °C im Dunkeln auf TAP-N-Platten gelagert,
Vegetativen Zellen: cc621, Standardanzucht,
Nk: Negativkontrolle mit Wasser als Template,
Gel: TAE, 1 % Agarose, Marker (M): Laddermix (Fermentas).

Im Anschluss an dieses Ergebnis wurden Blastsuchen mit den Gensequenzen der EZY-Gene aus der Veröffentlichung von Kubo und Kollegen (2008) in der EST-Datenbank des Joint Genome Institute (www.jgi.doe.gov) durchgeführt. Dabei wurden 13 der 21 Gene sicher, d.h. in mehreren ESTs, in vegetativen Zellen von *C. reinhardtii* nachgewiesen (Tabelle siehe Anhang 3.4.3).

Aufgrund dieser Untersuchung wurden die meisten EZYs nicht mehr als zygotenspezifisch eingeordnet, sondern die Ergebnisse zeigten, dass die Expression dieser Gene in den Zygoten lediglich hoch reguliert wurde.

10. Untersuchung der Zygoten von *Chlamydomonas moewusii*

Chlamydomonas moewusii wird der Familie der *Chlamydomonales* zugeordnet und gilt als relativ nah verwandt zu *C. reinhardtii* (Harris 2009). Für *C. moewusii* wurde die Zygotenbildung in der Literatur mehrfach beschrieben (Brown et al. 1968, Harris 2009). Ketocarotinoide wurden in dieser Alge bisher nicht detektiert. Nachdem in *C. reinhardtii* die Ketocarotinoidakkumulation in Zygosporen entdeckt wurde, sollte die verwandte Alge *C. moewusii* ebenfalls auf Ihre Fähigkeit Ketocarotinoide zu synthetisieren getestet werden. Dazu wurden neben Zygoten und gelagerten Gameten auch junge und alte vegetative Zellen untersucht.

10.1. Zygotenbildung von *C. moewusii*

Für die Paarung wurden die *C. moewusii* Stämme SAG 1.98 und 2.98 verwendet. Im Gegensatz zu *C. reinhardtii* ist *C. moewusii* nicht in der Lage, Acetat als Energiequelle zu verwenden und kann somit nur rein autotroph wachsen (Lewin 1950). Aus diesem Grund mussten alle Paarungsversuche mit anderen Nährmedien als bei *C. reinhardtii* durchgeführt werden.

Für die Gameteninduktion wurden die auf Basal-Festmedium angezogenen Zellen der beiden Paarungstypen mit destilliertem Wasser überschichtet und anschließend für drei Stunden im Licht inkubiert. Dabei entstanden mobile Zellen, die in einer leeren, sterilen Petrischale vereint wurden. Diese wurden erneut im Licht inkubiert und dann auf Plattenkulturen mit Minimalmedium gegeben. Die ausplattierten Paarungsansätze blieben 36 Stunden im Licht und wurden danach bei 22 °C ins Dunkle gestellt.

Bereits nach einer Woche konnte unter dem Mikroskop eine erfolgreiche Zygotenbildung beobachtet werden, da, wie auch bei *C. reinhardtii*, kreisrunde größere Zellen zwischen unregelmäßig geformten kleineren Zellen vorhanden waren (Abb. III.10.1). Diese größeren Zellen befanden sich in einer anderen Fokussierungsebene als die unregelmäßig geformten kleineren. Dies sprach für ein Absinken der Zygoten in den Agar, vergleichbar zu den Zygosporen von *C. reinhardtii*. Für die Untersuchung von gereiften Zygoten wurden die Zellen allerdings für mindestens drei Monate gelagert.

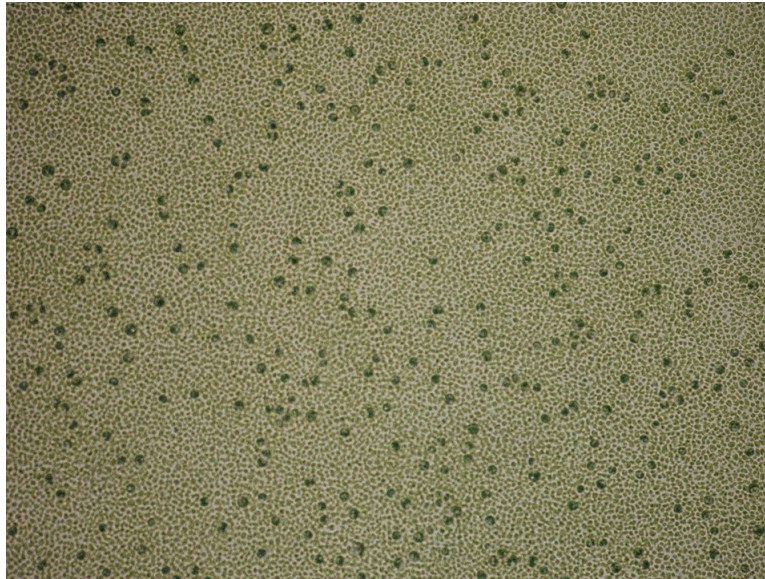


Abbildung III.10.1) 3 Monate lang bei 22°C im Dunkeln auf MIN-Medium gelagerte Zygoten von *C. moewusii*, SAG 1.98 x SAG 2.98, Platte nicht abgespült, d.h. Zygoten und ungepaarte Gameten sichtbar, 200fache Vergrößerung.

Auffällig waren die makroskopisch beobachtete Farbkonstanz der Plattenkulturen sowie die konstant grüne Farbe der Zygoten unter dem Mikroskop.

Untersuchungen im Fluoreszenzmikroskop zeigten zusätzlich, dass diese Zygoten ihre Chlorophyllautofluoreszenz nicht verloren hatten. Es konnte kein Unterschied zu den anderen Zellen beobachtet werden (Abb. III.10.2). Dies bedeutete, dass die Chlorophylle und somit höchstwahrscheinlich auch die Chloroplasten in reifen Zygoten nicht reduziert wurden.

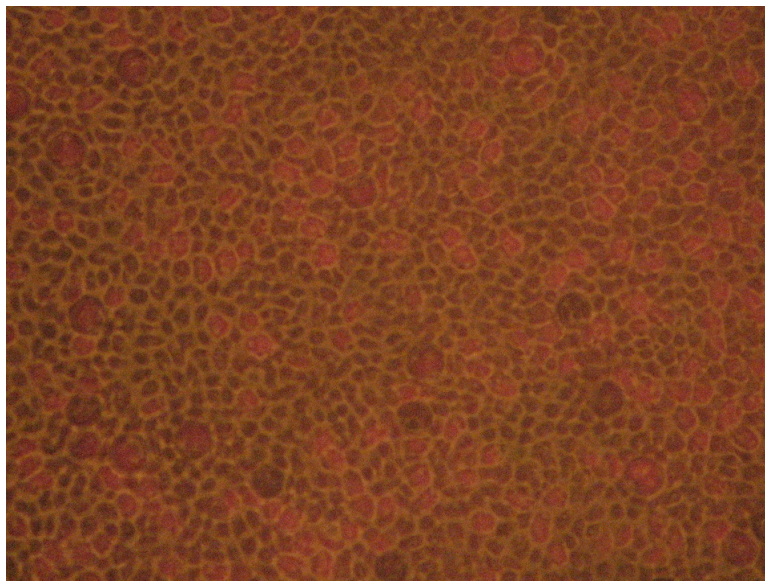


Abbildung III.10.2) Autofluoreszenz von 3 Monate lang gelagerte Zygotenplatte von *C. moewusii*, SAG 1.98 x SAG 2.98, Platte nicht abgespült, d.h. Zygoten und ungepaarte Gameten sichtbar, Lagerung auf MIN-Medium im Dunkeln bei 22 °C (Anregung mit blauem Fluoreszenzlicht, 400fache Vergrößerung).

Für die Pigmentuntersuchungen wurden junge vegetative Zellen (18 Tage), ältere vegetative Zellen (5 Monate) sowie Zygosporen und abgospülte ungepaarte Gameten (beide 4 Monate) von den Agarplatten entfernt, auf Glasfaserfilter transferiert und gemäß Standardprotokoll (Kapitel II.3.1.5) homogenisiert. Bei der Untersuchung der Pigmentextrakte mittels HPLC zeigte sich, dass auch bei mehrmonatiger Lagerung weder Zygoten noch Gameten oder vegetative Zellen Ketocarotinoide synthetisierten (Abb. III.10.3).

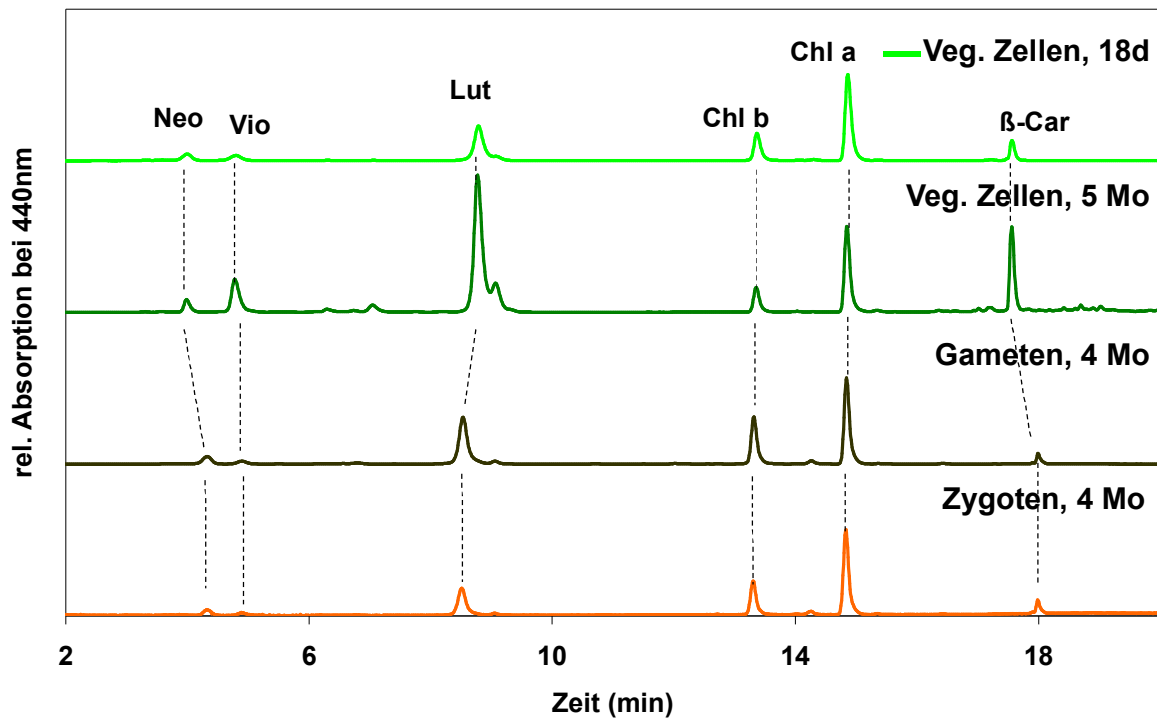


Abbildung III.10.3) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten verschiedener Zellstadien von *C. moewusii*, normalisiert auf Chl a.
 Vegetative Zellen: SAG 2.98, 18 Tage oder 5 Monate lang bei $30 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf Basalmedium-Plattenkulturen gelagert;
 Zygoten und abgospülte Gameten: SAG 1.98 x SAG 2.98, 4 Monate lang im Dunkeln bei 22°C auf Minimalmedium-Platten gelagert, HPLC-Gradient 1B.

10.2. Der Einfluss von Stickstoffmangel auf die Zygotenbildung von *C. moewusii*

Nachdem erste Untersuchungen in Zygoten von *C. moewusii* keinen Nachweis auf Ketocarotinoide lieferten, wurden die Zygotenreifungsbedingungen genauer analysiert. Die Protokolle zur Zygotenbildung in *C. moewusii* sahen eine Verwendung von MIN-Medium während der Zygotenreife vor. Dieses enthielt 2 mmol anorganischen Stickstoff in Form von Ammoniumnitrat pro Liter Medium und könnte eine Zygotenreife unter Stickstoffmangel, wie sie in *C. reinhardtii* erfolgt, verhindern. Daher wurde im Anschluss die Inkubation auf MIN-N-Medium untersucht, das keine stickstoffhaltigen Salze enthielt.

Der Einfluss von Stickstofflimitierung auf die Zygotenreife wurde in einem Experiment untersucht, bei dem die gepaarten Zygoten zum einen auf MIN- sowie auf MIN-N-Agarplatten ausplattiert, für 24 Stunden im Licht belassen und dann bei 22°C im Dunkeln inkubiert wurden. Nach vier Monaten wurden die Gameten abgospült und die Pigment-

zusammensetzung der Zygoten mittels Pigmentextraktion und anschließender HPLC-Analyse untersucht.

Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede bei der Pigmentzusammensetzung der auf unterschiedlichen Medien inkubiert Zygotenproben (Abb. III.10.4). In keinem der Ansätze konnten Ketocarotinoide nachgewiesen werden.

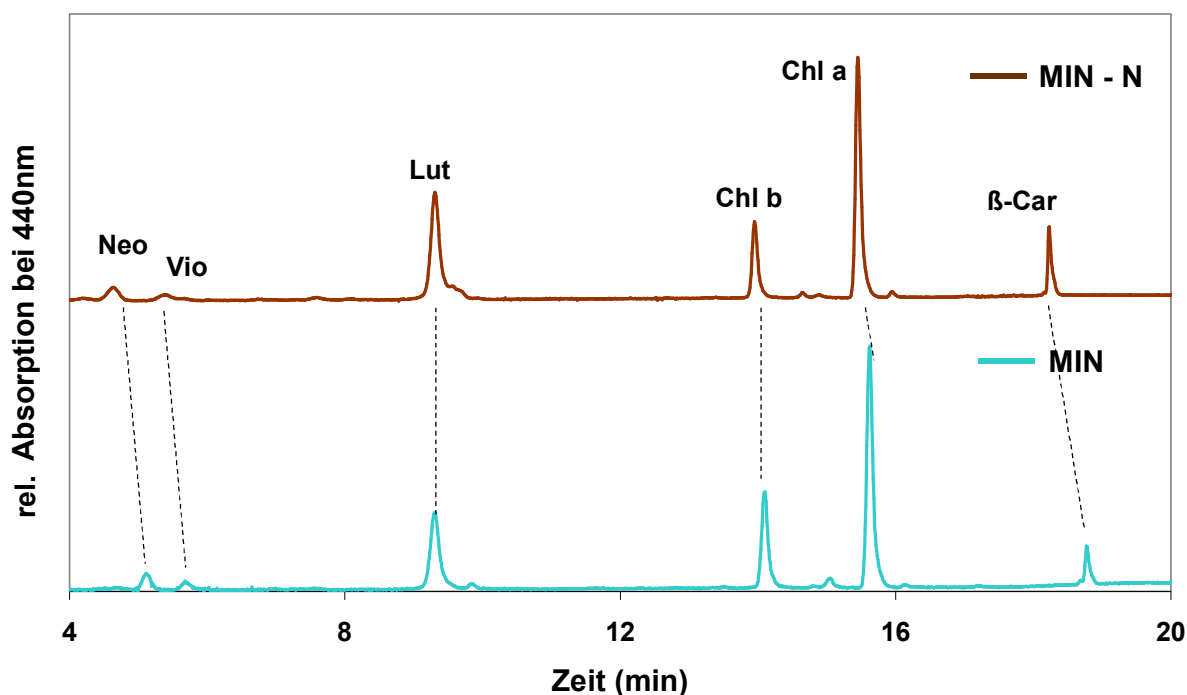


Abbildung III.10.4) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten aus Zygosporen von *C. moewusii*, gelagert auf Agarplatten aus Minimalmedium mit und ohne organische Stickstoffquelle. Zygoten: SAG 1.98 x SAG 2.98, 4 Monate lang im Dunkeln gelagert auf MIN oder MIN-N-Platten bei 22 °C, HPLC-Gradient 1B.

10.3. Der Einfluss von Licht und Stickstoffmangel

Bei genaueren Überlegungen zum Versuchsaufbau wurde deutlich, dass eine wesentliche physiologische Eigenschaft von *C. moewusii* bisher außer Acht gelassen wurde:

C. moewusii ist nicht in der Lage Acetat als Energiequelle zu nutzen; das Wachstum erfolgt ausschließlich autotroph (Lewin 1950). Während *C. reinhardtii* auf acetathaltigem Medium im Dunkeln überleben, bzw. sogar wachsen kann, wurde diese Eigenschaft für *C. moewusii* bisher nicht beschrieben. Es war somit möglich, dass ein Mangel an organischer Kohlenstoffversorgung bei gleichzeitigem Lichtmangel zu einer völligen Zellruhe oder dem Absterben der Zellen führte, da keine Energie zum Aufbau von Reservestoffen oder Schutzfaktoren (z.B. Zellwand) vorhanden war. Somit wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, die sowohl die beiden Medien als auch die beiden Lichtbedingungen miteinander kombinierte.

Für diesen Versuchsaufbau wurden die für zwei Stunden bei $60 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ gepaarten Gameten der Stämme SAG 1.98 und 2.98 gleichmäßig auf MIN- sowie MIN-N-Agarplatten verteilt. Alle Platten wurden für 24 Stunden ins Licht gestellt. Danach wurde von jeder Medienplatte ein Ansatz ins Dunkle transferiert, die andere Platte verblieb im Licht. Die Inkubation erfolgte bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 Wochen.

Danach wurden die Platten zunächst mikroskopisch untersucht (Abb. III.10.5). Bei der Platte mit MIN (incl. Stickstoff), die im Licht inkubiert wurde, war ein dichter grüner Zellrasen zu beobachten. Es konnten keine größeren Zellen beobachtet werden.

Bei allen drei anderen Ansätzen konnten unregelmäßig große Zellen beobachtet werden. Die Kombination aus kreisrunden, etwas größeren Zellen, die in den ersten Ansätzen als Zygoten beschrieben wurden, umgeben von kleinen, unregelmäßig geformten Zellen, die als ungepaarte Gameten beschrieben wurden, konnte nur im Ansatz MIN im Dunkeln nachgewiesen werden.

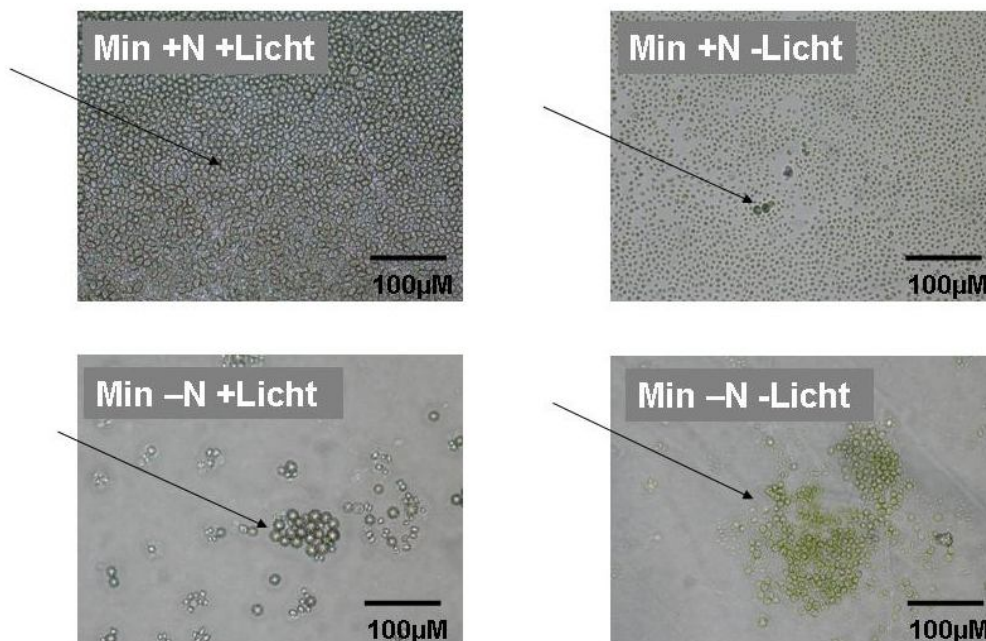


Abbildung III.10.5) Mikroskopischer Überblick über den Einfluss von Licht und Stickstoffmangel auf die Zygotenreife von *C. moewusii* (SAG 1.98 x SAG 2.98), 15 Wochen lang bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagerte Kulturen.

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Zygoten vom Agar getrennt, auf Filter transferiert und die Pigmente extrahiert.

Die Proben zeigten mittels HPLC-Untersuchung allesamt Pigmentspektren, bei denen keine Ketocarotinoide nachgewiesen werden konnten (Abb. III.10.6).

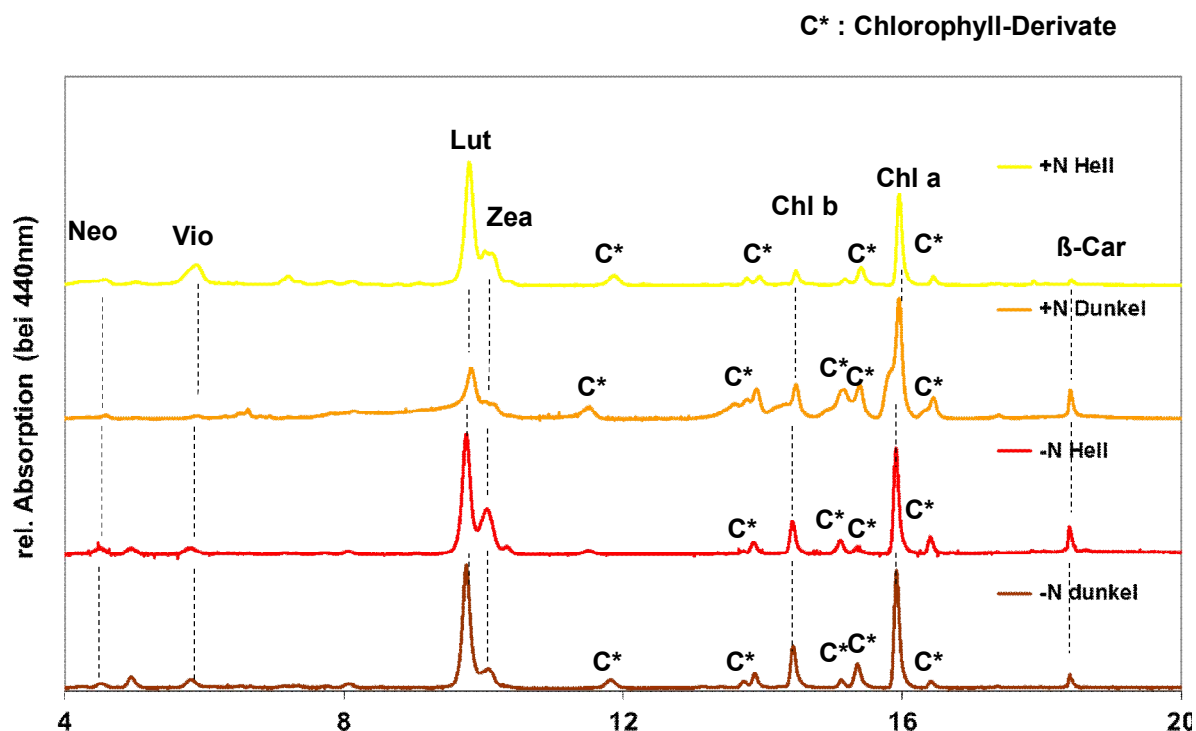


Abbildung III.10.6) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten verschiedener Inkubationsansätze zur Untersuchung der Zygotenbildung von *C. moewusii* (SAG 1.98 x SAG 2.98), 15 Wochen bei 22 °C gelagerte Kulturen, HPLC-Gradient 1B.

Aufgrund von Geräteproblemen und einer zwangsläufigen Lagerung der Pigmentextrakte über Nacht bei -20 °C wurden die Chlorophylle der Proben derivatisiert und die HPLC-Chromatogramme zeigten eine große Anzahl an Chlorophyllderivaten. Da von jedem Versuchsansatz lediglich eine Probe für die Pigmentanalyse gewonnen werden konnte, wurden die Spektren detailliert untersucht. Nachdem keinerlei Spuren von Ketocarotinoiden zu entdecken waren, wurde der Versuch nicht wiederholt.

Unter keiner der verwendeten Inkubationsmethoden war *C. moewusii* in der Lage Ketocarotinoide zu generieren. Mikroskopisch nachweisbare Zygoten entstanden allerdings nur auf Medium, das eine anorganische Stickstoffquelle enthält.

IV. DISKUSSION

1. Zygosporen von *C. reinhardtii* akkumulieren große Mengen an Ketocarotinoiden

Nachdem die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* trotz jahrzehntelanger Pigmentuntersuchung als unfähig zur Ketocarotinoidsynthese angesehen wurde (Czygan 1968, Leòn et al. 2007), stellen die Ergebnisse innerhalb der vorliegenden Arbeit eine überraschende Entdeckung dar. Vor Beginn der vorliegenden Forschungsarbeit wurden bei dieser Alge nur die auch bei Gefäßpflanzen und anderen Grünalgen präsenten, an der Photosynthese beteiligten Carotinoide β -Carotin, Lutein, Violaxanthin, Antheraxanthin, Zeaxanthin und Neoxanthin detektiert. Auffällig war lediglich die Präsenz des nur von einigen Grünalgen synthetisierten Loroaxanthins. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann *C. reinhardtii* nun auch in die Gruppe der ketocarotinoidakkumulierenden Grünalgen eingeordnet werden. Neben den bekannten Ketocarotinoiden Astaxanthin und Canthaxanthin finden sich große Mengen an 4-Ketolutein, ein Pigment, das bisher nur selten beschrieben wurde. Die Ketocarotinoide liegen sowohl als freie Pigmente, aber auch mit Fettsäuren verestert vor.

Es ist auffällig, dass bei *C. reinhardtii* die Ketocarotinoidsynthese auf die Zygosporen beschränkt ist. Das diploide Zellstadium stellt die Dauerform des Organismus dar, die ein Überleben unter ungünstigen Umweltbedingungen garantiert (Harris 2009). Dies ist eine Parallele zu vielen anderen ketocarotinoidakkumulierenden Grünalgen, bei denen die Ketocarotinoidsynthese auch auf das Dauerstadium beschränkt ist. Allerdings bilden viele dieser Algen, z.B. *Haematococcus pluvialis*, die Dauerformen durch eine morphologische Umwandlung der vegetativen Zellen zu haploiden Aplanosporen aus (Lemoine und Schoefs 2010).

1.1. Der Pigmentgehalt in vegetativen Zellen und Zygosporen von *C. reinhardtii*

Nachdem eine erfolgreiche Paarung und Zygosporenbildung sichergestellt worden war, wurden die Pigmente der verschiedenen Zellstadien dieser Grünalge untersucht. Vegetative Zellen und junge Gameten wiesen das für photosynthetisch aktive Grünalgen typische Pigmentspektrum auf. Die beobachteten Pigmentstöchiometrien entsprachen den Literaturangaben (Eichenberger et al. 1986). Die Pigmentgehalte der vegetativen Zellen variierten in den Quantitäten innerhalb verschiedener Messungen und innerhalb der Stämme (siehe Kapitel III.3.1). In einigen Fällen schienen die vegetativen Zellen deutlich kleiner. Dies sollte zu einem verkleinerten Chloroplasten und einem verringerten Photosyntheseapparat führen, der dann einen verringerten Pigmentgehalt zur Folge hat. Bei einer Verringerung des Durchmessers ändert sich das Zellvolumen überproportional zum Durchmesser. Es wurde ein bis um 75 % verringerter Pigmentgehalt in den vegetativen Zellproben gemessen. Wenn

man aufgrund dieser Pigmentreduktion auch eine Volumenreduktion der Zellen von 75 % annimmt, entspricht das einer Verringerung des Zelldurchmessers um rund 35%. Das bedeutet, dass ein Zelldurchmesser von 6,5 μm statt 10 μm (Durchschnittswert) anzunehmen ist. Es ist bekannt, dass bei *C. reinhardtii* größere Schwankungen der Zellgröße auftreten (Harris 2009). Somit können die Schwankungen im Pigmentgehalt durch bekannte Schwankungen in der Zellgröße erklärt werden.

Zygosporen wiesen dagegen sehr viele neue Pigmente auf, die, wie in Kapitel III.2 dargestellt, mittels verschiedener Methoden zweifelsfrei als Ketocarotinoide identifiziert wurden. Als eine Methode diente die Absorptionsspektroskopie, bei der die gemessenen Spektren mit Referenzspektren verglichen wurden (Referenzen in Britton 2004). Des Weiteren wurden Reduktionsversuche in Anlehnung an verschiedene Publikationen durchgeführt (Buschor et al. 1990, Stålberg et al. 2003), bei denen die Ketogruppen reduziert werden. Aufgrund der Verringerung des konjugierten Doppelbindungssystems infolge der Reduktion kann auf die Präsenz von Ketogruppen an der C4-Position im β -Iononring geschlossen werden. Durch die Anzahl der Zwischenprodukte wurde zusätzlich ein Hinweis auf die Anzahl der Ketogruppe erhalten. Die Untersuchung der neuen Pigmente mittels LC-MS lieferte weitere Informationen. Dabei entsprachen die Masse von Astaxanthin und Canthaxanthin der erwarteten Masse + 1. Diese Verfahren wurden auch für die Identifizierung der Ketocarotinoide Astaxanthin und Canthaxanthin in *H. pluvialis* verwendet (Ranga et al. 2009). Die Identität von Astaxanthin und Canthaxanthin in *C. reinhardtii* konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe dieser verschiedenen Verfahren, aber auch durch die Verwendung von synthetischen Referenzsubstanzen (BASF) zweifelsfrei geklärt werden.

Das weitere in *C. reinhardtii* detektierte Ketocarotinoid wird als 4-Ketolutein bezeichnet. Basis dafür lieferten die spektralen Eigenschaften (Britton 2004) sowie Reduktionsversuche. Diese hatten das Pigment aufgrund des Fehlens von Zwischenprodukten als Monoketocarotinoid identifiziert. Auch zeigte die Analyse der Absorptionseigenschaften dieses Moleküls ein Spektrum, das dem von Lutein entsprach. Dies deutete auf ein Molekül, das vergleichbar zu Lutein sowohl einen β -Iononring als auch einen ϵ -Iononring aufwies. Die Abwesenheit dieses Pigments in den Zygoten der *lor1*-Mutanten (ASX1-1b x ASX2-11d), die aufgrund eines Defektes in der Lycopin- ϵ -Zyklase defizient in α -Carotin und aller davon abgeleiteten Pigmenten sind, unterstützte diese Hypothese. 4-Ketolutein wurde bisher nur in wenigen Organismen detektiert und in allen bisherigen Veröffentlichungen zu *H. pluvialis* finden sich keine Hinweise darauf. In Grünalgen wurde es erstmals im Pigmentmuster von *Fritschella tuberosa* beschrieben (Weber 1975) und daher später als Fritschellaxanthin bezeichnet (Buchecker et al. 1978). Das Pigment wurde aber in *F. tuberosa* zunächst als α -Doradexanthin benannt, da man ein Pigment mit vergleichbarem Absorptionsspektrum nur

aus den Fischen kannte (Weber 1975). Fritschiellaxanthin hat die Konformation 3S, 3'R und Doradexanthin 3S, 3'S (Buchecker et al. 1978). Da die Konformation dieses Pigmentes aus *C. reinhardtii* bisher nicht hinreichend geklärt werden konnte, wurde es im Rahmen dieser Arbeit als 4-Ketolutein bezeichnet. Da als Syntheseweg aber die Ketolierung des Luteins vermutet wird, kann postuliert werden, dass es die Konformation 3S, 3'R hat und dem Fritschiellaxanthin entspricht.

Mit zunehmendem Reifegrad der Zygosporen wurden die Ketocarotinoide nicht mehr als freie Pigmente, sondern in einer mit Fettsäuren veresterten Form nachgewiesen. Dieses Phänomen war aus anderen sekundärkarotinoidakkumulierenden Algen bekannt, z.B. aus *H. pluvialis* (Lemoine und Schoefs 2010) und *Muriella zofingiensis* (Bar et al. 1995). Dabei können nur solche Pigmente verestert werden, die eine freie Hydroxygruppe an den Iononringen besitzen (weitere Details siehe Kapitel IV.3.2.3). Auffällige Mengen an Astaxanthinestern wurden im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. Auch das als 4-Ketolutein bezeichnete Ketocarotinoid wurde in der vorliegenden Arbeit in großer Menge als Fettsäure-Ester detektiert. Mit Hilfe von im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Vergleichsexperimenten an *H. pluvialis* sowie Literaturvergleichen, die detailliert die Pigment-acyl-ester von *H. pluvialis* identifiziert hatten (Breithaupt 2007, Miao et al. 2006), wurden die Esterfraktionen in zwei Bereiche eingeteilt: Pigmentmonoacyl- sowie Pigmentdiacyl-ester (siehe Kapitel III.2.7). Dabei stellte im Wesentlichen der Elutionspeak des β -Carotins die Grenze zwischen den beiden Fraktionen dar. Wie insbesondere die Experimente der *lor1*-Zygoten aufzeigten, wurden in der Monoacyl-esterfraktion Pigmentpeaks mit sowohl 4-Ketolutein- als auch mit Astaxanthinspektren nachgewiesen; in der Diacyl-esterfraktion fanden sich ausschließlich Peaks mit Astaxanthinspektren.

Die Ketocarotinoide 4-Ketolutein sowie Astaxanthin wurden in den Zygosporen von *C. reinhardtii* sowohl in der *all-trans*- als auch in *cis*-Konformationen detektiert. Die Existenz von *trans*- sowie *cis*-Astaxanthin wurde auch aus *H. pluvialis* berichtet (Johnson und An 1991). Johnson und An (1991) vermuteten, dass diese *cis*-Isomere keine Präparationsartefakte seien, sondern in-vivo vorkommen und ihnen eine essentielle Bedeutung im Metabolismus zukommt. Für β -Carotin wurde diesbezüglich gezeigt, dass dessen *cis*-Isomere 2-3 Mal effektiver in Micellen inkorporieren (Britton et al. 2009). Das *cis*-Isomer des Lycopins zeigt ebenfalls eine 75 % höhere Löslichkeit in Micellen.

Folglich könnten die *cis*-Isomere der Ketocarotinoide ebenfalls eine höhere Löslichkeit in den Lipidtröpfchen besitzen. Neben der Veresterung könnte dies eine effektive Einlagerung in die Lipide ermöglichen. Zusätzlich neigen Carotinoide in der *all-trans*-Konformation aufgrund ihrer planaren Struktur zur Kristallbildung (Zechmeister 1962). Aufgrund der abgewinkelten Struktur der *cis*-Isomere wird dies verhindert.

Das *cis*- zu *all-trans*-Verhältnis der Ketocarotinoide stieg im Laufe der Zygosporereifung (Kapitel III.3.2.1) von 0,4 auf 1,0 an, fiel aber nach 17 Tagen wieder leicht auf 0,8 ab. Folglich war ein relativ ausgeglichenes Verhältnis von *cis*- und *all-trans*-Ketocarotinoiden in den Zygosporen vorhanden, das bei jungen sowie sehr reifen Zygoten leicht auf die Seite der *all-trans*-Konformation verschoben war. Dies ist ein Unterschied zu *H. pluvialis*, bei dem für Astaxanthin ein *cis*- zu *trans*-Verhältnis von etwa 0,2 festgestellt wurde (Yuan et al. 1997). Allerdings liegt das *cis*- zu *all-trans*-Verhältnis des Astaxanthins bei den Zygosporen von *C. reinhardtii* mit etwa 0,1 noch unter dem Verhältnis von *H. pluvialis*. Dieses Verhältnis liegt für Canthaxanthin bei etwa 0,2, während das *cis*- zu *all-trans*-Verhältnis des 4-Ketoluteins bei rund 4,2 liegt. Aufgrund des hohen 4-Ketoluteinanteils liegt das Gesamtverhältnis von *cis*- zu *all-trans*-Ketocarotinoiden dann bei etwa 1 in den reifen Zygosporen.

2. Die Pigmentzusammensetzung in den Zygosporen von *C. reinhardtii* wird wahrscheinlich nicht durch die Substratspezifität der BKT, sondern durch die Substratbereitstellung bestimmt

2.1. Die Synthese von Ketocarotinoiden mittels BKT

Mit dem Nachweis der Ketocarotinoide in den Zygosporen von *C. reinhardtii* war auch die Frage nach der Bedeutung des Gens der BKT in diesem Organismus nicht mehr streitig. Da dieses Gen das einzige homologe Gen zur BKT aus *H. pluvialis* im Genom von *C. reinhardtii* darstellte, wurde postuliert, dass es für das ketolierende Enzym in *C. reinhardtii* codierte. Heterologe Expressionsstudien innerhalb der Arbeitsgruppe Lohr während dieser Forschungsarbeit zeigten zweifelsfrei, dass die BKT aus *C. reinhardtii* Ketogruppen an β -Iononringen verschiedener Carotinoide einführt (Bauch 2007, Köhler 2008). Dabei blieb aber der genaue Syntheseweg in den Zygosporen unklar. Die Synthese von Astaxanthin und Canthaxanthin durch BKTs anderer Organismen war in der Literatur beschrieben worden (Fraser et al. 1998, Huang et al. 2006a), die Bildung von 4-Ketolutein dagegen nicht. Da dieses Pigment aber das häufigste Ketocarotinoid in *C. reinhardtii* darstellte, war die Synthese der Ketocarotinoide und die Substratspezifität der BKT aus *C. reinhardtii* von besonderem Interesse.

Für das Enzym aus *H. pluvialis* wurde aufgrund heterologer Expressionsstudien postuliert, dass zunächst eine Ketolierung und erst später eine Hydroxylierung des β -Carotin erfolgt (Breitenbach et al. 1996). Diese Theorie wurde gestützt von biochemischen Untersuchungen, die kinetische Parameter als Ursache für den präferierten Reaktionsweg von β -Carotin über Canthaxanthin zum Astaxanthin benennen (Fraser et al. 1998). In diesem Zusammenhang wurde die Substratspezifität von bakteriellen ketolierenden Enzymen als zehnmal spezifischer für nicht-hydroxylierte als für hydroxylierte Substrate beschrieben (Fraser et al. 1998).

Für die BKT aus einigen Grünalgen wurde mittels heterologen Expressionsstudien dagegen eine geringere Substratspezifität nachgewiesen. So kann die BKT aus *M. zoofingiensis* nicht nur β -Carotin, sondern auch dessen hydroxylierte Form Zeaxanthin ketolieren (Huang et al. 2006a).

So wurden die BKTs der verschiedenen Organismen aufgrund ihrer hohen oder niedrigen Substratspezifität in die Gruppen von crtO und crtW eingeordnet (Choi et al. 2007). Diese Untersuchungen stehen aber im Widerstand zu Veröffentlichungen, die crtO als Enzym charakterisieren, das nur einen Iononring im β -Carotin ketolieren kann, während die Gruppe der crtW Enzyme zur Ketolierung an beiden Ionon-Ringen fähig ist (Fernandez-Gonzalez et al. 1997).

In Anlehnung an Fernandez-Gonzalez und Mitarbeiter (1997) sollten daher sowohl die BKT aus *M. zoofingiensis* und *H. pluvialis* wie auch aus *C. reinhardtii* als crtW bezeichnet werden,

da bei all diesen Organismen beide β -Iononringe ketoliert werden können. Innerhalb dieser BKTs kann möglicherweise aber die Substratspezifität unterschieden werden. So ähneln sich BKT aus *M. zofingiensis* und *C. reinhardtii*, da beide Enzyme hydroxylierte wie nicht-hydroxylierte Substrate umsetzen (Huang et al. 2006a, Bauch 2007). Für die BKT aus *H. pluvialis* gibt es widersprüchliche Angaben in der Literatur. Während Lotan und Hirschberg (1995) eine hohe Substratspezifität vermuten, da in ihren Experimenten die BKT kein Zeaxanthin umsetzen konnte, belegten Kajiwara und Mitarbeiter (1995) das Gegenteil. Für *H. pluvialis* konnte das Cytosol als Lokalisationsort der Ketocarotinoidsynthese identifiziert werden (Grünewald et al. 2001). Dorthin wird das im Chloroplasten synthetisierte β -Carotin exportiert (Grünewald und Hagen 2001). Die Ketolierung und ggf. Hydroxylierung erfolgt wahrscheinlich direkt an der Oberfläche der Lipidtröpfchen, worin die Ketocarotinoide akkumulieren. Dort könnte das verantwortliche Enzym BKT an die Phospholipidschicht angelagert sein. Die ultrastrukturellen Daten der Zygosporen von *C. reinhardtii* zeigten große Ähnlichkeiten zu den Aplanosporen von *H. pluvialis*. Die Lipidtröpfchen in *C. reinhardtii* sind orange-rot gefärbt (Cavalier-Smith 1976), ihre Lokalisation im Cytosol ist wahrscheinlich (siehe Kapitel IV.3). Daher kann für *C. reinhardtii*, ähnlich zu *H. pluvialis*, vermutet werden, dass die Ketocarotinoide in den Lipidtröpfchen lokalisiert sind (Details siehe ebenfalls Kapitel IV.3), so dass auch die Ketocarotinoide im Cytosol vorliegen. Die Carotinoidbiosynthese findet in *C. reinhardtii* ausschließlich im Plastiden statt (Lohr 2009). Folglich sollte der Export der Substratcarotinoide aus dem Chloroplasten einen entscheidenden Einflussfaktor für die Ketocarotinoidsynthese darstellen.

Für die Bildung des Ketocarotinoides Astaxanthin in *C. reinhardtii* sind daher zwei Szenarien denkbar. Zum einen kann der gleiche Syntheseweg wie in *H. pluvialis* postuliert werden, bei dem β -Carotin aus dem Plastiden exportiert, zum Canthaxanthin ketoliert und später zum Astaxanthin hydroxyliert wird (Fraser et al. 1998, Grünewald und Hagen 2001). Hinweise dafür lieferten die Untersuchungen zur zeitlichen Entwicklung der Ketocarotinoide in 22 °C-Zygosporen, bei denen zunächst Canthaxanthin und erst später Astaxanthin nachgewiesen wurde (Kapitel III.3.2). Zusätzlich nahm Astaxanthin im Laufe der Zygosporenbildung zu, während der Canthaxanthingehalt nach 14 Tagen Reifung wieder leicht abnahm.

Alternativ kann aufgrund der im Kapitel III.3.2 dargestellten Verschiebung der Pigmentverhältnisse aus möglichem Substrat und ketolierem Produkt vermutet werden, dass noch im Plastiden Violaxanthin zum Zeaxanthin deepoxidiert wird, das dann aus dem Chloroplasten exportiert und im Cytosol zu Astaxanthin ketoliert wird. Zusätzlich entspricht die gebildete Menge Canthaxanthin der Abnahme der β -Carotin-Menge, so dass auch hier denkbar ist, dass das β -Carotin aus dem Chloroplasten exportiert, ketoliert, aber nicht weiter hydroxyliert wird. Dieses Szenario bedingt keine cytosolische Hydroxylase, deren Existenz dagegen in *H. pluvialis* beschrieben wurde.

Bisher wurde noch nicht nachgewiesen, dass die BKT explizit auch α -Carotinoide ketolieren kann. Dies liegt zum einen daran, dass bisher nur selten 4-Ketolutein nachgewiesen wurde. Zum anderen stehen bisher für heterologe Expressionsexperimente nur wenige α -Carotin synthetisierende *Escherichia coli*-Stämme zur Verfügung (Cunningham und Gantt 2007). Hinweise deuten auf ein Heterodimer in einem Multienzymkomplex (Cunningham und Gantt 1998). Bestätigende Versuchsergebnisse liegen aber noch nicht vor.

In den Zygosporen von *C. reinhardtii* wurden allerdings große Mengen an 4-Ketolutein gefunden, das ein α -Carotin-Derivat darstellt und vermutlich durch die Ketolierung von Lutein gebildet wird, wenn dies im Zuge der Chloroplastenreduktion aus den Antennenkomplexen freigesetzt wird. Zunächst konnten keine experimentellen Belege gefunden werden, dass die BKT aus *C. reinhardtii* auch α -Carotinoide ketoliert. Aufgrund der Tatsache, dass nur ein BKT-Homolog im Genom von *C. reinhardtii* gefunden werden konnte (Lohr et al. 2005), wurde dies aber vermutet. In den letzten Monaten konnte innerhalb der Arbeitsgruppe Lohr mittels heterologer Expressionsstudien gezeigt werden, dass die BKT auch α -Carotinoide ketolieren kann. Allerdings wird die Ketogruppe ausschließlich am β -Iononring eingeführt. ϵ -Iononringe können von der BKT folglich nicht ketoliert werden (Daten bisher nicht veröffentlicht).

2.2. Die Regulation der BKT vermittelten Ketocarotinoidakkumulation

Für die BKT aus *C. reinhardtii* lassen sich sowohl posttranslationale als auch expressionsabhängige Regulationsmechanismen vermuten.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass die BKT in *C. reinhardtii* bereits in den vegetativen Zellen basal transkribiert wird. Trotzdem sind vegetative Zellen und Gameten nicht zur Ketocarotinoidbildung fähig. Die Limitierung der Ketocarotinoidsynthese auf die Zygosporen lässt sich mit einem posttranskriptionellen Regulationsmechanismus erklären. So könnte eine Aktivierung des Enzyms denkbar sein oder auch eine posttranslationale Modifikation, die erst ein funktionsfähiges Enzym hervorrufen könnte. Wie die Regulierung erfolgt, ist bisher unklar. Auffällig aber ist, dass jegliche Versuche zur Etablierung eines In-vitro-Assays scheiterten (eigene Untersuchungen sowie Betreuung der Experimente aus Schmidt (2007) und Köhler (2008), Übersicht siehe Anhang 3). Es konnte keine Aktivität des Enzyms erreicht werden.

Außerdem könnte der lange C-Terminus eine Rolle bei der Aktivität des Enzyms spielen. Dieser C-Terminus war bei keiner anderen BKT nachgewiesen worden (Lohr et al. 2005). Möglicherweise interagiert dieser Proteinteil mit einem anderen Protein oder kann durch Cofaktoren zu einer räumlichen Änderung bewegt werden, die die Enzymaktivität beeinflusst. Für *H. pluvialis* waren als essentiellen Cofaktoren Eisen(II)-Ionen, 2-Oxoglutarat und

Ascorbinsäure bestimmt worden (Fraser et al. 1997 sowie 1998). Außerdem zeigten Fraser und Mitarbeiter (1997 und 1998), dass das Enzym essentiell nur mit Sauerstoff aktiv war. All diese Substanzen waren den In-vitro-Versuchen der BKT von *C. reinhardtii* zugesetzt worden, ohne dass eine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Daher lässt sich vermuten, dass die BKT aus *C. reinhardtii* weitere Cofaktoren benötigt oder dass der C-Terminus durch mögliche Interaktionen die Aktivität des Enzyms bestimmen könnte.

Bei *H. pluvialis* sind die aktiven BKTs sehr wahrscheinlich an der Oberfläche der cytosolischen Lipidtröpfchen lokalisiert, wie dies Immunogold-labeling Experimente und Aktivitätsmessungen verschiedener Zellfraktionen bezüglich der BKT zeigten (Grünewald et al. 2001). Eine ähnliche Lokalisation ist auch für die BKT von *C. reinhardtii* denkbar. In der direkten Umgebung der Lipidtröpfchen konnten bei *H. pluvialis* (Santos und Mesquita 1984) und auch in den eigenen TEM-Aufnahmen von *C. reinhardtii*-Zygosporen zahlreiche ERs und Golgi-Apparate beobachtet werden. Die ERs könnten die benötigten Cofaktoren für die Ketocarotinoïdsynthese bereitstellen. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass die BKT nicht an der Oberfläche der Lipidtröpfchen, sondern in den ERs lokalisiert ist.

Des Weiteren ist als regulatorischer Faktor bei der Ketocarotinoïdbildung in *C. reinhardtii* eine Erhöhung der Transkriptionsrate im zellulären Dauerstadium denkbar, wie dies auch für *H. pluvialis* nachgewiesen wurde. Huang und Mitarbeiter (2006b) zeigten für *H. pluvialis*, dass die Syntheserate des Astaxanthins maßgeblich von der Transkriptionsrate der BKT abhängt. Dabei reicht eine basale Expression der BKT, wie sie in grünen Zellen mit Flagellen vorliegt, nicht für eine Ketocarotinoïdsynthese aus. In den ketocarotinoïdakkumulierenden Aplanosporen findet dagegen eine deutliche Erhöhung der Transkriptionsrate statt. Ab einem Transkriptlevel von $1,6 \times 10^{-6}$ fmol/ng total RNA konnte eine Astaxanthinsynthese beobachtet werden, darunter dagegen nicht. Diese Transkriptmenge konnte in vegetative Zellen nicht nachgewiesen werden, sie schien im Bereich von 1×10^{-8} fmol/ng total RNA zu liegen (Huang et al. 2006b). Als Indiz für diese Erhöhung der Transkriptionsrate während der Zygosporenenreife bei *C. reinhardtii* kann der bedingt semiquantitative Vergleich mittels RT-PCR der BKT aus vegetativen Zellen und Zygosporen gewertet werden. Obwohl weniger RNA in die Erststrangsynthese bei den Zygosporen eingesetzt wurde (nur etwa 60 Prozent an Gesamt-RNA), konnte, wie in Kapitel III.9.2 dargestellt, eine deutlich intensiver gefärbte Bande der BKT im RT-PCR-Agarosegel nachgewiesen werden. Folglich war mehr Template und somit mehr Transkripte der BKT in der extrahierten RNA vorhanden. Vergleichsgene wie die CAO zeigten eine fast vollständige Reduktion des Transkriptlevels im Vergleich zu den vegetativen Zellen. Realtime PCR-Analysen von cDNA aus verschieden lang gereiften Zygosporen könnten hierfür weitere Erkenntnisse liefern und den Anstieg des mRNA-Transkriptlevels darstellen.

Es ist bekannt, dass bei *C. reinhardtii* zygotenspezifische Gene auch schon in anderen Zellstadien transkribiert werden (Kubo et al. 2008). In Experimenten wurden mittels microarray-Analysen Gene untersucht, deren Transkriptanzahl in den jungen Zygoten stark erhöht war. Dabei fanden Kubo und Mitarbeiter (2008) einige Transkripte, die auch in Gameten vorhanden waren. Eigene Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten zusätzlich, dass die Sequenzen verschiedener im frühen Zygotenstadium exprimierter Gene (early zygote expressed, EZY) auch in EST-Datenbanken von vegetativen Zellen präsent sind (z.B. EZY 10, EZY 15, EZY 11, Anhang 3).

Folglich könnte sowohl eine zellstadiumabhängige Expression der BKT als auch eine Aktivierung der BKT in den Zygosporen die Beschränkung der Ketocarotinoidbildung auf die Zygosporen erklären. Des Weiteren ist es denkbar, dass nur in den Zygosporen das cytosolisch lokalisierte Enzym BKT und die im Plastiden synthetisierten Carotinoide aufeinander treffen können, wenn im Zuge der Chloroplastenreduktion die Carotinoide ins Cytosol freigesetzt werden.

Für die Regulation der BKT aus *H. pluvialis* werden weitere Faktoren diskutiert:

So ist die Existenz von mehreren Isoformen des Enzyms entscheidend. Es wurde nachgewiesen, dass es in *H. pluvialis* von der BKT drei Isoformen gibt (Huang et al. 2006b). Diese können von unterschiedlichen Umweltfaktoren reguliert werden. So wird z.B. die BKT 1 (vormals crtO: Lotan und Hirschberg 1995) deutlich stärker durch Starklicht induziert als die Enzyme BKT 2 und 3. Letztere beiden zeigten aber eine bedingt höhere Basalexpression. Huang und Mitarbeiter (2006b) vermuteten, dass die Regulation durch verschiedene Umweltfaktoren und zusätzlich die starke Erhöhung des Expressionslevels der Enzyme die Grundlage für die hohe Astaxanthinsyntheserate darstellt. Da für *C. reinhardtii* nur ein einziges Gen nachgewiesen wurde, das für die BKT codiert, kann dieser Regulationsfaktor von *H. pluvialis* keine Rolle bei *C. reinhardtii* spielen.

Des Weiteren spekulierten Lemoine und Schoefs (2010) aufgrund von Inhibitorversuchen, dass die Akkumulation von Echinenon und Canthaxanthin mittels negativer feed-back Hemmung die Aktivität der BKT beeinflussen kann. So wurde gezeigt, dass während der Astaxanthinproduktion die Hydroxylase auf Transkriptionsebene am stärksten hoch reguliert wird (Li et al. 2010a). Zusammen mit den Beobachtungen von Lemoine und Schoefs (2010) kann die erhöhte Astaxanthinakkumulation eine Folge der hohen Hydroxylaseaktivität und folglich einer verzögerten Akkumulation von Canthaxanthin sein. Dies würde zu einer späteren feed-back Hemmung der BKT führen und folglich zu einer höheren Astaxanthinakkumulation. Weitergehende Belege für diese Vermutung gibt es bisher nicht.

2.3. PS-Carotinoide könnten bei *C. reinhardtii* als Substrate der Ketocarotinoid-synthese dienen

In den vorliegenden Untersuchungen zum Ketocarotinoidgehalt in den Zygosporen von *C. reinhardtii* wird deutlich, dass der Gesamtcarotinoidgehalt im Laufe der Zygotenreife, gegenüber den vegetativen Zellen um etwas mehr als die Hälfte abnimmt. Dabei reduziert sich der PS-Carotinoidgehalt um ca. 90 %. Trotz des starken Abbaus von Carotinoiden findet gleichzeitig eine Neusynthese von einer speziellen Carotinoidgruppe, den Ketocarotinoiden statt, die dann einen Anteil von ca. 1 fmol pro Zelle bzw. etwa 0,6 pg pro Zelle besitzen. Die Ketocarotinoide stellen in den reifen Zygosporen etwa 75 % des Gesamtcarotinoidgehaltes. Der Anteil der verbliebenen PS-Carotinoide beträgt damit rund 25 %. Die Synthese von Carotinoiden ist energieaufwendig (Schopfer und Brennicke 2006). Es ist somit unökonomisch, größere Mengen von Carotinoiden abzubauen und gleichzeitig andere komplett neu zu synthetisieren. Wie in Kapitel III.3.2 dargestellt, ist für den Gesamtgehalt an Carotinoiden in den Zygosporen keine Neusynthese von Ketocarotinoidvorstufen nötig. Eine Regulation der Ketocarotinoidsynthese über die Steigerung der PDS-Expression, wie es für *H. pluvialis* gezeigt wurde (Grünewald et al. 2000), ist somit unwahrscheinlich. Diese Vermutung könnte mit Hilfe vergleichender Expressionsstudien von BKT, PDS und anderen Carotinoidsynthesegenen bestätigt werden. Das führt zu der Hypothese, dass bei *C. reinhardtii* die Ketocarotinoide nicht komplett neu synthetisiert werden, sondern die vorhandenen PS-Carotinoide als Substrate dienen. Aufgrund der sehr schnellen Reduktion des Chloroplasten könnten diese PS-Carotinoide freigesetzt werden. Diese Hypothese wird durch die TEM-Aufnahmen der unterschiedlich lang gereiften Zygosporen gestützt (Kapitel III.3.2.1). Die Untersuchungen zeigten, dass der Abbau der Thylakoide noch vor der Synthese der Ketocarotinoide stattfand, so dass PS-Carotinoide freigesetzt werden, bevor die Ketocarotinoidbildung startet.

Dagegen nimmt der Gesamtcarotinoidgehalt in den Aplanosporen von *H. pluvialis* im Vergleich zu den vegetativen Zellen stark zu (Boussiba et al. 1999). In Dauerstadien kann ein Ketocarotinoidgehalt von 30-100 pg pro Zelle beobachtet werden, der etwa 4 % des Trockengewichtes entspricht (Margalith 1999). Die Erhöhung des Gesamtcarotinoidgehaltes zeigt, dass bei *H. pluvialis* die Carotinoidsynthese während der Ketocarotinoidsynthese stark gesteigert werden muss. Dies erfolgt überwiegend über eine Steigerung der PDS-Expression (Grünewald et al. 2000, Jin et al. 2006). Dieses Enzym wird als Flaschenhals in der Carotinoidbiosynthese angesehen, da das Substrat für diese Synthese auch als Vorstufe für einige andere Biosynthesewege dienen kann (Welsch et al. 2010). Die Ketocarotinoidsynthese in *H. pluvialis* ist somit ein Zusammenspiel aus einer erhöhten Synthese des ketolierenden Enzyms BKT und auch einer Erhöhung der Carotinoidbiosynthese, die eine größere Menge an Substrat bereitstellt.

Die Hypothese, die besagt, dass die beiden Algen unterschiedliche Mechanismen für die Bildung von Ketocarotinoiden nutzen, kann auch die unterschiedliche Ketocarotinoidzusammensetzung der beiden Algen begründen. Während *H. pluvialis* aufgrund der Neusynthese überwiegend β -Carotin als Substrat zur Verfügung steht, werden in *C. reinhardtii* sowohl Lutein, β -Carotin und möglicherweise auch Zeaxanthin aus dem Chloroplasten freigesetzt. Der natürliche Luteingehalt in vegetativen Zellen ist höher als der des β -Carotins. Des Weiteren ist das Lutein in den äußeren Antennen der Photosynthese lokalisiert, währenddessen β -Carotin überwiegend in den Corekomplexen zu finden ist (Pineau et al. 2001, Green und Durnford 1996). Wahrscheinlich werden infolge der Chloroplastenreduktion zunächst die Antennen verkleinert und abgebaut, wie durch den Anstieg des Chl *a/b*-Verhältnis deutlich wird (dargestellt in Kapitel III.3.2). Das in den äußeren Antennen enthaltene Lutein wird wahrscheinlich schneller und in größeren Mengen freigesetzt als β -Carotin. Auch wurde festgestellt, dass in den PSII-Antennen einige Luteinmoleküle lockerer gebunden sind als andere Pigmente und unter Stressbedingungen schneller freigesetzt werden (Pineau et al. 2001). Somit kann überwiegend Lutein als Vorstufe der Ketocarotinoide dienen, was die in *C. reinhardtii* beobachtete starke Synthese von 4-Ketolutein erklären könnte.

H. pluvialis ist bekannt für die Akkumulation von Astaxanthin. In vielen frühen Veröffentlichungen wird die Astaxanthinakkumulation sogar mit der gesamten Sekundärcarotinoidakkumulation gleichgesetzt. Canthaxanthin als nicht-hydroxylierte Vorstufe wird seltener beschrieben. Auch ein Nachweis von 4-Ketolutein findet sich in keiner Publikation zu *H. pluvialis*. Grewe (2009) untersuchte die Ketocarotinoidzusammensetzung von *H. pluvialis* sehr detailliert. Auch sie fand kein 4-Ketolutein. Boussiba und Mitarbeiter beschrieben, dass der absolute Luteingehalt in den Aplanosporen im Vergleich zu den vegetativen Zellen abnimmt (Boussiba et al. 1999). Dies bedeutet, dass während des Sekundärcarotinoidsynthese die Bildung von α -Carotinoiden unterbunden ist. Allerdings sind α -Carotinoide im Chloroplasten vorhanden, der im Zuge der Aplanosporenreife reduziert wird. Folglich müssen diese Pigmente abgebaut oder freigesetzt werden. Falls kein 4-Ketolutein in den Zellen nachzuweisen wäre, ließe dies den Schluss zu, dass Lutein abgebaut wird und dabei nicht in die Synthese von Ketocarotinoiden eingeht. Neuere Untersuchungen an *H. pluvialis* innerhalb der Arbeitsgruppe Lohr durch M. Bauch (unpubliziert) zeigten allerdings, dass auch *H. pluvialis* kleine Mengen an 4-Ketolutein besitzt. Diese werden aber durch die großen Mengen an Astaxanthinester maskiert und sind nur schwer nachweisbar. Möglicherweise gelangen geringe Mengen an Lutein während der Chloroplastenreduktion ins Cytosol. Die Luteinmoleküle könnten von der HpBKT am β -Iononring ketoliert werden, so dass 4-Ketolutein entsteht.

2.3.1. Inhibitorexperimente deuten auf eine Ketocarotinoidsynthese, die unabhängig von der Bildung neuer Carotinoide ist

Die Experimente mit dem Inhibitor Norflurazon (Kapitel III.4) lieferten einen weiteren Beleg dafür, dass keine Neusynthese von Carotinoiden für die Ketocarotinoidbildung nötig ist, sondern dass PS-Carotinoide als Vorstufe für Ketocarotinoide dienen können. Norflurazon verhindert die Neusynthese von Carotinoiden, indem der Inhibitor das Enzym Phytoendesaturase hemmt und somit die Bildung von Lycopin verhindert (Sandmann et al. 1989). Zygoten von *C. reinhardtii*, die mit diesem Inhibitor inkubiert wurden, akkumulierten weiterhin große Mengen an Ketocarotinoiden. Damit wurde gezeigt, dass die in der Zelle vorhandenen Carotinoide zumindest teilweise als Ketocarotinoidvorstufen dienen können und daher keine Neusynthese der Substrate nötig ist.

Alle mit Norflurazon behandelten Proben unterschieden sich merklich in der Pigmentkonzentration zum WT, nicht aber zum Ethanol-Kontrollansatz. Bei diesem waren die Zygosporen mit Ethanol, dem Lösungsmittel für Norflurazon, behandelt worden. Die Konzentration betrug 50 µl Ethanol (absolut) pro 25 ml-Agarplatte, so dass eine Konzentration von 35 mmol Ethanol pro Liter Medium in den Plattenkulturen enthalten war. Über die Ethanoltoleranz von *C. reinhardtii* ist wenig bekannt. Allerdings produziert *C. reinhardtii* unter anaeroben Bedingungen Ethanol bei der Stärkefermentation (Gfeller und Gibbs 1984). Dabei entstehen ca. ein Mol Ethanol pro Mol Glucose. Das Ethanol wird allerdings in den Chloroplasten gebildet und kommt nicht mit der Zellwand in Berührung. Es ist denkbar, dass das extern zugefügte Ethanol Probleme bei der sekundären Zellwandbildung hervorrief und es so zu einer verzögerten Zygosporenreifung kam. Allerdings gibt es Untersuchungen an der Alge *Polytomella spp.*, die der Familie der *Chlamydomonaceae* zugeordnet wird und Ethanol als externe Kohlenstoffquelle verwenden kann (Atteia et al. 2000). Sie wächst auf Ethanolkonzentrationen von bis zu 40 mmol Ethanol pro Liter Nährmedium. In wie weit das Ethanol in *C. reinhardtii* eine Auswirkung auf die Zygosporenreifung ausübt, müsste durch weitere Versuche geklärt werden. Dabei wäre es hilfreich TEM-Aufnahmen dieser Zygoten zu erstellen, um den Aufbau der sekundären Zellwand zu untersuchen. Möglicherweise denaturiert das Ethanol die zahlreichen Proteine in der Zellwand und führt so zu einer Schädigung.

Beim Vergleich der Pigmentgehalte von Zygoten mit Norflurazonzusatz, der Ethanolkontrolle und der Kontrolle ohne Zusatz wird deutlich, dass es zwischen der Ethanolkontrolle und den Ansätzen mit Inhibitorzusatz keine auffälligen Unterschiede gab. Folglich wurden keine wesentlichen Auswirkungen des Inhibitors auf die Pigmentzusammensetzung festgestellt. Allerdings muss beachtet werden, dass all diese Proben eine etwas veränderte Pigmentzusammensetzung im Vergleich zur Kontrollprobe ohne Zusatz besaßen.

Es zeigte sich, dass nach drei Wochen Zygotenreifung bei dem Kontrollansatz deutlich mehr Ketocarotinoide als PS-Carotinoide vorhanden waren. Bei der Ethanolkontrolle sowie allen Inhibitoransätzen waren etwa gleich viele Ketocarotinoide wie PS-Carotinoide präsent. Dabei zeigten sich keine Unterschiede innerhalb der Ansätze mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Nach fünf Wochen Zygotenreifung dominierten auch in allen Ansätzen mit Inhibitorzugabe die Ketocarotinoide die Carotinoidfraktion.

Zusätzlich wurde deutlich, dass eine starke Abnahme der Chlorophyllmengen in allen Ansätzen stattfand. Nach drei Wochen Reifung waren mehr Carotinoide als Chlorophylle vorhanden. Dies spricht für einen Abbau der Thylakoide und wird als Zeichen für eine erfolgreiche Zygosporenreifung - trotz Hemmung der Carotinoidbiosynthese - angesehen.

Die dabei detektierten Phytoenkonzentrationen waren gering. Bei einer Hemmung der Phytoendesaturase während einer aktiven Carotinoidbiosynthese wäre eine deutlich höhere Phytoenakkumulation erwartet worden. So fanden sich z.B. bei der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* als Zeichen einer erfolgreichen Hemmung des Enzyms nach nur wenigen Stunden Inkubation mit einer 20fach geringeren Norflurazonkonzentration bereits vergleichbare Mengen an Phytoen, bezogen auf die Chlorophyllkonzentration in der Zelle (Lohr 2000).

Die im Kapitel III.4 dargestellte geringe Akkumulation von Phytoen während der Zygotenreifung bei *C. reinhardtii* steht in Einklang mit der Hypothese, dass keine Neusynthese von Carotinoiden für die Bildung der Ketocarotinoide benötigt wird, da die freierwerdenden PS-Carotinoide als Vorstufen dienen.

Somit kann das vorliegende Versuchsergebnis als weitere Unterstützung der Hypothese angesehen werden, dass in *C. reinhardtii* die Ketocarotinoide aus freigesetzten PS-Carotinoiden gebildet werden. Die Wirkung des Inhibitors wurde durch den Nachweis von Phytoen, das in den Kontrollzellen ohne Inhibitor nicht zu detektieren war, eindeutig belegt.

Die Ketocarotinoidsynthese in den Aplanosporen von *H. pluvialis* wird, im Gegensatz zu *C. reinhardtii*, durch Norflurazon signifikant reduziert (Zhekisheva et al. 2005). Bereits bei einer Konzentration von 0,05 μM Norflurazon im Nährmedium wurden bei *H. pluvialis* keine Ketocarotinoide mehr nachgewiesen, bei *C. reinhardtii* zeigten die Zellen bei einer 500fach höheren Konzentration (25 μM) noch eine deutliche Ketocarotinoidakkumulation. So gibt dieses Experiment einen Hinweis, dass die Art der Ketocarotinoidsynthese in *C. reinhardtii* und *H. pluvialis* anders erfolgt. Dieses Ergebnis steht in Zusammenhang mit Literaturangaben, die zeigen, dass der Carotinoidgehalt in den Aplanosporen deutlich ansteigt und folglich für die Ketocarotinoidakkumulation die Neusynthese von Substraten obligat ist (Boussiba et al. 1999).

Allerdings kann aufgrund der mikroskopischen Beobachtungen an *H. pluvialis* (Santos und Mesquita 1984, sowie Hagen et al. 2002) auch nicht ausgeschlossen werden, dass

H. pluvialis länger für Norflurazon durchlässig ist als dies für *C. reinhardtii* zutrifft. Santos und Mesquita (1984) beobachtete nach vier Tagen Aplanosporenbildung eine Änderung der Ultrastruktur der grünen flagellierten *H. pluvialis*-Zellen zu bräunlichen Zellen mit reduziertem Chloroplasten und beginnender Sekundärcarotinoidsynthese. Diese Zellen besaßen eine nur wenig verdickte Zellwand. Die dicke Sekundärwand trat erst nach mehreren Wochen Alterung der Zellen auf (Hagen et al. 2002). Bei Zygosporen von *C. reinhardtii* ist dagegen denkbar, dass größere Konzentrationen an Norflurazon wahrscheinlich nicht über einen langen Zeitraum hinweg in die Zellen eindringen konnten, sondern nur innerhalb weniger Tage nach Paarung. Mithilfe der TEM-Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei Wildtyp-Zygoten spätestens nach einer 24 stündiger Lichtinkubation und anschließender 48 stündiger Dunkelinkubation die Sekundärwand vollständig ausgeprägt ist. Danach ist es unwahrscheinlich, dass Chemikalien wie z.B. Norflurazon noch in größeren Mengen in die Zellen diffundieren können. Allerdings zeigten die mit Ethanol behandelten Zygoten, dass eine verzögerte Reifung dieser Zygoten stattfindet, möglicherweise verlangsamt das Ethanol die Sekundärwandbildung. Folglich sollte das ethanollösliche Norflurazon in diese Zygoten einige Tage eindringen können. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass das Norflurazon über Wochen in die Zygosporen diffundieren kann, da nach drei Wochen Lagerung alle Zygoten dieses Experimentes eine Resistenz gegenüber dem Lösungsmittel Methanol besaßen. Dies wird als Zeichen einer intakten Sekundärwand gewertet. Somit ist eine längere Aufnahmeperiode des Norflurazons bei *H. pluvialis* im Vergleich zu *C. reinhardtii* nicht auszuschließen.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang aber die Erkenntnis, dass die Menge des detektierten Phytoens über die ganze Versuchsdauer bei *C. reinhardtii* relativ konstant war. Sollte die Wirkung des Inhibitors bei *C. reinhardtii* während der Versuchsdauer abnehmen und sollte folglich eine große Neusynthese an Carotinoiden stattfinden, so hätte sich dieses Phytoen mit der Zeit abbauen müssen, da es zu Lycopin dehydriert wäre. Das war aber nicht der Fall und diente somit als weiterer Hinweis, dass die Neusynthese von Carotinoiden für die Ketocarotinoidakkumulation in *C. reinhardtii* nicht notwendig ist.

Der nur geringe Einfluss des Norflurazons wird noch deutlicher, wenn man beachtet, dass in *C. reinhardtii* mindestens eine 100fach höhere Konzentration des Inhibitors als bei Experimenten mit *H. pluvialis* (Zhekisheva et al. 2005) verwendet wurde. Da die mit Norflurazon behandelten Zygosporen trotz allem vergleichsweise hohe Mengen an Ketocarotinoiden aufwiesen und makroskopisch keine Degradation der Zellen zu vermuten war, sollten die Zygosporen von *C. reinhardtii* nicht auf eine völlige Neusynthese der Carotinoidvorstufen angewiesen sein. Dies ist ein deutlicher Unterschied zu *H. pluvialis*, der eine Neusynthese von Carotinoiden für die Ketocarotinoidbildung benötigt.

2.3.2. Mögliche Versuchsansätze zur Festigung diese Hypothese

Die im Rahmen dieser Forschungsarbeit durchgeführten Versuche konnten schon wichtige Hinweise auf die Art und Weise der Ketocarotinoidsynthese in den Zygosporen von *C. reinhardtii* liefern. Trotz allem ist es wünschenswert, dass zusätzliche Versuche die Hypothese, dass die PS-Carotinoide als Substrate für die Ketocarotinoidsynthese dienen, weiter festigen. Zwei grundlegende Versuchsaufbauten könnten wertvolle Hinweise liefern: Zum einen wären Versuche mit radioaktiv markiertem Acetat sehr interessant. Denkbar ist ein Versuchsaufbau, bei dem vegetative Zellen in TAP-Medium angezogen werden, das Acetat mit ^{14}C -Kohlenstoff enthält. Die Paarung und die Reifung sollten im Anschluss auf nicht-radioaktiv markiertem Material erfolgen. Werden die Ketocarotinoide aus den vorhandenen PS-Carotinoiden synthetisiert, so sollten sie weiterhin ^{14}C enthalten. Werden sie komplett neu synthetisiert, dann sollten sie ^{14}C frei sein. Ähnliche Versuche wurden mit *H. pluvialis* durchgeführt (Donkin 1976).

Weitere Hinweise für die Hypothese, dass die PS-Carotinoide auch bei *C. reinhardtii* als Substrate für die Ketocarotinoide dienen, könnten Zygosporenversuche mit weiteren Mutanten darstellen. Die sog. *npq2*-Mutanten (z.B. der im Labor vorhandenen Stamm cc3683) akkumulieren aufgrund eines Defektes in der Zeaxanthinepoxidase große Mengen an Zeaxanthin und zeichnen sich folglich durch einen Mangel an Violaxanthin aus (Baroli et al. 2003). Durch den Einsatz eines solchen *npq2*-Stammes in der Paarung sollte eine andere Pigmentzusammensetzung als Basis für die Ketocarotinoidsynthese resultieren. Hintergrund für diese Hypothese ist, dass bei *C. reinhardtii* während der Paarung die beiden Chloroplasten fusionieren und somit deren Pigmentsumme als Substrat zur Verfügung steht (Harris 2009). Da Zeaxanthin wie Lutein überwiegend in den äußeren Antennen lokalisiert ist, sollten beide Pigmente in einem ähnlichen Maße und einer ähnlichen Geschwindigkeit frei werden und in das Cytosol gelangen. Sollte die Hypothese zutreffen, so sollten nun ähnliche Mengen an 4-Ketolutein wie Astaxanthin und selbst in frühen Stadien nur geringste Mengen an Canthaxanthin nachzuweisen sein. Vertieft werden könnten diese Untersuchungen durch einen Einsatz der Doppelmutante *lor1npq2*, die weder Lutein noch Violaxanthin, sondern nur Zeaxanthin enthält. Bei der Paarung dieser Doppelmutante mit einer *lor1*-Mutante sollte in den resultierenden Zygosporen durch den geringen Anteil des Luteins nur noch kleine Mengen an 4-Ketolutein nachzuweisen sein, aber große Mengen an Astaxanthin.

Bei Verwendung dieser Mutantenkombination ist keine Herstellung von reinerbigen Zygoten erforderlich. Das ist ein großer Vorteil, weil die Herstellung von Kreuzungspartnern mit gleicher Mutation aber unterschiedlichem Paarungstyp sehr zeit- und ressourcenaufwendig ist.

Alle Stämme mit den gewünschten Paarungstypen sind im Labor vorhanden, da sie freundlicherweise von K. Niyogi, University of California, Berkeley, USA zur Verfügung gestellt wurden:

WT 4A mt+ X ***npq2*** 215-4A mt- sowie ***npq2lor1*** 241-1B mt+ X ***npq2*** 215-4A mt-.

Folglich sollten die Versuche einfach und schnell wichtige Ergebnisse liefern können und eine weitere Überprüfung der Hypothese der Substratverfügbarkeit ermöglichen.

3. Zygosporen akkumulieren neben den Ketocarotinoiden große Mengen an Lipiden

3.1. Unterschiede im Lipidmuster bei vegetativen Zellen und Zygosporen

Die mikroskopischen Aufnahmen von *C. reinhardtii* mittels TEM zeigten, dass die Bildung der Zygosporen von einer tiefgreifenden Reorganisation der Zelle begleitet ist. Auffälligstes Charakteristikum ist die Reduktion des Chloroplasten mit seinen Thylakoidmembranen und die Neubildung von großen Mengen an globulären Strukturen.

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Lipidanalysen konnte gezeigt werden, dass in den vegetativen Zellen von *C. reinhardtii* fast alle Fette in Form von Membranlipiden vorliegen. Große Mengen an Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) und Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) konnten nachgewiesen werden. Dabei spiegeln diese Ergebnisse zur Lipidzusammensetzung in vegetativen Zellen im Wesentlichen die Angaben in der Literatur wider (Eichenberger 1976). MGDG und DGDG bilden die Hauptfraktionen der im Kapitel III.7 dargestellten DC-Analyse. Sie bilden die Hauptbestandteile der plastidären Membranfraktionen (Giroud et al. 1988). Daraus lässt sich schließen, dass die Plastidenmembranen die Lipidfraktion der vegetativen Zellen dominieren. Aufgrund der vorwiegenden Photosyntheseleistung der vegetativen Zellen steht diese Beobachtung in Einklang mit der physiologischen Aufgabe dieser Zellen. Giroud und Mitarbeiter zeigten, dass MGDG, DGDG und SQDG nicht nur in den Chloroplastenmembranen lokalisiert sind, sondern auch im Chloroplasten synthetisiert werden (Giroud et al. 1988). Dies unterscheidet *C. reinhardtii* von Gefäßpflanzen wie *Arabidopsis thaliana*, bei denen das Endoplasmatische Reticulum (ER) immer an der Synthese beteiligt ist (Riekhof und Benning 2009). Als Grund wird die Abwesenheit des Phospholipids Phosphatidylcholin (PC) bei *C. reinhardtii* angesehen, das bei *A. thaliana* ein essentielles Intermediat bei der ER-basierten Lipidsynthese der Plastidenlipide darstellt (Roughan und Slack 1982). In *C. reinhardtii* wird stattdessen das Betainlipid Diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserin (DGTS) synthetisiert, das nur in extraplastidären Membranen vorkommt. Dieses Nichtphospholipid kann die Rolle des Phospholipides PC übernehmen (Riekhof und Benning 2009). Neben DGTS finden sich Phospholipide wie Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylethanolamin (PE) in den extraplastidären Membranen. Diese werden im ER gebildet, nachdem die im Plastiden synthetisierten freien Fettsäuren über die Membran transportiert wurden (Riekhof und Benning 2009). Neutrallipide wie z.B. Triacylglycerole (TAG) findet man in den vegetativen Zellen nur in Spuren (Eichenberger 1976).

Bei den im Kapitel III.7.4 dargestellten Untersuchungen der Zygosporen von *C. reinhardtii* wurde ein ganz anderes Bild beobachtet. Membranlipide wurden nur noch in äußerst geringen Mengen detektiert; dafür wurden sehr große Anteile an Neutralfetten in Form von TAGs nachgewiesen. In Zusammenhang mit den ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführten

TEM- und DIK-Aufnahmen und der SBB-Färbung der Zellen kann postuliert werden, dass es sich bei den globulären Strukturen, die in Zygosporen fast das gesamte Zellvolumen ausfüllen, um Lipidtröpfchen handelt, die aus TAGs bestehen. Diese Daten bestätigen folglich die Hypothese von Cavalier-Smith (1976), der bereits vermutete, dass diese globulären Strukturen Lipide darstellen; biochemische Untersuchungen dazu zeigte er allerdings nicht. Seine Interpretationsbasis war die deutliche Anfärbung dieser Strukturen durch Osmiumtetroxid. Osmiumtetroxid fixiert Lipide durch Cross-linking sehr stark, so dass diese sehr intensiv angefärbt werden (Grünewald et al. 2001).

Auch in den Aplanosporen der Grünalge *H. pluvialis* wurde eine hohe Akkumulation an TAGs nachgewiesen (Grünewald et al. 2001), die photosynthetisch aktive Zellen nicht zeigen. Letztere besitzen eine große Menge an plastidären Membranlipiden wie MGDG und DGDG. Dies zeigt, dass sie einen großen Plastiden aufgrund einer hohen Photosyntheseleistung aufweisen. Hu und Mitarbeiter (2008) beschrieben, dass bei vielen Algen während Umweltstress eine Änderung in der Lipidsynthese hin zur Speicherlipidproduktion erfolgen kann. Das steht in Einklang mit Beobachtungen an *H. pluvialis*, bei dem eine Reduktion der MGDG-, aber ein Anstieg der TAG-Menge stattfand (Grünewald et al. 2001), als auch mit den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen an *C. reinhardtii*.

In der Literatur wurde bisher die TAG-Bildung in Zygosporen von *C. reinhardtii* nicht untersucht. Allerdings finden sich Hinweise, dass TAGs in den Gameten unter besonderen Umweltbedingungen, wie Nährstoffmangel oder Starklicht gebildet werden können; vegetative Zellen akkumulieren dagegen keine große Menge an Neutralfetten (Riekhof und Benning 2009). Daher fand dieser Organismus wenig Interesse für die biotechnologische Herstellung von fettreichen Substanzen. Allerdings wurde er von verschiedenen Wissenschaftlern als Modellorganismus zur Untersuchung der Lipidsynthese diskutiert (Merchant et al. 2007, Riekhof und Benning 2009.) Neues Interesse zogen aber mehrere Paper auf sich, die eine starke Lipidakkumulationen in Gameten dieses Organismus beschrieben (Wang et al. 2009, Li et al. 2010b und Siaux et al. 2011). So zeigten Wang und Mitarbeiter, dass Gameten des zellwandlosen Stammes *cw15* schon nach einem kurzen Nährstoffmangel (24 Stunden N-Mangel) Lipidtröpfchen akkumulierten, die fast ausschließlich aus Neutralfetten in Form von TAGs sowie freien Fettsäuren bestehen. Sie nannten einen Lipidgehalt von 10 ng pro 10^3 Zellen. Dies entsprach einer 15fachen Steigerung in der Lipidproduktion. Gesteigert werden konnte die Lipidsynthese, als eine Mutante verwendet wurde, die einen Defekt in der Stärkeakkumulation zeigte. Gameten von *C. reinhardtii* können große Mengen an Stärke akkumulieren (Martin and Goodenough 1975). Ist diese Synthese der Stärkekörner gestört, so können stattdessen Lipide als Reservestoffe synthetisiert werden (Wang et al. 2009). Diese Mutantenzellen produzierten nach 48 Stunden N-Mangel bei einer Zellzahl von 10^7 Zellen/ml etwa 400 mg Öl pro Liter

Zellkultur. Während die Theorie der gesteigerten Lipidakkumulation in stärkedefizienten Mutanten durch Li und Kollegen bestätigt wurde (Li et al. 2010b), stellen andere Autoren dies in Frage (Siaut et al. 2011). Siaut und Mitarbeiter (2011) untersuchten eine Reihe von wildtypischen Stämmen sowie stärkedefizienten Mutanten. Dabei beobachteten sie, dass nicht die verhinderte Stärkeakkumulation für eine gesteigerte TAG-Synthese verantwortlich war, sondern dass die TAG-Akkumulation zwischen verschiedenen Stämmen stark schwankte. Sie zeigten zusätzlich, dass zwischen den stärkedefizienten Mutanten und den wildtypischen Stämmen, aus denen sie hervorgegangen waren, kein wesentlicher Unterschied im TAG-Gehalt bestand.

Die Autoren aller drei Veröffentlichungen postulieren aufgrund ihrer Forschungsergebnisse, dass *C. reinhardtii* ein interessanter Organismus für die biotechnologische Nutzung sei. Allerdings muss bemerkt werden, dass diese Lipidakkumulation unter heterotrophen Wachstumsbedingungen erfolgte; die Autoren setzten dem Medium Acetat zu. Des Weiteren sind die gewonnen Lipidmengen im Vergleich zu Pflanzen gering.

Aufgrund der mikroskopischen Aufnahmen in der Literatur (Wang et al. 2009) und den im Kapitel III.7 dargestellten SBB- sowie TEM-Aufnahmen, kann vermutet werden, dass die TAG-Synthese in den Zygosporen von *C. reinhardtii* noch höher als die der Gameten ist. In der Publikation durch Wang und Kollegen (2009) fehlen allerdings dazu passende Aufnahmen von mehreren Wochen lang gelagerten Gameten. Vergleicht man die Aufnahmen der *cw15* Gameten (Wang et al. 2009) mit Zygosporen nach 48 Stunden Lagerzeit, kann bei den Zygosporen eine größere Lipidakkumulation beobachtet werden. Beim Vergleich der Gameten der stärkefreien Mutanten (Wang et al. 2009) mit den Zygosporen kann eine etwa gleich hohe Lipidakkumulation nach 48 Stunden vermutet werden. Bei diesen Mutantengameten findet sich nach 48 Stunden aber noch eine hohe Chlorophyllfluoreszenz, was auf einen weiterhin präsenten Chloroplasten schließen lässt. Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Gameten zeigten sehr lange eine grüne Färbung, und die Reduktion der Chlorophylle sowie PS-Carotinoide war im Vergleich zu den Zygosporen gering (Siehe Kapitel III.3.1.2). Wahrscheinlich bleibt der Chloroplast der Gameten lange erhalten, so dass im Vergleich zu den Zygosporen weniger Platz für Lipidtröpfchen verfügbar sein sollte, da bei den Zygosporen der Chloroplast stark reduziert vorliegt. Es kann somit vermutet werden, dass die in Zygosporen synthetisierte Lipidmenge deutlich über der der Gameten liegt. Der Vorteil der Untersuchung von Gameten statt Zygosporen zur Lipidakkumulation in *C. reinhardtii* liegt allerdings in der etwas besseren Handhabung der Gameten. Die Anzucht und die Ernte sowie die Extraktion der Lipide sind einfacher als bei den Zygosporen.

3.2. Die Akkumulation von Lipiden und Ketocarotinoiden stehen miteinander in Verbindung

3.2.1. Cytosolische Lipidtröpfchen als Orte der Ketocarotinoidakkumulation

In den Zygosporen von *C. reinhardtii* wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit neben den Ketocarotinoiden große Mengen an Lipidtröpfchen detektiert. Diese wurden als ein möglicher Ort für die Ketocarotinoidakkumulation angesehen. Das war zum einen darin begründet, dass diese Lipidtröpfchen in frühen ultrastrukturellen Untersuchungen als orange-rot beschrieben worden waren (Cavalier-Smith 1976) und zum anderen, dass die Ketocarotinoide eine lipophile Umgebung für eine Akkumulation benötigen. Grund dafür sind die lipophilen Eigenschaften der Pigmente, denn trotz zum Teil polarer Seitengruppen verleiht der C₄₀-Körper den Carotinoiden einen sehr lipophilen Charakter. Solch lipophile Strukturen können in Algen und Pflanzen Membranen oder Lipidtröpfchen darstellen. Biomembranen können nur eine begrenzte Menge von Carotinoiden einlagern (Socaciu et al. 2000). Je nach Seitengruppen integrieren diese vertikal oder horizontal in die Lipiddoppelschicht (Gruszecki und Strzayk 2005) und verringern somit die Membranfluidität (Socaciu et al. 2000). Daher akkumulieren bei vielen Organismen größere Mengen an Carotinoiden in Lipidtröpfchen. Neben der β -Carotin-Akkumulation in plastidären Lipidtröpfchen bei *Dunaliella salina* (Rabbani et al. 1998) kann das Phänomen auch im Augenfleck von *C. reinhardtii* beobachtet werden. Dort akkumulieren größere Mengen an α - und β -Carotinoiden in Lipidtröpfchen, die zwischen mehreren Membranschichten eingelagert sind (Schmidt et al. 2006). Bei ketocarotinoidsynthetisierenden Organismen wie *H. pluvialis* oder *M. zofingienses* wurde beobachtet, dass die Mehrheit der Ketocarotinoide in cytosolischen Lipidtröpfchen zu finden ist (Santos und Mesquita 1984, Bar et al. 1995).

Czygan beobachtete in seinen Untersuchungen, dass die Bildung von Sekundärcarotinoiden „synchron zu einer Bildung fetter Öle“ erfolgt (Czygan 1968). Er spekulierte, dass die „Sekundärcarotinoide in die Fettvakuolen diffundieren und verestert“ würden.

Die Lipidtröpfchen in *H. pluvialis* wurden zuerst als Plastoglobuli bezeichnet, da parallel ein Abbau der Thylakoidmembranen beobachtet wurde (Sprey 1970). Als zusätzliches Indiz deutete man, dass die Fettsäuresynthese im Plastiden lokalisiert ist (Richter 1998). Erst später entdeckte man, dass diese globulären Strukturen nicht mehr im Chloroplasten, sondern außerhalb, im Cytosol, akkumulieren. Santos und Mesquita (1984) zeigten dies anhand ultrastruktureller Daten, Grünewald und Mitarbeiter (Grünewald et al. 2001) verwendeten überwiegend biochemische Daten, basierend auf der Lipidzusammensetzung der globulären Strukturen. Santos und Mesquita (1984) beobachteten, dass die Lipidtröpfchen von einer einschichtigen Hemimembran umgeben sind. Das gleiche Phänomen wurde auch bei anderen Grünalgen beobachtet (Vechtel et al. 1992). Grünewald

und Kollegen vermuteten, dass die Hemimebranen aus DGTS bestehen, da es das majore Membranlipid in diesem Zellstadium darstellt (Grünewald et al. 2001). Zusammengenommen deuteten diese Daten darauf hin, dass es sich bei den Lipidtröpfchen in *H. pluvialis* um Oleosom-ähnliche Strukturen handelt (Grünewald et al. 2001). Oleosome sind Lipidtröpfchen, die von einer Phospholipidschicht umgeben sind, in die Proteine eingelagert sind (Huang 1992). Diese Oleosine stabilisieren aufgrund ihrer speziellen Struktur, zusammen mit den Phospholipiden, die Lipidtröpfchen und verhindern ein großflächiges Zusammenfließen der kleinen Tropfen. Außerdem vermutete man an ihnen Erkennungssequenzen für die Lipasen, um ggf. den Fettabbau zu initiieren. Oleosine findet man in Saaten von Gymno- und Angiospermien, funktionell ähnliche Proteine aber auch in Algen (Huang 1992, Moellering und Benning 2010).

Die Lipidtröpfchen in Zygosporen von *C. reinhardtii* sind wahrscheinlich, vergleichbar zu *H. pluvialis*, im Cytosol lokalisiert. Als Hinweis hierfür wird zum einen die große ultrastrukturelle Ähnlichkeit der Dauerstadien beider Algen angesehen. Zum anderen fanden sich in den TEM-Aufnahmen keine deutlichen Hinweise auf einen plastidären Ursprung der Lipidtröpfchen. Dabei wurde versucht, den Verlauf der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten während der Reduktion des Plastiden zu beobachten. Leider konnte kein zeitlicher Verlauf in der Reduktion der Plastidenmembran in der TEM-Zeitreihe erfasst werden, da die Reifung der Zygosporen schneller als vermutet erfolgte. TEM-Aufnahmen von Proben, die täglich innerhalb der ersten vier Reifungstage erstellt werden, könnten hier weitere Hinweise liefern. Aufgrund der detaillierten TEM-Aufnahmen kann aber postuliert werden, dass es sich bei den Lipidtröpfchen in *C. reinhardtii* wahrscheinlich auch um Oleosom-ähnliche Strukturen handelt. Eine hemimebranähnliche Struktur konnte, wie in Kapitel III.7.2 ersichtlich, beobachtet werden. Zusätzlich wären Untersuchungen zur Fettsäurezusammensetzung der Lipide hilfreich, da sie Aufschluss über den plastidären oder cytosolischen Ursprung der Lipide geben könnten.

3.2.2. Die Verbindung von Ketocarotinoid- und Lipidsynthese

Nachdem in den Zygosporen von *C. reinhardtii* neben den Ketocarotinoiden eine Akkumulation von Lipiden beobachtet werden konnte, wurde vermutet, dass eine Interaktion der Synthese von Lipiden sowie Ketocarotinoiden existiert. Dabei war auffällig, dass zwar Zellen detektiert wurden, die Lipide, aber keine Ketocarotinoide akkumulierten; Zygoten, die Ketocarotinoide, aber keine Lipidtröpfchen bildeten, wurden nicht gefunden. Beispiele hierfür sind die bei 9 °C gereiften Zygoten sowie die *lor1*-Zygoten, bei denen eine Lipidakkumulation ohne bzw. mit stark verringerter Ketocarotinoidbiosynthese beobachtet wurde. Auch die Experimente zur Lagerung der Zygoten auf Minimalmedium zeigten, dass ohne Lipidakkumulation keine Ketocarotinoidsynthese initiiert wird.

Verschiedene Autoren konnten eine Verbindung von Lipid- und Ketocarotinoidakkumulation für *H. pluvialis*, aber auch für andere Grünalgen zeigen:

So wurde in *H. pluvialis* beobachtet, dass nur eine geringe bzw. keine Ketocarotinoidsynthese erfolgte, sobald die Fettsäuresynthese durch Zugabe von Inhibitoren unterbunden wurde (Schoefs et al. 2001, Zhekisheva et al. 2005). Wurde dagegen die Ketocarotinoidbiosynthese gestoppt, so akkumulierte *H. pluvialis* weiterhin große Mengen an Fetten (Zhekisheva et al. 2005). Zhekisheva und Mitarbeiter (2005) postulierten, dass erst eine kritische Menge an Lipiden synthetisiert werden muss, bevor eine Ketocarotinoidsynthese initiiert wird. Auch bei *D. salina* wurde gezeigt, dass eine Lipidsynthese obligat für eine β -Carotinakkumulation, allerdings in Plastoglobuli, ist (Rabbani et al. 1998).

Interessant in diesem Zusammenhang waren die Untersuchungen zur Zygotenreifung in *C. reinhardtii* mittels TEM und der Pigmentzusammensetzung, die sehr deutlich demonstrieren, dass auch in diesem Organismus die Lipidtröpfchen mehrere Tage vor den Ketocarotinoiden entstehen (vergleiche Kapitel III.3 und III.7). So zeigte sich, dass die Lipidakkumulation am Tag 4 weitgehend abgeschlossen war, da die Zellen dicht mit Lipidtröpfchen gefüllt waren. Zu diesem Zeitpunkt konnten erstmals Spuren der Ketocarotinoide gefunden werden, die Hauptsynthesephase der Ketocarotinoide lag zwischen Tag 6 und 8. Eine Sättigung wurde gegen Tag 14 erreicht.

Für *H. pluvialis* gibt es deutliche Hinweise, dass das ketolierende Enzym BKT zwar im Plastiden und im Cytosol lokalisiert ist, die aktive Form allerdings nur im Cytosol vorkommt. Diese aktive Form ist vermutlich auf die Peripherie der cytosolischen Lipidtröpfchen beschränkt (Grünwald et al. 2001). Es ist somit denkbar, dass eine Aktivierung des Enzyms erst durch die Anlagerung an die Lipidtröpfchen erfolgt. Dies bedingt die Präexistenz der Lipidtröpfchen.

Des Weiteren ist denkbar, dass nicht nur die im Zuge der Plastidenreduktion freigesetzten PS-Carotinoide Wiederverwertung finden; es ist auch möglich, dass die Membranlipide der

abgebauten Thylakoide für die Bildung der Lipidtröpfchen oder für die Veresterung der Ketocarotinoide mit Fettsäuren recycled werden. Um diese Hypothese zu untersuchen, sollte die Identität der Fettsäuren aus den Ketocarotinoid-Acyl-Estern der Lipidtröpfchen mittels massenspektrometrischer Untersuchung bestimmt werden. Dieses Experiment könnte aufzeigen, ob die Fettsäuren neu gebildet oder aus vorhandenen Lipiden synthetisiert werden. Dieses wäre ein weiteres Indiz, dass die im Zuge der Reduzierung des Chloroplasten freiwerdenden Substanzen als Substrate für die neuen Pigmente und Lipide im Cytosol der Zygosporen dienen können.

3.2.3. Die Veresterung der Ketocarotinoide mit Fettsäuren

Besonders auffällig ist, dass die Ketocarotinoide in *C. reinhardtii* überwiegend in Form von Pigment-Fettsäureestern vorliegen. Dieses Phänomen wurde auch in allen bisher untersuchten ketocarotinoidakkumulierenden Grünalgen wie z.B. *H. pluvialis* und *M. zoofingiensis* beobachtet. Ein Grund hierfür könnte in der vermutlich besseren Integration der Ketocarotinoide in die lipophile Umgebung liegen (Lemoine und Schoefs 2010), so dass höhere Konzentrationen an Ketocarotinoiden in die Lipidtröpfchen eingelagert werden können (Zhekisheva et al. 2005). Des Weiteren zeigten Kobayashi und Sakamoto (1999), dass Ketocarotinoidester ein höheres antioxidatives Potential als die freien Pigmente besitzen. Dazu untersuchten sie die Fähigkeit, Singulett-Sauerstoff zu quenchen. Dieses Potential war bei den veresterten Formen unabhängig von der Polarität der Lösungsmittel. Dagegen zeigte die freie Form eine geringere Quenchingfähigkeit, wenn das Lösungsmittel polar war.

Die Veresterung der Ketocarotinoide erfolgt vermutlich im Cytoplasma, in dem eine Esterase freie Fettsäuren mit den Hydroxygruppen des C3 oder C3'-Atoms des Carotinoids kondensiert. Das verantwortliche Enzym konnte für *H. pluvialis* noch nicht identifiziert werden. Auch sind die Bedingungen für die Synthese von Mono- oder Diestern nicht aufgeklärt. Vermutlich ist die Substratverfügbarkeit, in diesem Fall die der Fettsäuren, das entscheidende Kriterium.

Bei den Ketocarotinoiden in den Zygosporen von *C. reinhardtii* nimmt der Anteil der Ketocarotinoidester am Ketocarotinoidgesamtgehalt mit dem Reifegrad zu. Allerdings spielt die Pigmentzusammensetzung von *C. reinhardtii* auch für den Grad der Veresterung eine große Rolle. Das dominierende Ketocarotinoid aus *C. reinhardtii*, 4-Ketolutein, konnte, wie in Kapitel III.2.8.4 dargestellt, ausschließlich als Monoester nachgewiesen werden. Anders war es bei Astaxanthin, das teilweise als Mono- überwiegend aber als Diester detektiert wurde. 4-Ketolutein besitzt zwar in beiden Iononringen eine Hydroxylgruppe am C3-Atom, allerdings stellt ein Ring einen β -Iononring, der andere einen ϵ -Iononring dar. Somit ist zu vermuten,

dass die Esterase aus *C. reinhardtii* nicht in der Lage ist, Esterverbindung an ϵ -Iononringen einzuführen.

Die Ketocarotinoidacyl ester wiesen in *H. pluvialis* unterschiedliche Kohlenstofflängen und unterschiedliche Sättigungsgrade der Fettsäuren auf (Lemoine und Schoefs 2010). Dabei stellten die ungesättigten Fettsäuren mit rund 81 % den größten Anteil (Miao et al. 2008). Aufgrund der großen Anzahl an verschiedenen Peaks im HPLC-Chromatogramm, die ähnliche Absorptionseigenschaften zeigten, wird auch für die Zygosporen von *C. reinhardtii* vermutet, dass unterschiedliche Fettsäuren in den Ketocarotinoidacylestern enthalten sind. Dabei konnten keine großen Unterschiede in der Anzahl der 4-Ketoluteinacyl ester und der Astaxanthinacyl ester gefunden werden. Die genaue Identifizierung der Fettsäuren aus den Ketocarotinoidacylestern steht noch aus.

4. Die Akkumulation von Ketocarotinoiden und Lipiden in Zygosporen wird von einer Reorganisation der Zelle begleitet

4.1. Die Akkumulation von Stärkekörnern

Im Zuge der Zygotenreifung konnte, wie in Kapitel III.3.2 dargestellt, nicht nur eine Akkumulation von Lipidtröpfchen, sondern auch eine Bildung von Stärkekörnern beobachtet werden. Als Startpunkt für diese Untersuchungen wurden Zygosporen betrachtet, die 24 Stunden im Licht gepaart hatten. Diese Zellen enthielten schon einige Lipidtröpfchen und auch deutlich mehr Stärkekörner als es in vegetativen Zellen beobachtet wurde. Daraus kann gefolgert werden, dass eine Stärke- und Lipidakkumulation entweder bereits in den Gameten erfolgt oder innerhalb der ersten 24 Stunden der Zygosporenreife. Für die Überlegung, dass bereits die Gameten Reservestoffe akkumulieren, sprechen Untersuchungen, die zeigten, dass schon nach 24 Stunden N-Mangel sowohl eine Stärke- als auch eine Lipidakkumulation in den Zellen von *C. reinhardtii* auftrat (Wang et al. 2009). Dies waren genau die Bedingungen, mit denen bei den vorliegenden Versuchen die Gameteninduktion erfolgte. Auch Sager und Granick (1954) wiesen nach, dass Gameten größere Mengen an Stärke in Form von globulären Strukturen anhäufen.

Allerdings ist es wahrscheinlich, dass die Stärke- und Lipidakkumulationen innerhalb der ersten 24 Stunden Paarungszeit noch einmal verstärkt werden. Alle Paarungsprotokolle sehen eine Inkubation des Paarungsansatzes im Licht und einer Lichtinkubation der auf Plattenkulturen übertragenen Zygoten während der ersten 24 Stunden vor. Diese Lichtinkubation wurde als essentiell für einen hohen Paarungserfolg beschrieben (Suzuki und Johnson 2002). Möglicherweise wird das in dieser Zeit vorhandene Licht von den Zellen verwendet, um mittels Photosyntheseleistung Stärke zu akkumulieren. In Cavalier-Smiths Untersuchungen zur Zygosporenformation (1976) wird wenig über eine Stärkeakkumulation berichtet. Es finden sich lediglich Hinweise, dass Stärkekörner auch in den reifen Zygosporen vorhanden sind. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann aber vermutet werden, dass in den Gameten und in ein bis zwei Tage lang im Dunkeln gelagerten Zygosporen mehr Stärkekörner zu identifizieren sind, als zu späteren Zeitpunkten. Möglich ist, dass die Stärkekörner in den ersten Tagen der Zygosporenreifung abgebaut werden, um Glucose für den Aufbau der sekundären Zellwand bereitzustellen. Außerdem muss auch in Betracht gezogen werden, dass durch die großen Mengen an Lipidtröpfchen die Stärkekörner in den TEM nicht mehr sichtbar sind. Allerdings wurde trotz der großen Anzahl an untersuchten TEM-Aufnahmen keine Zellen mit auffällig vielen Stärkekörnern beobachtet.

4.2. Die Reduktion des Chloroplasten

Die Reduktion des Chloroplasten in algalen Dauerstadien ist ein vielfach beobachtetes Phänomen. So wurden ausführliche ultrastrukturelle Untersuchungen an *H. pluvialis* (Santos und Mesquita 1984), aber z. B. auch an *Chlamydomonas nivalis* (Remias et al. 2005) durchgeführt, die die Verkleinerung des Chloroplasten beschreiben. Diese Beobachtungen unterstreichen, dass die Ruhezellstadien eine völlig andere Aufgabe für die Organismen haben. Jeglicher verfügbare Platz in den Zellen wird für die Einlagerung von Energiereserven verwendet. Eine Untersuchung der Chloroplastenreduktion kann somit Auskunft darüber geben, wie stark die Bildung des Dauerstadiums fortgeschritten ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Zygosporien von *C. reinhardtii* zeigen, dass die Reduktion des Chloroplasten sehr schnell erfolgte. Schon nach vier Tagen Lagerung im Dunkeln waren in den TEM-Aufnahmen praktisch keine Thylakoidmembranen mehr zu erkennen. Der Chloroplast war sehr stark reduziert. Dies wurde auch durch eine parallele Reduzierung des Chlorophyllgehaltes deutlich. Allerdings wurde nach fünf Tagen lediglich eine Halbierung dieses Pigmentgehaltes festgestellt. Erst nach ca. 14 Tagen war der Chlorophyllgehalt bei einem Minimum von ca. 5 % des Ausgangsgehaltes angekommen. Somit ist es möglich, dass auch die Chloroplastenreduktion erst nach 14 Tagen abgeschlossen war.

Auffällig ist, dass auch die Tag 0-Probe (24 Stunden Paarung im Licht) in den vorliegenden TEM-Untersuchungen im Vergleich zu vegetativen Zellen schon relativ wenige Thylakoidmembransysteme aufwies. So ist es möglich, dass innerhalb der ersten Stunden nach der Paarung bereits sehr viele Thylakoidmembranen abgebaut werden. Allerdings konnten bereits TEM-Studien an Gameten zeigen, dass innerhalb von wenigen Stunden nach Induktion auch ein Abbau von Thylakoidmembranen stattfindet. Parallel wurde die Photosyntheseleistung in Form der CO₂-Fixierung auf ca. 10 % verringert (Martin und Goodenough 1975). Somit ist davon auszugehen, dass die Reduktion des Chloroplasten nicht erst infolge der Paarung, sondern bereits durch den verringerten Thylakoidgehalt der beiden Gametenchloroplasten eingeleitet wird. Bei *C. reinhardtii* fusionieren beide Chloroplasten der Paarungspartner (Cavalier-Smith 1976).

4.3. Die Bildung einer sekundären Zellwand

4.3.1. Der Aufbau der sekundären Zellwand bei den Zygosporen von *C. reinhardtii*

Neben dem Abbau des Chloroplasten war die Neusynthese der sekundären Zellwand in den Zygosporen besonders auffällig. Diese bildete sich, wie in den TEM-Untersuchungen beobachtet werden konnte, innerhalb von zwei Tagen Reifung im Dunkeln. Ab diesem Zeitpunkt war mittels der verwendeten mikroskopischen Methoden kein Unterschied zu älteren Zygosporen sichtbar.

Die sekundäre Zellwand der Zygosporen von *C. reinhardtii* wurde bereits 1976 von Cavalier-Smith untersucht. Er beschrieb sie als vier- bis achtschichtig, bestehend aus einer homogenen Schicht, die der inneren Zelloberfläche anliegt. Darauf folgt die Zentrallamina, die aus drei dichten, dunkel gefärbten und zwei blass gefärbten, wenig dichten Lagen besteht. Diese sind wellenartig geformt. Darauf folgt eine Alveolatschicht und als Abschluss eine fibrillöse Schicht. Die Zygotenzellwand besteht zu 60 % aus Zucker mit Glucose als majorem Saccharid und (1-3) β -D-Glucan als strukturgebendem Polysaccharid. Der Anteil der Proteine beträgt 10 %, an denen Hydroxyprolin die Mehrheit darstellt (Grief et al. 1987, Suzuki et al. 2000).

Somit ist die Zellwand des Dauerstadiums von *C. reinhardtii* sehr ähnlich zu der aus den Aplanosporen von *H. pluvialis* aufgebaut. Diese Aplanosporenzellwand besteht aus dem Innerspace, der an das Plasmalemma folgt. Darauf befindet sich die sekundäre Zellwand mit einer trilaminaren Schicht als Abschluss (Hagen et al. 2002). Wie auch bei *C. reinhardtii* konnte belegt werden, dass es spezielle Proteine für die Sekundärwandsynthese in *H. pluvialis* gibt. So wurden mehr als 50 Proteine detektiert, die an der Bildung beteiligt sind (Wang et al. 2004).

4.3.2. Die besonderen Eigenschaften von sekundären Zellwänden der algalen

Dauerstadien

Alle Untersuchungen zur Sekundärwand in algalen Dauerformen zeigen, dass diese Strukturen aufgrund vieler Schichten und einem hohen Fibrillenanteil sehr dicht sind. Dies führt zu der Theorie, dass diese Wände einen besonderen Schutz vor den schwierigen und extrem belastenden Umweltbedingungen, denen die Dauerformen ausgesetzt sind, darstellen.

Zu diesen Herausforderungen gehört in erster Linie der Wasserverlust. Aufgrund der dichten Strukturen kann dieser minimiert werden. So zeigten Daniel und Mitarbeiter bei *C. monoica*, dass Zygoten mit einer reduzierten Zellwand einen höheren Wasserverlust bei einer Inkubation in einer Kochsalzlösung aufwiesen (Daniel et al. 2007).

Gleichzeitig stellt die sekundäre Zellwand eine Lichtbarriere dar. Ist ihre Dicke verringert, so wurde bei Zellen von *C. monoica* eine deutlich höhere UV-Sensibilität festgestellt (Daniel et al. 2007). Neben dem Wasseraustritt schützt sie somit auch vor Sonnen- bzw. UV-Strahlung. In diesem Zusammenhang stehen auch Beobachtungen, dass Ketocarotinoide in die trilaminare Schicht der sekundären Zellwände einlagern können (Burczyk 1987a). Laut Burczyk liegen diese Carotinoide in der nicht-veresterten Form und in der *all-trans*-Konformation vor. Über die Funktion ist wenig bekannt. Eine Hypothese ist, dass sie an der Synthese von Sporopolleninen beteiligt sind. Diese Sporopollenine oder sporopollenin-ähnlichen Substanzen finden sich bei einigen Algen in den Sekundärwänden, aber auch in Samen von Pollen oder Sporen von Gefäßpflanzen. Diese Heteropolymere sind dafür bekannt chemisch sehr widerstandsfähig zu sein; sie sind inert gegenüber vielen Säuren, Basen und Lösungsmitteln. Als Syntheseweg wurde eine oxidative Polymerisation von Carotinoiden und Carotinoidestern vermutet (Atkinson et al. 1972). Frühe Veröffentlichungen spekulierten über eine Verbindung zwischen Sekundäracarotinoid- und Sporopolleninbildung. Da Carotinoide als Synthesevorstufe der Sporopollenine diskutiert werden, lag für Atkinson und Mitarbeiter sowie Burczyk nahe, dass aufgrund der räumlichen Nähe die an oder in der Sekundärwand befindlichen Ketocarotinoide als Substrate dienen könnten (Atkinson et al. 1972, Burczyk 1987a). Daher wurde bei einigen Algen sogar eine direkte Verknüpfung von Ketocarotinoid- und Sporopolleninsynthese diskutiert (Burczyk 1987b). Dies konnte aber nicht weiter bestätigt werden.

In *H. pluvialis* wurde das sporopolleninähnliche Molekül Algaenan entdeckt (Hagen et al. 2002). Dieses ist in geringer Konzentration schon in vegetativen Zellen vorhanden, akkumuliert aber erst in die Aplanosporenwände in hohen Mengen (Montsant et al. 2001). Dort ist es wahrscheinlich in der trilaminaren Schicht integriert. Es verleiht der Zellwand u.a. eine Säureresistenz (Hagen et al. 2002).

Sporopollenine wurden auch in den Zygotenwänden von *C. monoica* nachgewiesen (Van Winkle-Swift und Rickoll 1997). Für *C. reinhardtii* gibt es allerdings keine Hinweise auf deren Anwesenheit in den Zygotenwänden (Harris 2009). Aufgrund einer erhöhten Lösungsmittelstabilität (vgl. Methanol-Spülstabilität) sollte es aber auch in *C. reinhardtii* Substanzen geben, die die Funktion der Sporopollenine übernehmen. Diese sind allerdings bisher unbekannt. Die Ketocarotinoide in *C. reinhardtii* können allerdings nicht die Synthesevorstufe für mögliche Sporopollenin-ähnliche Strukturen bilden. Grund dafür ist eine zeitliche Diskrepanz zwischen dem Auftreten der Resistenz der Zygosporenzellwand (z.B. Methanolstabilität) und der Ketocarotinoidsynthese. Erstere tritt bereits ab dem 2. Reifungstag auf, Ketocarotinoide konnten frühestens ab dem vierten Reifungstag nachgewiesen werden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kam die Vermutung auf, dass die sekundäre Zellwand eine Bedingung für die Ketocarotinoidsynthese darstellt. Es wurden keine Zygosporen

beobachtet, die trotz fehlender sekundärer Zellwand größere Mengen an Ketocarotinoiden akkumulieren. Ein Beispiel hierfür stellen die bei 9 °C gelagerten Zygoten dar, sie besitzen nur sehr geringe Mengen an Ketocarotinoiden, aber auch keine sekundäre Zellwand (siehe Kapitel III.6). Alle TEM-mikroskopisch untersuchten Zygoten, die Ketocarotinoide akkumulierten, besaßen dagegen diese sekundäre Zellwand. Auch für die Zygoten auf Minimalmedium, die keine Ketocarotinoidsynthese zeigten, konnte keine Sekundärzellwand beobachtet werden. Folglich besteht wahrscheinlich keine direkte Verbindung zwischen der Carotinoidsynthese und der Bildung der Zellwand. Es ist aber denkbar, dass infolge der sekundären Zellwand physiologische Bedingungen geschaffen werden, die die Ketocarotinoidsynthese beeinflussen.

Bei der Identifikation der an der Zellwandsynthese von *H. pluvialis* beteiligten Proteine fanden sich auch mehrere Hitzeschock-Proteine (Wang et al. 2004). Möglich ist, dass diese durch Umweltbedingungen wie z.B. Hitze oder Licht initiiert werden, so dass die Zellwandsynthese startet. Beide Umweltfaktoren fehlen bei 9 °C-Zygoten von *C. reinhardtii*.

Ein Hinweis, dass die Sekundärwandsynthese nicht mit der Ketocarotinoidsynthese in Verbindung steht, lieferten Untersuchungen an diploiden *T-GSM1*-Mutanten von *C. reinhardtii*. Durch die Induktion von Matingtype-spezifischen Proteinen starteten diese vegetativen Zellen nach einer Gameteninduktion ein frühes Zygotenprogramm, ohne dass Zellen fusionierten (Lee et al. 2008). Die Zellen bildeten eine Sekundärwand aus, die aber von den Autoren nicht näher charakterisiert wurde. Untersuchungen dieser Zellen innerhalb der Arbeitsgruppe Lohr lieferten keinerlei Hinweise auf eine Ketocarotinoidakkumulation. Somit sollte das von den Autoren postulierte übergeordnete Signal zur Zygosporieninduktion nicht zwangsläufig eine Ketocarotinoidsynthese bewirken, vielmehr müssen auch andere Faktoren diese Bildung beeinflussen. Denkbar ist dabei ein mehrstufiger Prozess, bei dem die Synthesen und Reaktionen aufeinander aufbauen. Entscheidend könnten dabei von Lipidpräsenz oder hohen Temperaturen hervorgerufene Signale sein.

Auch in *H. pluvialis* fanden sich Hinweise, dass die Ketocarotinoidsynthese nicht an die Präsenz einer sekundären Zellwand gekoppelt ist. Dort konnten rote Zellen, die mobil waren, identifiziert werden (Miao et al. 2008). Das bedeutet, dass diese Zellen Ketocarotinoide akkumulieren, gleichzeitig aber Flagellen besitzen. Da aber die Sekundärwandsynthese den Verlust der Flagellen zu Folge hat (Wang et al. 2004), sollten diese Zellen keine Sekundärwand besitzen. Somit kann die Bildung einer Sekundärwand keine Bedingung für die Ketocarotinoidsynthese in *H. pluvialis* darstellen.

In diesem Zusammenhang sollte die Idee der Zygosporienbildung aus zellwandlosen *cw*-Stämmen von *C. reinhardtii* weiterverfolgt werden. Die Idee der Paarung von *cw*-Mutanten bestand in der Arbeitsgruppe Lohr schon länger. Die resultierenden Zygosporien könnten möglicherweise eine reduzierte oder gar keine Sekundärwand besitzen.

Dies würde eine Extraktion der Pigmente, der Lipidfraktionen oder des genetischen Materials stark vereinfachen. Bisher scheiterten die Paarungsversuche aber an der Immobilität der verwendeten Stämme (cc400 mt+, cc406 mt- und cc3491mt-), obwohl sie als paarungsfähig in der Chlamydomonas Core Collection beschrieben wurden. Eine Erhöhung von Temperatur und Licht brachte keinen Erfolg. Möglich wären weitere Paarungsversuche mit z.B. anderen Nährmedien oder stark erhöhten Lichtintensitäten ($\sim 1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Jiang und Stern 2009). Es ist zwar nicht sicher, dass die Zygosporien ohne sekundäre Zellwand in der Lage sind Ketocarotinoide zu akkumulieren, aufgrund der Untersuchungen an *H. pluvialis* (Miao et al. 2008) ist dies aber zu vermuten.

5. Die physiologische Bedeutung der Ketocarotinoidakkumulation für die Zygosporien

Die Lipidvorkommen stellen in algalen Dauerstadien eine der wichtigsten Zellkomponente dar. Sie bilden die Energiereserven, mit denen ein Auskeimen und somit das Erhalten der Art sichergestellt wird. So ermöglichen sie energiereiche Prozesse, wie z.B. die Synthese der Thylakoidmembransysteme, bevor die Zellen durch die Photosynthese selbstständig Energie synthetisieren können. Sie bilden folglich den Grundstock für den Aufbau der energetischen Selbstversorgung. Lipide verlieren ihr hohes energetisches Potential, wenn sie infolge von oxidativen Prozessen inaktiviert werden. Der Schutz der Lipide vor oxidativen Substanzen, wie z.B. der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), stellt eine wichtige Aufgabe in den Dauerstadien dar.

Ketocarotinoide sind bekannt für ihre antioxidative Wirkung (Margalith 1999). Ihr antioxidatives Potential wird höher als das der photosynthetischen Carotinoide, z.B. β -Carotin und Lutein angesehen (Jayaraj et al. 2008). So lag die Vermutung nahe, dass die biologische Funktion der Ketocarotinoide im Schutz der Lipide vor einer Antioxidation liegt. Diese Annahme fand in den ersten Untersuchungen an *H. pluvialis* wenig Beachtung. So wurde vielmehr eine biochemische sowie strukturelle Funktion der Ketocarotinoide in den Dauerstadien in den Vordergrund gestellt. Eine Hypothese vermutete, dass die Ketocarotinoide Nebenprodukte von unbekanntem chemischen Reaktionen darstellten, die nur in den Dauerstadien der Zellen vorkamen (Czygan 1968). Eine andere Hypothese postulierte den Schutz der Zelle, in dem die Ketocarotinoid-Lipidtröpfchen eine Art Sonnenschirm bilden (Hagen et al. 1994). Dieser schütze den Chloroplasten und die darin enthaltenen Photosysteme vor einer Überanregung, in dem es das Licht abschirme. Da der Chloroplast im Zellinneren, völlig umgeben von den gefärbten globulären Strukturen liegt, könnten nur noch geringere Lichtintensitäten vordringen. Zu dieser Hypothese passten Beobachtungen an der Grünalge *D. salina*, die unter ungünstigen Umweltbedingungen plastidäre Lipidtröpfchen mit hohen Mengen an eingelagertem β -Carotin bildet (Ben-Amotz et al. 1982). Diese Hypothese ist heute als eher unwahrscheinlich anzusehen, da der Schutz des Chloroplasten nur eine untergeordnete Rolle im Vergleich zum Schutz der Zelle darstellt. Durch die Reduktion des Chloroplasten und der massiv verringerten Menge an Photosystemen, gepaart mit der nur noch geringen Bedeutung der autotrophen Energiegewinnung, scheint es unwahrscheinlich, dass dies solch einen hohen Energieaufwand wie die Lipid- und Ketocarotinoidsynthese rechtfertigt. Des Weiteren wird in diesem Zusammenhang das Quenchen der Chlorophylle mit Hilfe der zahlreich vorhandenen Ketocarotinoide diskutiert, da in *D. salina* das als plastidäres Sekundärcarotinoid akkumulierte β -Carotin diese Aufgabe übernimmt (Ben-Amotz et al. 1989). Dafür müssen beide Moleküle aber in direkter Nachbarschaft liegen. Da bei *H. pluvialis* und auch anderen

Algen die Ketocarotinoide außerhalb des Chloroplasten lokalisiert sind, tritt diese räumliche Nähe nicht auf (Boussiba 2000).

Die Gefahr der Zellschädigung durch ROS stellt ein großes Problem der Zellen, insbesondere aber von Dauerstadien dar. ROS können infolge von photochemischem und nicht-photochemischem Stress entstehen. Dabei bilden sich Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff, Superoxidradikale oder Hydroxylradikale. Diese können aufgrund ihrer äußerst hohen Reaktivität Schädigungen in der ganzen Zelle hervorrufen (Lemoine und Schoefs 2010). Dabei können auch Schädigungen an Proteinen und Nukleinsäuren auftreten. Vegetative Zellen schützen sich u.a. mit enzymatischem Abbau dieser Substanzen durch die Superoxid-Dismutase (SOD), Katalasen, Peroxidasen und verwandten Enzymen. Für *H. pluvialis* wurde gezeigt, dass diese zelluläre Antwort auf Stress in vegetativen Zellen und jungen Aplanosporen auftritt, sie enthalten bei Stress höhere Konzentrationen der Enzyme SOD und Peroxidase (Lemoine und Schoefs 2010). Bei älteren Aplanosporen findet man diese Enzyme nur noch in geringen Mengen. Lemoine und Schoefs (2010) vermuten, dass die dort enthaltenen Ketocarotinoide so schnell Sauerstoffradikale oder Energie abfangen, dass die Bildung der Enzyme gar nicht initiiert wird. Auch andere Autoren postulieren diesen zweigeteilten Reaktionsmechanismus auf ROS in *H. pluvialis* (Kobayashi 2003). Dabei stellen die Ketocarotinoide die Antwort auf eine lang andauernde Stresssituation dar. So wird auch vermutet, dass eine entscheidende Aufgabe des Astaxanthins in *H. pluvialis* ist, die durch die Chloroplastenmembran diffundierenden Sauerstoffradikale zu quenchen. Singulett-Sauerstoff stellt dabei die am häufigsten in diesem Zellsystem vorhandene ROS dar (Boussiba 2000).

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Ähnlichkeiten in der Cytologie und der Pigmentzusammensetzung der Ruhezygoten von *C. reinhardtii* mit den Aplanosporen von *H. pluvialis* lassen sich die Hypothesen und Theorien für *H. pluvialis* auf *C. reinhardtii* übertragen:

Der Schutz des Chloroplasten und der Zelle in Form eines Sonnenschirms wird für *C. reinhardtii* als eher unwahrscheinlich angesehen. Aufgrund der TEM-Untersuchungen und Untersuchungen durch Cavalier-Smith (1976) wird postuliert, dass die Lipidtröpfchen, ebenso wie in *H. pluvialis*, im Cytosol lokalisiert sind. Da in *C. reinhardtii* der Chloroplast schneller reduziert wird als Ketocarotinoide gebildet werden, sollte der Schutz dieses Organs nicht im Vordergrund stehen.

Vielmehr lässt sich für *C. reinhardtii* vermuten, dass die Synthese der Ketocarotinoide dem Schutz der Lipide vor einer Oxidation dient. Die Gründe dafür sind vielfältig. Zum einen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nur eine Ketocarotinoidsynthese erfolgt, wenn bereits Lipide akkumulierten (vergleiche Kapitel IV.3). Inkubierte man die Zellen auf Minimalmedium und besaßen sie damit keine Energie für die

Lipidsynthese, konnte keinerlei Ketocarotinoïdsynthese beobachtet werden (Kapitel III.5). Des Weiteren zeigen die Untersuchungen zur Zygotenreifung, dass die Lipidakkumulation zeitlich vor der Ketocarotinoïdsynthese erfolgt (Kapitel III.3.2). Auch konnte unter kalten und dunklen Bedingungen, wie bei der 9 °C Zygote, zwar eine Lipidbildung beobachtet werden, die aber keine Ketocarotinoïdsynthese bedingte. In keinem der untersuchten Fälle konnte eine Ketocarotinoïdsynthese beobachtet werden, der keine Lipidsynthese vorausgegangen war. Somit wird postuliert, dass die Lipidakkumulation obligat für die Ketocarotinoïdsynthese ist. Dies deutet darauf hin, dass eine Ketocarotinoïdsynthese unnötig ist, wenn die Lipide nicht vorhanden sind. Dies ist typisch für Schutzsubstanzen. Alternativ muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass ohne Lipidtröpfchen keine wesentlichen Kompartimente für die Akkumulation von Ketocarotinoïden vorhanden sind, da Membranen instabil werden, wenn sie größere Mengen an Carotinoïden einlagern (Socaciu et al. 2000).

Besser mit den Ergebnissen aus *C. reinhardtii* ist die Theorie aus *H. pluvialis* in Einklang zu bringen, dass die Ketocarotinoïde die Speicherlipide vor ROS schützen. Mithilfe von Untersuchungen zu SOD- sowie Peroxidasenaktivitäten in unterschiedlich lang gelagerten Zygosporen von *C. reinhardtii* könnte gezeigt werden, ob Ketocarotinoïde einen Schutzmechanismus bei einem lang andauernden Stress (sowohl photochemisch als auch nicht-photochemisch) bei dem ROS gebildet werden, darstellen können. In Anlehnung an die Untersuchungen an *H. pluvialis* ist denkbar, dass zu Beginn der Zygotenreife ROS enzymatisch abgebaut werden, bis infolge der Zygotenreifung diese Aufgabe zunehmend von den Ketocarotinoïden übernommen wird. ROS könnten dann im gesamten Cytosol durch die Ketocarotinoïde gequenchet werden. Dabei würden vor allem die Lipide vor einer Peroxidation geschützt, die in Folge von ROS auftritt, und den Verlust der zellulären Energiereserven bedeuten würde. Als weiteren Nebeneffekt könnten auch die Nukleinsäuren und Proteine vor den ROS geschützt werden.

Fragwürdig ist weiterhin der Schutz der Thylakoidmembranen im Chloroplasten, wenn man von der an *H. pluvialis* angelehnte Hypothese ausgeht, dass die ketocarotinoïdhaltigen Lipidtröpfchen im Cytosol und nicht plastidär lokalisiert sind. Boussiba (2000) spekulierte zwar, dass die Sauerstoffradikale durch die Chloroplastenmembran diffundieren und dann durch die cytosolisch lokalisierten Ketocarotinoïde gequenchet werden könnten. Allerdings sollte dies zu einer massiven Schädigung der Thylakoidmembranen führen, bis die Sauerstoffradikale durch die Plastidenmembran diffundiert sind. Es ist dagegen denkbar, dass diese Quenchingfunktion von den in den Thylakoiden verbliebenen PS-Carotinoïde (z.B. VAZ) übernommen wird. Aufgrund der verringerten Anregung infolge der indirekten Abschirmung der Zelle durch die carotinoïdhaltigen Lipidtröpfchen, sollten auch nur noch geringe Überanregungen in den Photosystemen entstehen, die von den PS-Carotinoïden gequentscht werden könnten.

Der Schutz der Lipide und der gesamten Zelle vor ROS wird somit als die Hauptaufgabe für die Ketocarotinoide in *C. reinhardtii* vermutet. Indirekt könnten die mit Ketocarotinoid gefüllten Lipidtröpfchen auch den verbliebenen Chloroplasten und den Nukleus vor der UV-Strahlung abschirmen.

Ein weitere Hinweis für die Hypothese, dass der Schutz der Lipide vor ROS die Hauptaufgabe der Ketocarotinoide darstellt, stellen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an der Grünalge *Chlamydomonas moewusii* dar (Kapitel III.10). Diese ebenso im Boden lebende einzellige Grünalge wurde weit weniger untersucht als die ihr nah verwandte Alge *C. reinhardtii* und stellt kein Modellorganismus dar. Als Grund gilt vor allem ihr rein autotrophes Wachstumsverhalten. Besonders gut wurde in *C. moewusii* allerdings der Zellzyklus erforscht, der dem von *C. reinhardtii* sehr ähnlich ist (Harris 2009). Die Morphologie der Zygosporen wurde in der Mitte des letzten Jahrhunderts untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese Alge auch eine auffällige sekundäre Zellwand bildet, die ihr eine hohe Stabilität verleiht (Brown et al. 1968). Über die Farbe und die Pigmentzusammensetzung dieses Dauerstadiums gibt es keine Literaturdaten, allerdings wurden Gameten dieses Organismus im Rahmen von Sekundärcarotinoidforschungen untersucht, die keinerlei Ketocarotinoidvorkommen nachwiesen (Czygan 1968).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten ebenfalls keinerlei Ketocarotinoidvorkommen in dieser Alge detektieren. Dabei wurden vegetative Zellen, Gameten, vor allem aber Zygosporen untersucht. Die Existenz der verschiedenen Zellformen waren mit Hilfe von auflichtmikroskopischen Aufnahmen überprüft worden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *C. moewusii* nicht in der Lage ist, Ketocarotinoide zu akkumulieren.

Ausführliche elektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. moewusii* zeigten, dass sich bei der Zygotenreifung vor allem großen Mengen an Stärke und geringe Mengen von Lipidtröpfchen bilden (Brown et al. 1968). Letztere identifizierten Brown und Mitarbeiter (1968) mittels Sudanfärbung. Das Bild reifer Zygosporen (ca. 6 bis 12 Monate alt) zeigt eine so starke Stärkeakkumulation, die etwa die Hälfte des Zellvolumens ausfüllt. Daneben finden sich Lipidtröpfchen, die maximal 20 % des Zellvolumens darstellen. Zu erkennen sind wenige, aber große globuläre Strukturen. Auch beschrieben die Autoren einen massiven Abbau der Thylakoidmembranen. Über die Farbe der Zygosporen wurden keine Aussagen getroffen.

C. moewusii ist somit in der Lage Zygosporen mit einer Energiereserve auszubilden. Die ultrastrukturellen Untersuchungen (Brown et al. 1968) sprechen aber dafür, dass bei diesem Organismus die Energie überwiegend in Form von Stärke und weniger in Form von Lipiden eingelagert wird. Aufgrund der geringen Menge an Lipiden wäre dann deren Schutz vor Peroxidation durch Ketocarotinoide möglicherweise nicht nötig. Stärke bietet den Vorteil, dass sie von *C. moewusii* auch anaerob verstoffwechselt werden kann (Klein und Betz

1978). Somit kann vermutet werden, dass dieser Organismus keine Ketocarotinoide akkumuliert, da aufgrund eines geringen Lipidgehaltes der Zygosporen keine Ketocarotinoide als Antioxidantien benötigt werden.

6. Die Energieversorgung entscheidet über die Entwicklung der Zygosporen

6.1. Die Zygosporenentwicklung bei *C. reinhardtii* ist abhängig von einer Energiezufuhr

Sowohl Lipidtröpfchen als auch Stärkekörner gehören zu den dominierenden Zellkomponenten der Zygosporen. Während der Bildung der Dauerstadien wird daher viel energetisch hochwertiges Material eingelagert. Dies bedeutet, dass die Zelle zunächst sehr viel Energie synthetisieren oder aufnehmen muss.

Wie essentiell die Energieversorgung der Zygosporen ist, zeigten die Versuche an auf Minimalmedium gelagerten Zygoten (Kapitel III.5). Im Labor wird die Zygosporenbildung von *C. reinhardtii* auf acetathaltigem Medium durchgeführt. Da *C. reinhardtii* Acetat als Nährstoffquelle nutzen kann, wachsen die Zellen im Dunkeln heterotroph (Harris 2009). Das Zellwachstum und auch die Zygosporenentwicklung werden beschleunigt. Wurden die Zygosporen während der Paarung auf Minimalmedium transferiert, so paarten sie zwar, aber die Zygosporenentwicklung stoppte zu einem frühen Zeitpunkt, wie die TEM-Aufnahmen zeigten. Zygoten des gleichen Paarungsansatzes, die auf TAP-N-Medium lagerten, entwickelten sich normal, so dass dieses Ergebnis nicht als Versuchsartefakt angesehen wurde. Da die Minimalmedium-Zygoten eine beginnende Lipidakkumulation zeigten, die dann aber abstoppte, wurde vermutet, dass sich die Zygosporen aufgrund eines Energiemangels nicht mehr weiterentwickelten und ihr Reifungszustand folglich arretierte. Diese Zellen wiesen weder eine Sekundärwand noch Ketocarotinoide auf. Die Reservestoffe der fusionierten Gameten waren folglich nicht ausreichend, um die Bildung des Dauerstadiums zu ermöglichen.

Eine heterotrophe Energiegewinnung zur schnellen Entwicklung der Dauerformen ist unter Laborbedingungen eine sinnvolle Methode. Allerdings stellt sich die Frage, wie die Energieversorgung für die Zygotenreifung unter natürlichen Bedingungen stattfindet. Diese Fragestellung wird zu einem späteren Zeitpunkt weiter diskutiert. Zunächst wird aber dargelegt, wie die Energieversorgung in der bereits mehrfach als Vergleichsorganismus vorgestellten Grünalge *H. pluvialis* erfolgt.

6.2. Die Energieversorgung der Aplanosporen von *H. pluvialis*

Untersuchungsergebnisse zur Energieversorgung von Aplanosporen von *H. pluvialis* sind vielfach in der Literatur zu finden. Allerdings wurden diese weniger auf die Lipidproduktion bezogen, sondern häufiger auf die Menge der gebildeten Ketocarotinoide. Diese Untersuchungsergebnisse lassen keinen klaren Schluss zu, ob die Energiezufuhr direkt die Syntheseleistung der Ketocarotinoide beeinflusste oder ob aufgrund der erhöhten Energieversorgung eine erhöhte Lipidsynthese stattfand, die indirekt zu einer höheren

Ketocarotinoïdsyntheseleistung führte. Letztere Möglichkeit wird aufgrund der physiologischen Bedeutung und der Daten von *C. reinhardtii* als wahrscheinlicher angesehen. Dabei würde die erhöhte Lipidkonzentration eine erhöhte Menge an Ketocarotinoïden als Antioxidans erfordern.

Die Beobachtung, dass *H. pluvialis* auch deutlich mehr Ketocarotinoïde akkumuliert, wenn man dem Medium Acetat zusetzt, erfolgte schon früh (Donkin 1976). Allerdings untersuchte Donkin (1976) nicht, ob auch mehr Lipide gebildet werden. Die Beobachtungen lassen aber die Vermutung zu, dass die gesteigerte Ketocarotinoïdsynthese nur ein Nebeneffekt der hohen Lipidakkumulation darstellt. Spätere Untersuchungen in den Aplanosporen von *H. pluvialis* zeigten ebenfalls eine gesteigerte Ketocarotinoïdsyntheseleistung bei Zugabe von organischen Substraten wie Acetat, Malonat und Pyruvat (Kobayashi 1991 und 1999, Jin et al. 2006). Wahrscheinlich kann *H. pluvialis*, ähnlich wie *C. reinhardtii*, Acetat als heterotrophe Energiequelle nutzen. Somit steht durch die Acetatzugabe bei einer beginnenden Aplanosporenbildung eine höhere Energieversorgung zur Bildung der Speicherlipide zur Verfügung.

Bei *H. pluvialis* wurden auch Untersuchungen zur autotrophen Energiegewinnung während der Aplanosporenbildung durchgeführt. So zeigten Hagen und Kollegen, dass bei *H. pluvialis* zu Beginn der Aplanosporenbildung die Photosyntheserate nicht, wie vermutet, sank. Vielmehr änderte sich die Photosyntheseleistung weg von dem Ziel der Reduktionsäquivalentengewinnung hin zu einem ATP-gewinnenden Prozess (Hagen et al. 1993). Das primäre Ziel schien die Synthese von ATP zu sein, welches direkt in energiereiche Stoffwechselwege wie der Fettsäuresynthese einfließen konnte. Die Autoren beobachteten gleichzeitig einen Anstieg der Photophosphorylierung und der Synthese von Speicherkohlehydraten wie der Stärke.

Die Umstellung des Photosyntheseapparates zur Gewinnung von Energieäquivalenten sollte auch eine Verkleinerung der Antennenkomplexe im Photosystem 2 (PS-II) zur Folge haben. Dies äußert sich häufig in einem erhöhten Chlorophyll a/b-Verhältnis, da die PS-II-Antennen, den höchsten Chl b-Gehalt aller photosynthetischen Pigment-Protein-Komplexe aufweisen (Richter 1998). Dieses Phänomen wurde auch nachgewiesen (Grünewald et al. 1997). Grünewald und Mitarbeiter (1997) beobachteten, dass das Chl a/b-Verhältnis im Laufe der Aplanosporenbildung deutlich zunahm, d.h. es lag mehr Chl a vor. Die Autoren deuteten dies als einen Effekt der erhöhten Lichtintensitäten. Es könnte aber auch die Folge der veränderten Energiegewinnung darstellen.

Die Untersuchungen zur Energiegewinnung bei den Aplanosporen von *H. pluvialis* lassen sich nur teilweise auf die Energiegewinnung der Zygosporen von *C. reinhardtii* übertragen, da ein entscheidender Unterschied zu beachten ist:

Bei *H. pluvialis* wird die Synthese der Ketocarotinoide und allgemein die Bildung der Dauerstadien durch hohe Lichtintensitäten induziert bzw. verstärkt. Bei den Zygosporen von *C. reinhardtii* zeigten die Untersuchungen genau das gegenteilige Phänomen. Nur wenn die Zygoten dunkel lagerten, wurde eine Bildung des Dauerstadiums im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet. Auch sehen alle Protokolle zur Zygosporenreifung diese Dunkelphase vor. Es finden sich keine Protokolle, die eine Lagerung im Licht empfehlen. Für die beschleunigte Bildung der Zygosporen und vor allem der Ketocarotinoide durch die Dunkelphase können folgende physiologische Prozesse postuliert werden: Die Dunkelphase kann den Thylakoidabbau beschleunigen, da der Plastid nicht mehr für die Photosyntheseleistung benötigt wird. Dies hätte zur Folge, dass die Substrate der Ketocarotinoide in Form der frei gesetzten PS-Carotinoide schneller zur Verfügung stehen und umgesetzt werden können. *H. pluvialis* muss das Substrat dagegen erst energieaufwendig synthetisieren. Daher muss für die Bildung der Ketocarotinoide, ebenso wie für die der Lipide, erst Energie gewonnen werden. Somit sollte die Ketocarotinoidsynthese in *H. pluvialis* noch energieaufwendiger als die in *C. reinhardtii* sein, da bei letzterer aufgrund des Recyclings der Carotinoide Energie eingespart wird. Der größte Energiebedarf der beiden Dauerstadien wird allerdings für die Bildung der Lipide benötigt; der Energieaufwand der Ketocarotinoidbiosynthese ist dabei unterzuordnen.

6.3. Mögliche Energiegewinnung der Zygosporen von *C. reinhardtii* unter natürlichen Bedingungen

Die energieaufwendige Entwicklung der Zygosporen von *C. reinhardtii* wird unter Laborbedingungen durch den Zusatz von Acetat unterstützt. Es ist noch unklar, wie die Zygosporenentwicklung unter natürlichen Bedingungen erfolgt. Zwar kommt Acetat auch in Böden, dem natürlichen Lebensraum der Alge, vor, allerdings sind dort die Konzentrationen an Acetat deutlich geringer. Es finden sich nur wenige Literaturquellen zu einem Acetatvorkommen im Boden, da Acetat einer ständigen Neusynthese, aber auch einem Abbau durch Mikroorganismen unterliegt. Angegebene Konzentrationen von 10 µmol pro Liter im Boden (van Hees et al. 2005) stellen aber weniger als 0,1 % der im TAP-Medium vorliegenden Acetatkonzentration von 17,4 mmol/l dar (Harris 2009). Denkbar wäre ein anderes, bislang unbeachtetes organisches Substrat, das als heterotrophe Energiequelle dient oder alternativ eine andere autotrophe Energiegewinnung. So ist es möglich, dass die Gameten unter natürlichen Bedingungen eine etwas längere Entwicklung durchlaufen, um Energiereserven zu bilden. Dazu wurde beobachtet, dass Gameten bereits nach ca. 24-48 Stunden Induktion größere Mengen an Lipiden und Stärke einlagern (Wang et al. 2009). Diese Energiereserven der einzelnen Gameten addieren sich bei der Paarung und könnten so einen ausreichenden Energievorrat bilden. Des Weiteren ist denkbar, dass unter

natürlichen Bedingungen der Thylakoidabbau langsamer erfolgt als im Labor. Im Labor war eine massive Reduktion des Chloroplasten und eine Halbierung des Pigmentgehaltes innerhalb von vier bis sechs Tagen zu beobachten. Denkbar ist, dass dies deutlich langsamer erfolgt und somit in den ersten Tagen der Zygotenentwicklung noch eine autotrophe Energiegewinnung stattfindet, die zur Produktion von Reservestoffen verwendet wird. Erst dann würde eine starke Degradation des Plastiden erfolgen. Möglicherweise verzögert sich daraufhin die Akkumulation der Ketocarotinoide. Bei dieser Hypothese ist eine ähnliche Umstellung der Photosyntheseleistung in den Zygoten denkbar, wie sie auch für *H. pluvialis* diskutiert wird.

Diese Hypothese der autotrophen Energiegewinnung von jungen Zygosporen könnte auch im Labor geprüft werden. Dazu sollten vegetative Zellen bereits auf Minimalmedium inkubiert werden, um ihren Energiestoffwechsel an eine rein autotrophe Energiegewinnung zu adaptieren. Es sollten höhere Lichtbedingungen von mindestens $100\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ gewählt werden. Die Induktion der Gameten könnte statt der verwendeten 24 Stunden auf 36 bis 48 Stunden ausgedehnt werden. Die Paarung sollte im Anschluss in Anlehnung an das bisher verwendete Protokoll erfolgen, allerdings ohne den Transfer der Platten ins Dunkle. Zumindest ein Teil der Platten sollte im Licht inkubiert werden, um eine autotrophe Energiegewinnung zu ermöglichen. Neben Pigmentmessungen könnten TEM-Aufnahmen einer Reifungszeitreihe dieser Proben Hinweise auf einen möglicherweise verzögerten Thylakoidabbau liefern.

7. Die Bildung der Ketocarotinoide in den Zygosporen ist temperaturabhängig

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Ketocarotinoidakkumulation in den Zygosporen von *C. reinhardtii* auch bei verschiedenen Temperaturen untersucht (Kapitel III.6). Dabei wurden die Zygosporen immer bei 22 °C gepaart, die Lagerung der Zygotenplatten erfolgte dann aber bei 9 °C, 18 °C, 22 °C, 30 °C und 37 °C. Das Standardprotokoll sah eine Inkubation bei 22 °C vor.

Bei einer Lagerung bei 30 °C wurden je nach Versuchsansatz gleiche, etwas größere aber auch etwas geringere Mengen an Ketocarotinoiden gebildet wie bei 22 °C. Die Mengen unterlagen einigen Schwankungen innerhalb der verschiedenen Ansätze. Allerdings erwies sich der Zellaufschluss der bei 30 °C gereiften Zygoten als deutlich schwieriger. Denkbar ist, dass die sekundäre Zellwand in diesen Zellen noch dicker und folglich widerstandsfähiger war. Die sekundäre Zellwand stellt bei algalen Dauerstadien einen Verdunstungsschutz dar (Daniel et al. 2007). Je höher die Temperatur, umso stärker sollte dieser Schutz sein. In zukünftigen Experimenten sollte die Ultrastruktur der 30 °C-Zygosporen mittels TEM-Aufnahmen charakterisiert werden.

Einmalig fanden Untersuchungen an Zygosporen statt, die bei 37 °C gelagert worden waren und im Kapitel III.6.3 dargestellt sind. Diese zeigten keinerlei Ketocarotinoid-akkumulation. Denkbar ist, dass in diesem Temperaturbereich keine Reifung der Zygosporen mehr stattfand. Leider gibt es keine mikroskopischen Aufnahmen dieser Zellen, so dass keine Aussage getroffen werden kann, ob überhaupt eine Zygotenreifung stattgefunden hat. Möglicherweise bildet *C. reinhardtii* unter diesen Bedingungen keine Dauerstadien aus. Mit 37 °C liegt die Inkubationstemperatur 2 °C über dem Toleranzbereich dieser Alge, der sich von 15 °C bis 35 °C erstreckt (Harris 2009). Möglich ist aber auch, dass Zygosporen entstanden, aber keine Ketocarotinoide akkumulierten. Dann könnte dies darauf hinweisen, dass die Ketocarotinoidsynthese bei 37 °C gestört ist.

Bei der Reifung unter niedrigeren Temperaturen wurden weniger Ketocarotinoide gebildet als beim Standardansatz der bei 22 °C gelagerten Zygosporen. Dabei war der Unterschied zwischen der Lagerung bei 18 °C und der Standardtemperatur sehr gering. Dagegen akkumulierten die Zygosporen, die bei 9 °C gelagert worden waren, nur geringe Mengen oder gar keine Ketocarotinoide mehr. Diese Zygoten zeigten eine besondere Morphologie. Sie besaßen zwar große Mengen an Lipidtröpfchen, aber keine sekundäre Zellwand. Somit können diese Zellen bei Acetatzugabe auch unter kalten Bedingungen Lipide akkumulieren; die Ketocarotinoidsynthese ist unter diesen Bedingungen aber stark reduziert. Im Gegensatz zu den 22 °C-Zygosporen ist die Abnahme der Chlorophylle und Carotinoide innerhalb der ersten vier Wochen allerdings auch geringer. Die Reduktion des Chloroplasten ist in diesen Zellen folglich deutlich schwächer. Dies bestätigen auch ultrastrukturelle Untersuchungen dieser Zellen mittels TEM, die im Kapitel III.6.1 dargestellt sind.

Die stärkste Akkumulation an Ketocarotinoiden in *C. reinhardtii* findet sich folglich im gleichen Temperaturbereich, der auch als optimaler Wachstumsbereich für die vegetativen Zellen beschrieben ist (Harris 2009). Außerhalb dieser Temperaturspanne ist die Zygosporientwicklung eingeschränkt und die Ketocarotinoidbildung stark reduziert bis eingestellt.

Für *H. pluvialis* wurden eine Temperaturspanne von 15-30 °C als optimal für die Ketocarotinoidakkumulation beschrieben. Dabei unterscheiden sich die Angaben aus verschiedenen Studien (Evens et al. 2008). Während Evens und Mitarbeiter (2008) 28 °C und hohe Lichtintensitäten als optimal für eine Sekundärkarotinoidakkumulation beschreiben, nennen andere Untersuchungen 15 °C und niedrige Lichtintensitäten (Harker et al. 1995). Letzte Angabe wird von der Theorie gestützt, dass kalte Bedingungen die Bildung von ROS begünstigen, da schneller eine Überanregung der Photosysteme erfolgt (Boussiba 2000). Dagegen findet beim Hefepilz *X. dendrorhous* bei 4 °C weiterhin eine Astaxanthinsynthese statt (Sanpedro und Kula 1998).

Beim Vergleich der bei unterschiedlichen Temperaturen gelagerten Zygosporien von *C. reinhardtii* konnte kein auffälliger Unterschied in der Ketocarotinoidzusammensetzung beobachtet werden. So ist im Temperaturbereich von 9 bis 30 °C keine auffällige Änderung im Verhältnis von α - zu β -Carotinoiden festzustellen. Bei der Lagerung zwischen 18 und 30 °C wurde ein sehr ähnliches Verhältnis von freien und veresterten Ketocarotinoiden gefunden. Folglich scheint es, dass die unterschiedliche Lagerung keine Auswirkung auf die Art der Substratverfügbarkeit hat. Somit werden alle Substrate bei den verschiedenen Bedingungen gleich schnell freigesetzt und auch gleich schnell ketoliert.

Für die unterschiedliche Ketocarotinoidakkumulationen bei verschiedenen Temperaturen können sowohl zellphysiologische als auch enzymbedingte Gründe vorliegen. Interessant waren dabei Beobachtungen im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit, die daraufhin deuteten, dass sich das Enzym BKT durch eine besonders lange Haltbarkeit, vor allem unter kalten Umweltbedingungen, auszuzeichnen scheint. Diese Hypothese stützt sich auf Beobachtungen an zunächst bei 9 °C und anschließend bei 30 °C gelagerten Zygosporien. Bei diesen Experimenten schien es, als ob die Fähigkeit und die Intensität der Ketocarotinoidsyntheseleistung bei der Nachreifung unter 30 °C von der Ketocarotinoidsyntheseleistung während der Lagerung bei 9 °C abhängig waren. Erste Hinweise deuten darauf, dass es entscheidend ist, wie stark die BKT-Bildung in den ersten 24 Stunden der Paarung im Licht bei 22 °C war. So zeigten einige 9 °C Zygoten eine Ketocarotinoidakkumulation, andere nicht. Waren unter 9 °C gar keine Ketocarotinoide zu detektieren, so konnten auch bei einer Nachreifung unter 30 °C-Bedingungen keine neuen Pigmente synthetisiert werden. Es ist zwar denkbar, dass nach monatelanger Lagerung in kalten Temperaturen beim Transfer in warme Umgebung verschiedene Stoffwechselwege wieder

initiiert werden, allerdings sollte es auch möglich sein, vorhandene Stoffwechselwege wieder aufzunehmen. Somit könnte die Ketocarotinoidsynthese wieder verstärkt ablaufen, wenn die BKT in den Zellen noch vorhanden ist. Untersuchungen der Zygoten während der ersten 24 Stunden nach Paarung bei 22 °C sowie der im Anschluss unter warmen sowie kalten Bedingungen gelagerten Zygoten, könnten Hinweise darauf liefern, ob in diesem Zeitraum essentielle Faktoren für die Ketocarotinoidsynthese gebildet werden. Denkbar wäre dafür zum Beispiel die Untersuchung der Transkriptmenge der BKT mittels real-time-PCR. Möglicherweise ist die Bildung des Enzyms BKT während dieser Zeit ein entscheidender Faktor.

8. *Chlamydomonas* als neues Modellsystem der Ketocarotinoidbiosynthese in Grünalgen

Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einem der wichtigsten Untersuchungsobjekte der botanischen Forschung entwickelt. Allein in den letzten 6 Jahren, während die vorliegende Arbeit entstand, finden sich über 3000 Publikationen zu diesem Organismus. Darunter zählen fast 40 Veröffentlichungen in Nature und Science. Eine der wichtigsten Publikationen war die Veröffentlichung des Genoms (Merchant et al. 2007). Neben zahlreichen Veröffentlichungen zur Photosynthese finden sich auch wichtige Grundlagenarbeiten zu anderen Themen von hoher allgemeinbiologischer Relevanz. So konnten allein im letzten Jahr u.a. Erkenntnisse zum NAD-Stoffwechsel (Lin et al. 2010), zu Flagellenbewegungen (Wei et al. 2010) oder zum biotechnologisch wichtigen Thema der Wasserstoffproduktion in Grünalgen (Übersicht in Ghysels et al. 2010) gewonnen werden.

C. reinhardtii weist eine Reihe von Eigenschaften auf, die seine Etablierung als Modellorganismus stark begünstigt haben. Dazu gehören als erstes die einfache Anzucht und die hohe Teilungsrate (Verdopplung alle fünf bis acht Stunden, Harris 2009). Des Weiteren ist *C. reinhardtii* ein haploider Organismus. Dies bedeutet, dass alle vier Meioseprodukte isoliert und vereinzelt herangezogen werden können. Sie können für genetische Analysen verwendet werden (erstmal in Pascher 1916 erwähnt, zitiert in Harris 2001). Im Jahr 1982 publizierten Rochaix und Van Dillewijn erstmals, dass dieser Organismus durch Einschleusen von fremdem Erbgut genetisch manipuliert werden kann (Harris 2009). Zuvor waren schon Mutationen durch UV-Bestrahlungen hervorgerufen worden (Harris 2009). Durch den haploiden Chromosomensatz haben diese Mutationen eine direkte Auswirkung auf den Phänotyp und werden bei der vegetativen Vermehrung auf alle Nachkommen vererbt. Einen großen Durchbruch für die Photosyntheseforschung erbrachten die bereits im Jahre 1953 erfolgten Untersuchungen von Sager und Granick, die zeigten, dass *Chlamydomonas reinhardtii* durch Acetatzufuhr im Medium heterotroph wachsen kann. Dies ermöglichte Untersuchungen von in Dunkelheit angezogenen Algen. Insbesondere für die Erforschung von essentiellen Faktoren der Photosynthese war das ein großer Fortschritt.

Nachdem zunächst nur das Kerngenom in Experimenten manipuliert worden war, konnten später auch das Chloroplastengenom und das Mitochondriengenom gezielt durch homologe Rekombination mutiert werden (Harris 2009). Damit wurden außergewöhnliche Analysen möglich. Besonders hilfreich für Transformationsexperimente war die Existenz von Mutanten ohne Zellwand, die stabil wuchsen und keinerlei negative Nebeneffekte zeigten. Diese als *cw* (cell wall-deficient) bezeichneten Stämme werden inzwischen in sehr vielen Labors eingesetzt, da sie sich nicht nur leicht transformieren lassen; auch der Zellaufschluss wird

stark vereinfacht. Als Folge dieser Untersuchungen waren genetische Informationen des Organismus schon relativ früh (ca. ab 2003) online verfügbar.

Die große Zahl von Mutanten ist ein weiterer Vorteil dieses Modellsystems; auch sind diese über viele Jahre stabil. Das führt dazu, dass sie in Algensammlungen angezogen und vertrieben werden können. So beherbergt allein die Chlamydomonas Core Collection (www.chlamy.org) zurzeit etwa 4000 Stämme, von denen ca. 90 % Mutanten darstellen.

Die Vorteile des Modellsystems von *C. reinhardtii* wurden auch in der vorliegenden Arbeit genutzt. Neben dem Einsatz von acetathaltigem Medium, das eine heterotrophe bzw. mixotrophe Anzucht ermöglicht, wurden u.a. auch Mutanten zur Identifizierung von neuen Pigmenten eingesetzt. Des Weiteren bietet die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Trennung von Lipid- und Ketocarotinoidsynthese in bei 9 °C reifenden Zygosporen zukünftig die Möglichkeit, auf genomischer sowie proteomischer Ebene neue Ergebnisse zur Synthese von Ketocarotinoiden und Lipiden zu gewinnen.

Nachteile bei der Verwendung der Zygosporen von *C. reinhardtii* als Modellorganismus stellen zurzeit die aufwendige Herstellung der Zellen sowie anschließend die schwierige Homogenisierung des Zellmaterials dar. Zumindest das Homogenisierungsproblem könnte möglicherweise durch eine Verwendung von zellwandlosen Stämmen, die Zygosporen mit einer dünneren Sekundärwand bilden sollten, verringert werden. Mit Hilfe des inzwischen optimierten Paarungsprotokolls können aber auch relativ einfach größere Mengen an Zygosporen gewonnen werden. Die Vorteile dieses Modellorganismus überwiegen folglich die überschaubare Anzahl an Nachteilen, wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse demonstrieren.

8.1 Die Bedeutung der *lor1*-Zygote

Mit Hilfe der Zygoten der *lor1*-Mutante konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit wertvolle Hinweise auf die Identität der Ketocarotinoide erhalten werden. Die Bestimmung des anfangs unbekanntes Pigmentes 4-Ketolutein im Modellorganismus konnte u.a. mit dieser Methode erfolgen. Auch ermöglichten Experimente mit den Zygoten dieser Mutanten die Identifizierung der einzelnen Pigmentfettsäureester in der Monoacylsterfraktion. Wertvolle Hinweise lieferten diese Zygoten auch für die Verbindung von Ketocarotinoid- und Lipidsynthese, da sie trotz geringer Ketocarotinoidakkumulation große Mengen an Lipidtröpfchen bildeten.

Trotz allem stellte dieser Versuchsaufbau auch die Tücken der Mutantenforschung dar. Experimente mit der *lor1*-Mutante cc2420 und der Gewinnung des zweiten Paarungstypes mit dem gleichen Pigmentdefekt stellten sich als äußerst zeitaufwendig dar. Die ersten Versuche scheiterten. Aufgrund des verfügbaren Genoms von *C. reinhardtii* und postulierter Chromosomenlokationen (Merchant et al. 2007) konnten die Positionen der beiden zu

rekombinierenden Gene identifiziert werden. Dabei stellte sich heraus, dass beide Gene auf dem gleichen Chromosom lagen. Die Wahrscheinlichkeit ihrer Trennung durch Crossing-over wurde mit 10 %, d.h. mit einem Abstand von etwa 10 cM angegeben. Auch in diesem Fall zeigte sich der Vorteil von *C. reinhardtii* als Modellorganismus, da die Ursache für die problematische Klongewinnung mittels genomischer Information geklärt werden konnte.

In Untersuchungen der heterozygoten Zygoten (*lor1* x WT) u.a. mittels Tetradenanalysen konnte schließlich der gesuchte Klon mit der *lor1*-Mutation und dem Paarungstyp mt- (Klon C12) identifiziert werden. Nachdem die beiden *lor1*-Stämme cc2420 E3.6 und C12 miteinander gepaart wurden, konnten nur Zygoten beobachtet werden, die β -Carotin als Hauptpigment besaßen. Mit Hilfe der DIK-Aufnahmen wurde deutlich, dass diese Zygoten einen Zelldefekt aufwiesen. Ursache dafür konnte in einem Gendefekt gelegen haben, da diese *lor1*-Mutante aus einem UV-induzierten Mutantenscreening hervorgegangen war. Aufgrund der geringen Lipid- und Stärkeakkumulation in diesen Zygoten wurde vermutet, dass die Reifung sehr früh unterbrochen und möglicherweise ein Defekt in der Zellwandsynthese aufgetreten sein konnte. Folglich konnten diese *lor1*-Mutanten mit weiteren Gendefekten nicht für die Analysen im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit verwendet werden, so dass andere *lor1*-Mutanten (ASX1-1b und ASX2-11d) bezogen wurden.

Mit Hilfe der *lor1*-Zygoten (ASX1-1b x ASX2-11d) könnten zukünftig Experimente zum unterschiedlichen antioxidativen Potential von 4-Ketolutein und Astaxanthin durchgeführt werden. Da Astaxanthin zwei Ketogruppen aufweist und somit ein um eine Doppelbindung längeres konjugiertes Doppelbindungssystem als 4-Ketolutein besitzt, könnte Astaxanthin ein besseres Antioxidans darstellen. *lor1*-Zygosporen, die ausschließlich Canthaxanthin und Astaxanthin aufweisen, sowie WT-Zygosporen, die neben Astaxanthin und Canthaxanthin überwiegend 4-Ketolutein enthalten, könnten Starklicht- und Temperaturversuchen ausgesetzt werden. Dabei wäre es wichtig, Zellen zu verwenden, die den gleichen Gesamtketocarotinoidgehalt aufweisen, um keine Verfälschungen durch die Pigmentkonzentrationen zu erhalten. Da *lor1*- und WT-Zygosporen in etwa gleich hohe Lipidmengen aufweisen, könnten Vergleiche zum Oxidationsgrad der Lipide in den verschiedenen Zygosporen durchgeführt werden. Dabei könnten Erkenntnisse gesammelt werden, ob die Zygosporen mit 4-Ketoluteinanteil eine höhere Schädigung der Lipide aufweisen oder ob es keinen Unterschied gibt. Sollte 4-Ketolutein ein deutlich geringes antioxidatives Potential im Vergleich zu Astaxanthin besitzen, so könnte dies eine Erklärung für die Dominanz des Astaxanthinvorkommens in vielen algalen Dauerstadien darstellen.

8.2 Die Bedeutung der 9 °C-Zygote

Von besonderem Interesse bei der Erforschung der Ketocarotinoidsynthese ist die Verbindung zur der Bildung der Lipide. Die Vorteile des Modellorganismus *C. reinhardtii* können auch bei der Beantwortung dieser Fragestellung weiter helfen. Die Besonderheiten der bei 9 °C gereiften Zygoten, die zwar Lipide, aber kaum Ketocarotinoide akkumulieren, könnten mittels Proteomanalysen zeigen, welche Gene bei der Lipidsynthese aktiv sind. Die Akkumulation von Neutralfetten bei *C. reinhardtii* wurde erst vor wenigen Jahren intensiver beschrieben (Wang et al. 2009). Dieses Phänomen wurde vorher wenig beachtet. Da die Bildung von Membranlipiden in *C. reinhardtii* gut untersucht ist (Riekhof und Benning 2009), sollte innerhalb von kurzer Zeit auch die Synthese der Neutralfette in *C. reinhardtii* in Gameten und mittels der vorliegenden Ergebnisse auch in Zygosporen analysiert werden können. Allerdings können die Zygosporen sehr wahrscheinlich deutlich größere Mengen an Neutralfetten akkumulieren als die Gameten. Grund für diese Vermutung sind Vergleiche der mikroskopischen Aufnahmen für Gameten (Wang et al. 2009) und den Untersuchungen der Zygosporen durch TEM-Aufnahmen und SBB-Färbungen (eigene Daten sowie Cavalier-Smith 1976). Zygosporen stellen somit ein sehr interessantes Modell für die Regulation der Lipidmenge dar.

Über den genauen Mechanismus der Lipidakkumulation und dessen Verbindung zur Ketocarotinoidsynthese ist in *H. pluvialis* wenig bekannt. Zwar konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die Ketocarotinoidakkumulation eng mit der Lipidakkumulation verknüpft ist. Jedoch ist z.B. nicht genau verstanden, ob die Ketocarotinoidakkumulation durch die Lipidakkumulation induziert wird oder ob dies parallel erfolgt. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Astaxanthinakkumulation eine Lipidsynthese obligat benötigt (Schoefs et al. 2001). Ob aber auch die Lipidakkumulation direkt mit der Astaxanthinsynthese in Verbindung steht, konnte bisher nicht bewiesen werden. Mittels Inhibitorversuchen konnte zwischenzeitlich belegt werden, dass ohne Ketocarotinoidsynthese eine verringerte TAG-Akkumulation erfolgte (Zhekisheva et al. 2005). Inwieweit diese beiden Prozesse biochemisch miteinander in Verbindung stehen und wie sie biochemisch geregelt werden, ist immer noch unklar.

In dem im Kapitel III.8 dargestellten Experiment zur temperaturabhängigen Ketocarotinoidakkumulation konnte außerdem gezeigt werden, dass bei 9 °C gereifte Zygosporen ihre Fähigkeit zur Akkumulation von größeren Mengen an Ketocarotinoiden rückgewinnen können, wenn sie in warme Umgebung transferiert werden. Mit Hilfe dieses Modells könnte durch die zeitliche Trennung von Lipidakkumulation und Ketocarotinoidsynthese untersucht werden, welche Gene am jeweiligen Teilschritt beteiligt sind. Diese Erkenntnis ist wichtig und kann möglicherweise nur mit einem Modellorganismus, wie ihn *C. reinhardtii* darstellt, geklärt werden. Bisher zeigen Versuche an verwandten Organismen, dass eine Lipidakkumulation

obligat für eine Ketocarotinoidakkumulation ist (Schoefs et al. 2001). Somit beinhalten alle Proteinanalysen von Zellstadien, die Ketocarotinoide bilden, sowohl Proteine, die an der Lipidsynthese, aber auch solche, die an der Ketocarotinoidsynthese beteiligt sind. Somit kann sehr wahrscheinlich nicht unterschieden werden, welche Proteine genau für welche Teilreaktion verantwortlich sind. Gerade für den biotechnologischen Aspekt wäre es aber wichtig, diese beiden Synthesewege unterscheiden zu können, um die Ketocarotinoidsynthese zu erhöhen, ohne eine unnötige Steigerung der Lipidsynthese zu induzieren. Die Lipidsynthese ist sehr energieaufwendig. Pflanzen wie z.B. Raps stellen zurzeit einen viel billigeren Neutralfettlieferanten dar als Algen (FNR 2009). Ziel ist es daher, in den algalen Organismen einen möglichst hohen Gehalt an Ketocarotinoiden bei möglichst geringer Lipidsynthese zu erzielen. Eine gewisse Menge an Lipiden wird allerdings obligat sein, da die hydrophoben Carotinoide eine Lipidmatrix für die Akkumulation benötigen. Wie hoch die Dichte an Ketocarotinoiden, frei und verestert, in den Lipidtröpfchen sein kann, ist aber noch unbekannt. Somit kann zurzeit noch keine Aussage über die minimale Menge an Lipiden während der Ketocarotinoidakkumulation getroffen werden. Diese Fragen könnten mit Hilfe dieses Modellorganismus näher erforscht werden.

Des Weiteren könnten die bei 9 °C gereiften Zygosporen Hinweise liefern, ob die Ketocarotinoide die Lipide vor einer Oxidation schützen. Wie schon im Kapitel IV.8.1 (*lor1*-Zygosporen) beschrieben, könnte der Oxidationsgrad der cytosolischen Lipidvorkommen nach (Licht-)Stressbehandlung bestimmt werden. Beim Vergleich der bei 9 °C inkubierten Zygoten mit bei 22 °C gereiften Zygosporen sollten große Unterschiede auftreten, wenn diese Hypothese zutrifft. Die Lipide der bei 9 °C inkubierten Zygosporen sollten durch den Mangel an Ketocarotinoiden nur wenig vor ROS geschützt sein. Sie sollten folglich eine deutlich höhere Schädigung aufweisen als die WT-Zygosporen, die einen hohen Ketocarotinoidgehalt besitzen.

8.3 Grenzen eines Modellsystems: Untersuchungen zur Ketocarotinoidsynthese in *C. reinhardtii* mittels heterologer Expression

Ausgehend von der in der vorliegenden Arbeit widerlegten Annahme, dass *C. reinhardtii* keine Ketocarotinoide bildet, hatten Leòn und Mitarbeiter *C. reinhardtii* mit dem BKT1-Gen aus *H. pluvialis* transformiert, um so vegetative Zellen zur Produktion von Astaxanthin zu befähigen (Leòn et al. 2007). In den resultierenden Transformanten konnten nur minimale Mengen an Ketocarotinoiden nachgewiesen werden. Interessanterweise wurden die von den Autoren erwarteten Ketocarotinoide Astaxanthin oder Canthaxanthin nicht detektiert. Stattdessen wurde 4-Ketolutein in der freien, nicht mit Fettsäuren veresterten Form nachgewiesen. Allerdings betrug seine Konzentration nur 0,75 % des Luteingehaltes. Für die geringe Ketocarotindakkumulation vermuteten Leòn und Mitarbeiter (2007), dass entweder

ein Mangel an verfügbarem Substrat vorlag, der in dem heterologen Expressionssystem begründet war. Alternativ war für die León und Kollegen denkbar, dass der Organismus *C. reinhardtii* generell unfähig zur Ketocarotinoidsynthese sei, da *C. reinhardtii* ein Gen BKT besaß, aber keine Ketocarotinoidakkumulation in vivo nachgewiesen wurde (Lohr et al. 2005). Allerdings gibt es auch noch eine weitere Möglichkeit für die geringe Anzahl an ketolierten Carotinoiden. León und Mitarbeiter (2007) untersuchten nur vegetative Zellen. Aufgrund der vorliegenden Daten kann vermutet werden, dass in *C. reinhardtii* größere Mengen der PS-Carotinoide aus dem Chloroplasten frei gesetzt werden müssen, bevor die Ketocarotinoidproduktion starten kann. Zusätzlich scheint die Lipidakkumulation eine Voraussetzung für die Ketocarotinoidsynthese zu sein. Denkbar wäre, dass über längere Zeit gelagerte Gameten dieser Transformante Ketocarotinoide akkumulieren. Dort sollte eine Lipidakkumulation und eine Degradation des Chloroplasten vorliegen.

Diese Versuche zeigen, dass auch Modellsysteme Grenzen besitzen und dass bei Verwendung eines solchen Modellsystems die besonderen Eigenschaften von Enzymen oder Zellstadien beachtet werden müssen. So scheiterte, vom jetzigen Standpunkt betrachtet, der Versuch der Bildung von Ketocarotinoiden in *C. reinhardtii* mittels heterologer Expression durch León und Mitarbeiter (2007), da die physiologischen und cytologischen Besonderheiten wie ein in vegetativen Zellen möglicherweise fehlendes Exportsystem für Carotinoide aus dem intakten Chloroplasten nicht berücksichtigt wurden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, stellen die Experimente an nativen Zygosporen von *C. reinhardtii* eine wesentlich bessere Alternative für die Untersuchung des Ketocarotinoidsyntheseweges dar, da diese Zellen bereits natürlicherweise große Mengen an Ketocarotinoiden synthetisieren.

9. Zusammenfassendes Modell zu Ketocarotinoidsynthese und Lipidakkumulation in den Zygosporen von *C. reinhardtii*

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Informationen sowie weiterer Forschungsarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe Lohr konnte die Hypothese der Ketocarotinoidakkumulation in Zygosporen von *C. reinhardtii* bewiesen werden. Mit Hilfe der zahlreichen Experimente war es nicht nur möglich, die Pigmentveränderung zu beobachten, sondern auch ein Arbeitsmodell zu erstellen, das den Umbau der reifenden Zygosporen biochemisch und zellphysiologisch beschreibt. Dieses Modell wurde von Dr. Martin Lohr graphisch umgesetzt und ist in Abbildung IV.1 dargestellt. Nachfolgend sind die wichtigsten Aspekte dieses Modells beschrieben, die Details werden in den zugehörigen Kapiteln diskutiert.

Durch Induktion der Gameten und der anschließenden Zellfusion werden genetische Programme zur Zygoten- und später zur Zygosporenentwicklung gestartet. Dazu gehören die Akkumulation von Energiereserven in Form von Stärkekörnern und Lipidtröpfchen. Des Weiteren erfolgt die Bildung einer sekundären Zellwand, die die Dauerform z.B. vor Wasserverlust schützt. Zusätzlich findet eine Reduktion des Chloroplasten und eine Synthese der Ketocarotinoide statt (Kapitel IV.1, IV.3 und IV.4).

Aufgrund der pigmentbiochemischen Untersuchungen kann vermutet werden, dass die Reduktion des Chloroplasten die Grundlage für eine Lipid- und Carotinoidfreisetzung aus dem Organell bildet. Wahrscheinlich werden zuerst die äußeren Antennen reduziert, die darin enthaltenen Carotinoide freigesetzt und, möglicherweise zusammen mit dem Membranlipiden, aus dem Chloroplasten in das Cytosol exportiert. Da in den äußeren Antennenkomplexen überwiegend Lutein vorhanden ist, wird dieses wahrscheinlich zuerst und in größerer Menge verfügbar (Pineau et al. 2001); daneben werden auch β -Carotin und andere Carotinoide freigesetzt (Kapitel IV.2). Parallel werden Energiereservestoffe wie Stärke und vor allem Lipide synthetisiert. Die Synthese der Fettsäuren erfolgt im Chloroplasten, diese werden dann aber ebenfalls ins Cytosol exportiert und dort, eventuell zusammen mit den auch exportierten Membranlipiden, für die Synthese von Neutralfetten verwendet (Kapitel IV.3 und IV.5). Hinweise für die letztgenannte Hypothese lieferten Untersuchungen, welche für eine essentielle Rolle der Membranlipide PC, PE und Galactolipide als Acyllieferanten für die Bildung von TAGs sprechen. Zum anderen können die bei der Chloroplastenreduktion frei werdenden Thylakoidmembranlipide als Speicherlipide recycelt werden (Hu et al. 2008).

Die entstehenden TAGs bilden Lipidtröpfchen. Diese sind wahrscheinlich von einer einschichtigen Membran umgeben und direkt neben ER und Golgi-Apparaten lokalisiert. Das Schlüsselenzym BKT ist möglicherweise, vergleichbar zur BKT aus *H. pluvialis*, an der

Oberfläche der Lipidtröpfchen (Grünwald et al. 2001) oder in den ERs lokalisiert (Kapitel IV.2).

Wenn genügend Lipidtröpfchen vorhanden sind, könnte die BKT an die Oberfläche der Lipidtröpfchen assoziieren und aktiv werden. Gleichzeitig sollten die aus den Chlorplasten freigesetzten Carotinoide zu den cytosolischen Lipidtröpfchen gelangen. Dort könnte dann eine Ketolierung der Pigmente erfolgen. Dabei kann in *C. reinhardtii* zum einen Lutein am β -Iononring ketoliert werden, so dass 4-Ketolutein entsteht. Für die Bildung von Canthaxanthin und Astaxanthin sind zwei Szenarien dankbar: Zum einen könnte die BKT an beiden β -Iononringen des β -Carotins Ketogruppen einführen, so dass über das Zwischenprodukt Echinenon Canthaxanthin entstehen würde. Dieses sollte im Anschluss durch eine cytosolisch lokalisierte Hydroxylase zu Astaxanthin hydroxyliert werden. Alternativ könnte Violaxanthin zu Zeaxanthin deepoxidiert werden, welches dann aus dem Chloroplasten exportiert und mittels BKT zum Astaxanthin ketoliert werden könnte. Aufgrund der quantitativen Pigmentverschiebungen während der Zygosporereifung ist letzteres Szenario plausibel. Dies würde aber auch bedeuten, dass kein Bedarf einer cytosolischen Hydroxylase besteht, da sich die Menge des β -Carotin-Abbaus in der Menge des gebildeten Canthaxanthins wiederfindet. Auch ist die Menge des gebildeten Astaxanthins geringer als die beobachtete Abnahme von Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin (Kapitel IV.2).

Hydroxylierte Ketocarotinoide werden mit zunehmender Zygotenreifung mit Fettsäuren verestert. Das zugehörige Enzym ist noch nicht bekannt. Die Veresterung fördert möglicherweise die Einlagerung der Ketocarotinoide in die Lipidtröpfchen. Die Ketocarotinoide könnten aufgrund ihres außerordentlich hohen antioxidativen Potentials die Zellen und insbesondere die Speicherlipide vor ROS schützen (Kapitel IV.5).

Die Pigmentzusammensetzung der Ketocarotinoide wird vermutlich von der Verfügbarkeit der Substrate bestimmt, da die BKT aus *C. reinhardtii* nur eine geringe Substratspezifität besitzt (Bauch 2007).

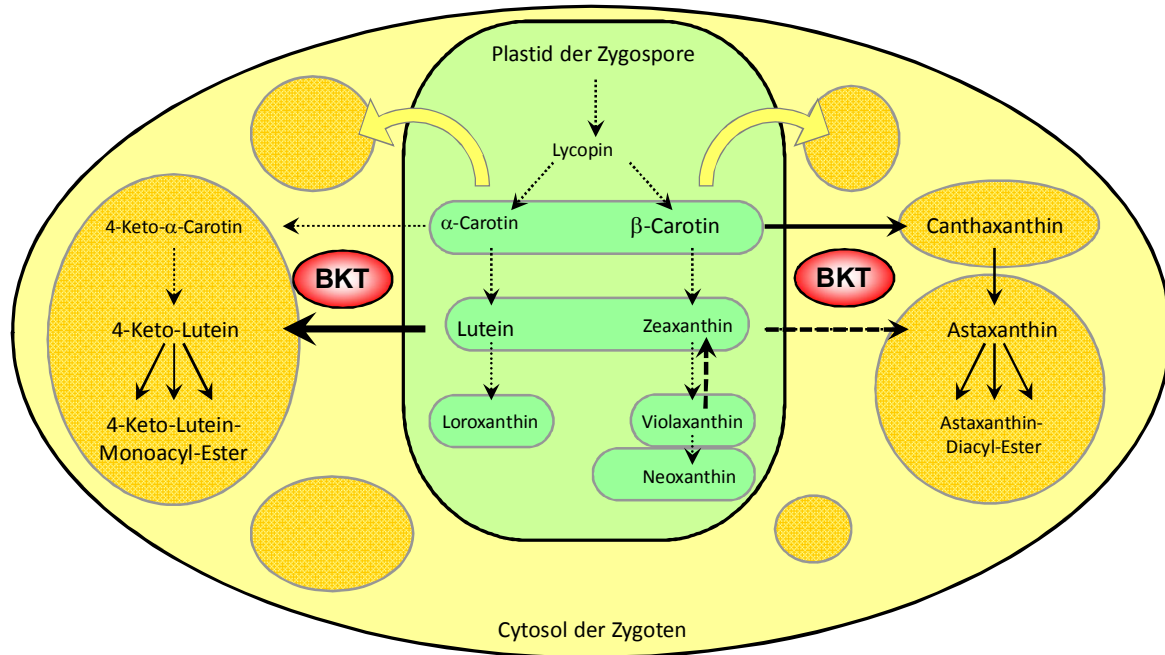


Abbildung IV.1) Arbeitsmodell zur Ketocarotinoidsynthese während der Zygosporenreife in *C. reinhardtii*.

Das hier für *C. reinhardtii* postulierte Modell unterscheidet sich damit in einigen Aspekten grundlegend von dem gut untersuchten Modell von *H. pluvialis*:

So ist bei *C. reinhardtii* wahrscheinlich keine Neusynthese der Carotinoidsubstrate notwendig. Dies spricht dafür, dass die Regulation der Ketocarotinoidbildung bei *C. reinhardtii* nicht durch die Phytoendesaturase (PDS) erfolgt. In *H. pluvialis* ist die PDS als das Enzym beschrieben worden, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Substratsynthese katalysiert (Breitenbach et al. 1996 sowie Grünwald et al. 2000). Des Weiteren wird bei *H. pluvialis* zumindest für die BKT1 eine hohe Substratspezifität vermutet (Lotan und Hirschberg 1995), während die BKT aus *C. reinhardtii* eine geringere Substratspezifität aufweist. Untersuchungen an *H. pluvialis* sprechen auch für eine wichtige Rolle der cytosolischen Hydroxylase, deren Expression in Aplanosporen deutlich hochreguliert ist (Schoefs et al. 2001). In *C. reinhardtii* ist die Erfordernis einer cytosolischen Hydroxylase aufgrund der hohen Menge an bereits hydroxyliertem Substrat fraglich.

V. Zusammenfassung

Ketocarotinoide sind in den Dauerstadien vieler Grünalgen anzutreffen und aufgrund ihres hohen antioxidativen Potentials vermutlich von großer Bedeutung für deren Überleben unter ungünstigen Umweltbedingungen. Daneben ist die Aufnahme von Ketocarotinoiden im Zuge der Nahrungskette für verschiedene Tiere lebensnotwendig. Trotz zahlreicher Untersuchungen des Biosynthesewegs der Ketocarotinoide, vorwiegend in der Grünalge *Haematococcus pluvialis*, sind viele grundlegende Aspekte der Synthese nicht verstanden. Dazu zählt neben dem genauen Reaktionsmechanismus des ketolierenden Enzyms β -Carotin-Ketolase (BKT) vor allem der noch nicht aufgeklärte Zusammenhang zwischen Lipidsynthese und Ketocarotinoidakkumulation. Nach der Entdeckung eines zur BKT aus *H. pluvialis* homologen Gens in einer EST-Datenbank des Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii* wurden im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit die als orange-rot beschriebenen Zygosporien von *C. reinhardtii* als mögliches ketocarotinoidhaltiges Zellstadium untersucht. Dabei wurden für *C. reinhardtii* erstmals Ketocarotinoide in Konzentrationen bis zu einem Femtomol pro Zelle nachgewiesen und mittels HPLC-Analytik, chemischer Derivatisierung und Massenspektrometrie zweifelsfrei identifiziert. Es wurden, in aufsteigender Quantität, drei Ketocarotinoide detektiert: Canthaxanthin, Astaxanthin und 4-Ketolutein. Letzteres wurde bisher selten in anderen ketocarotinoidakkumulierenden Organismen beschrieben und stellt, im Gegensatz zu den vom β -Carotin abgeleiteten Pigmenten Astaxanthin und Canthaxanthin, ein Pigment des α -Carotin-Zweiges dar. Astaxanthin und 4-Ketolutein wurden vor allem in Form von Pigment-Fettsäureestern nachgewiesen. Mit Hilfe von Paarungsansätzen mit der *lor1*-Mutante, die keine α -Carotinoide synthetisieren kann, und Vergleichen mit Ketocarotinoiden aus *H. pluvialis* konnte gezeigt werden, dass 4-Ketolutein nur als Monoacyl-ester in der Alge vorliegt, während Astaxanthin sowohl als Monoacyl- wie auch als Diacyl-ester anzutreffen ist.

Ketocarotinoide wurden innerhalb der ersten 14 Tage der Zygotenreife gebildet. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Zygoten dokumentierten, dass damit ein starker Umbau der Zelle einherging, der sich vor allem in der Reduktion des Chloroplasten und der Bildung von Lipidtröpfchen darstellte. Letztere nahmen bei reifen Zygosporien den größten Teil des Zelllumens ein und wurden mittels dünn-schichtchromatografischer Analysen als Neutralfette identifiziert.

Der sinkende Zellgehalt an Carotinoiden im Zuge der Zygosporienreife und Inhibitorexperimente an reifenden Zygoten mittels Norflurazon zeigten, dass für die Ketocarotinoidakkumulation keine Neusynthese von Carotinoiden nötig ist und lassen die Hypothese zu, dass *C. reinhardtii* die im Zuge der Chloroplastenreife freigesetzten Photosynthese-Carotinoide als Substrate für die Ketocarotinoidsynthese verwendet.

Physiologische Bedeutung könnte den Ketocarotinoiden vor allem beim Schutz der Speicherlipide vor Peroxidation durch reaktive Sauerstoffspezies zukommen. Diese Reservestoffe stellen die Energieversorgung während des Auskeimens der Zellen sicher. Durch den im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit dokumentierten Nachweis der Ketocarotinoidakkumulation in *C. reinhardtii* können die Ketocarotinoidsynthese und vor allem der Zusammenhang von Lipid- und Ketocarotinoidakkumulation zukünftig mit Hilfe der für diesen Modellorganismus vorliegenden umfangreichen molekulargenetischen Methoden detailliert untersucht werden.

VI Literaturverzeichnis

Aman R, Biehl J, Carle R, Conrad J, Beifuss U and Schieber A (2005): Application of HPLC coupled with DAD, APCI-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. *Food Chemistry* **92**: 753–763

Andrewes A, Phaff H and Starr M (1976): Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* **15**: 1003-1007

Anwaruzzaman M, Chin B, Li X-P, Lohr M, Martinez D, Niyogi K (2004): Genomic analysis of mutants affecting xanthophyll biosynthesis and regulation of photosynthetic light harvesting in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research* **82**: 265–276

Atkinson A W, Gunning B E S and John P C L (1972): Sporopollenin in the Cell Wall of *Chlorella* and Other Algae: Ultrastructure, Chemistry, and Incorporation of ¹⁴C-Acetate, Studied in Synchronous Cultures. *Planta* **107**: 1-32

Atteia A, van Lis R, Ramírez J and González-Halphen D (2000): *Polytomella* spp. growth on ethananol. *Eur. J. Biochem.* **267**: 2850-2858

Bar E, Rise M, Vishkautsan M and Arad S (1995): Pigment and Structural Changes in *Chlorella zofingiensis* upon Light and Nitrogen Stress. *Journal Plant Physiologie* **146**: 527-534

Baroli I, Do A D, Yamane T and Niyogi K (2003): Zeaxanthin Accumulation in the Absence of a Functional Xanthophyll Cycle Protects *Chlamydomonas reinhardtii* from Photooxidative Stress. *The Plant Cell* **15**: 992–1008

BASF Feinchemie: Technische Informationen zu Vitaminen und Farbstoffen, Informationsbroschüre, Stand 1995

Bauch M (2007): Funktionelle Charakterisierung von Carotinoidbiosyntheseenzymen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität, Mainz

Ben-Amotz A, Katz A and Avron M (1982): Accumulation of β -Carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -Carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **18**: 529-537

Ben-Amotz A, Shaish A and Avron M (1989): Mode of Action of the Massively Accumulated β -Carotene of *Dunaliella bardawil* in Protecting the Alga against Damage by Excess Irradiation. *Plant Physiol.* **91**: 1040-1043

Boussiba S, Bing W, Yuan J-P, Zarka A and Chen F (1999): Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology Letters* **21**: 601–604

- Boussiba S (2000): Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum* **108**: 111-117
- Breitenbach J, Misawa N, Kajiwara S and Sandmann G (1996): Expression in *Escherichia coli* and properties of the β -carotene ketolase from *Haematococcus pluvialis*. *FEMS Microbiology Letters* **140**: 241-246
- Breithaupt D E (2007): Modern application of xanthophylls in animal feeding - a review. *Trends in Food Science & Technology* **18**: 501-506
- Britton G, Liaaen-Jensen S and Pfander H (2004): Carotenoids Handbook. *Birkhäuser Basel*
- Britton G, Liaaen-Jensen S and Pfander H (2009), Carotenoids Handbook Volume 5: Nutrition and Health, *Birkhäuser Basel*
- Brown R M, Johnson S C and Bold H (1968): Electron and phase-contrast microscopy of sexual reproduction in *Chlamydomonas moewusii*. *J. Phycol* **4**: 100-120
- Buchecker R, Eugster C H and Weber A (1978): Absolute Konfiguration von α -Doradexanthin und von Fritschiellaxanthin, einem neuen Carotinoid aus *Fritschiella tuberosa* IYENG. *Helvetica Chimica Acta* **61** (6): 1962-1968
- Burczyk J (1987a): Biogenic relationship between ketocarotenoids and sporopollenins in green algae. *Phytochemistry* **26**: 113-119
- Burczyk J (1987b): Cell wall carotenoids in green algae which forms Sporopollenins. *Phytochemistry* **26**: 121-129
- Burschor D and Eugster C (1990): Synthese der (3S,4R,3'S,4'R)- und (3S,4S,3'S,4'S)-Crustaxanthine sowie weiterer Verbindungen mit 3,4-Dihydroxy- β -Endgruppen. *Helvetica Chimica Acta* **73**: 1002-1021
- Cain J R and Cain R K (1984): Tools to Facilitate Isolation of *Chlamydomonas* Zygospores and Recombinant Progeny. *Annals of Botany* **54**: 445-446
- Candau R, Bejarano E R, Cerdá-Olmedo E (1991): In vivo channeling of substrates in an enzyme aggregate for β -carotene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:4936-4940
- Cavalier-Smith T (1976): Electron microscopy of zygospore formation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Protoplasma* **87**: 297-315
- Cavalier-Smith T (1975): Electron and Light Microscopy of Gametogenesis and Gamete Fusion in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma* **86**: 1-18
- Choi S, Harada H, Matsuda S and Misawa N (2007): Characterization of two β -carotene ketolases, crtO and crtW, by complementation analysis in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**:1335-1341

Chunaev A.S., Mirnaya O.N., Maslov V.G. and Boschetti A (1991): Chlorophyll b and Loroxanthin-Deficient Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthetica* **25**(2): 291-301

Cunningham F and Gantt E (1998): Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Ann.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 557-583

Cunningham F and Gantt E (2007): A portfolio of plasmids for identification and analysis of carotenoid pathway enzymes: *Adonis aestivalis* as a case study. *Photosynth.Res.* **92**: 245-259

Czygan, F C (1968): Sekundärkarotinoide in Grünalgen, I. Chemie, Vorkommen und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen. *Archiv für Mikrobiologie* **61**: 81-102

Daniel P, Henley J and VanWinkle-Swift K (2007): Altered zygospor wall ultrastructure correlates with reduced abiotic stress resistance in a mutant strain of *Chlamydomonas monoica* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **43**: 112–119

Donkin P (1976): Ketocarotenoid Biosynthesis by *Haematococcus lacustris*. *Phytochemistry* **15**: 711-715

Eichenberger W (1976): Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. *Phytochemistry* **15**: 459- 463

Eichenberger W, Boschetti A and Michel H P (1986): Lipid and pigment composition of a chlorophyll b-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol. Plant* **66**: 589-594

Eichenberger W (1993): Betaine lipids in lower plants. Distribution of DGTS, DGTA and phospholipids, and the intracellular localization and site of biosynthesis of DGTS. *Plant Physiol Biochem* **31** (2): 213-221

Estévez J M, Cantero A, Reindl A, Reichler S and Leon P (2001): 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase, a Limiting Enzyme for Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *J. Biol. Chem.* **276**: 22901–22909

Evens T, Niedz R and Kirkpatrick G (2008): Temperature and irradiance impacts on the growth, pigmentation and photosystem II quantum yields of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Appl Phycol* **20**: 411–422

Farré G, Sanahuja G, Naqvi S, Bai C, Capell T, Zhu C and Christou P (2010): Travel advice on the road to carotenoids in plants. *Plant Science* **179**: 28–48

Fernandez-Gonzalez B, Sandmann G and Vioque A (1997): A New Type of Asymmetrically Acting β -Carotene Ketolase Is Required for the Synthesis of Echinenone in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **272**: 9728-9733

FNR Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2009): Biokraftstoffe - Eine vergleichende Analyse, Gülzow, Deutschland

Fraser P, Miura Y and Misawa N (1997): *In Vitro* Characterization of Astaxanthin Biosynthetic Enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* **272** (10): 6128–6135

Fraser P, Shimada H and Misawa N (1998): Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate *in vitro* assay. *Eur. J. Biochem.* **252**: 229-236

Gfeller R and Gibbs M (1984): Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **75**: 212-218

Ghysels B and Franck F (2010): Hydrogen photo-evolution upon S deprivation stepwise: an illustration of microalgal photosynthetic and metabolic flexibility and a step stone for future biotechnological methods of renewable H₂ production. *Photosynth Res* **106**: 145–154

Giroud G, Gerber A and Eichenberger W (1988): Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of Molecular Species and Intracellular Site(s) of Biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **29**(4): 587-595

Goodenough U, Armbrust E, Campbell A and Ferris P (1995): Molecular Genetics of Sexuality in *Chlamydomonas*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 21-44

Goodenough U, Lin H and Lee J-H (2007): Sex determination in *Chlamydomonas*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **18**: 350-361

Green B R and Durnford D G (1996): The Chlorohyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 685–714

Grewe C (2009): Untersuchungen zur Astaxanthin-Biosynthese in den Grünalgen *Scenedesmus* sp. und *Haematococcus pluvialis*. Dissertation, *Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*

Grief C, Neill M and Shaw P (1987): The zygote cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii*: a structural, chemical and immunological approach. *Planta* **170**: 433-445

Grossman A, Lohr M and Im C-S (2004): *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annu. Rev. Genet* **38**:119–173

Grünewald K, Hagen C and Braune W (1997): Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris*. *Eur. J. Phycol.* **32**: 387-392.

Grünewald K, Eckert M, Hirschberg J and Hagen C (2000): Phytoene Desaturase Is Localized Exclusively in the Chloroplast and Up-Regulated at the mRNA Level during Accumulation of Secondary Carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae). *Plant Physiology* **122**: 1261–1268

Grünewald K and Hagen C (2001): β -carotene is the intermediate exported from the chloroplast during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology* **13**: 89–93

Grünewald K, Hirschberg J and Hagen C (2001): Ketocarotenoid Biosynthesis outside of Plastid in the Unicellular Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biological Chemistry* **276** (8): 6023-6029

Gruszecki W I and Strzayk K (2005): Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta* **1740**: 108-115

Hagen C, Braune W, Birckner E and Nüske J (1993): Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Girod) Rostafinski (Volvocales) I. The accumulation period as an active metabolic process. *New Phycology* **125**: 625-633

Hagen C, Braune W and Björn L (1994): Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Volvocales), III Action as a “Sunshade”. *Journal of Phycology* **30**: 241-248

Hagen C, Siegmund S and Braune W (2002): Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *Eur. J. Phycol.* **37**: 217-226

Hall T A (1999): BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98

Harker M, Tsavalos A J and Young A J (1995): Use of response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology* **7**: 399-406

Harris E (2001): *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 363-406

Harris E (2009): The *Chlamydomonas* Source Book Volume I: Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use. *Elsevier Academic Press*

Huang A.H.C (1992): Oil Bodies and Oleosins in Seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 177-200

Huang J, Wang Y, Sandmann G and Chen F (2006a): Isolation and characterization of a carotenoid oxygenase gene from *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl Microbiol Biotechnol.* **71**: 473–479

Huang J, Chen F and Sandmann G (2006b): Stress-related differential expression of multiple β -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology* **122**: 176–185

Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M and Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* **54**: 621–639

Inoué S (1986): Video Microscopy. *Plenum Press New York*

Jayaraj J, Devlin R and Punja Z (2008): Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Res* **17**:489-501

Jiang X and Stern D (2009), published on-line, Journal of Visualized Experiments, August 12, 2009; PMID: 19684568

Jin E, Lee C and Polle J (2006): Secondary Carotenoid Accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, Regulation, and Biotechnology. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**(6): 821–831

Johnson E and An G-H (1991): Astaxanthin from Microbial Sources. *Critical Reviews in Biotechnology* **11**(4): 297-326

Kajiwara S, Kakizono T, Saito T, Kondo K, Ohtani T, Nishio N, Nagai S and Misawa N (1995): Isolation and functional identification of a novel cDNA for Astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli*. *Plant Molecular Biology* **29**: 343-352

Kalendar R, Lee D, Schulman AH (2009): FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics* **3**(1): 1-14.

Khachik F, Beecher G R, Lusby W R and Goli B B (1991): Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure&Appl. Chem.* **63**(1): 71-80

Kim J, Smith J J, Tian L and DellaPenna D (2009): The Evolution and Function of Carotenoid Hydroxylases in Arabidopsis, *Plant Cell Physiol.* **50**(3): 463–479

Klein U and Betz A (1978): Fermentative Metabolism of Hydrogen-evolving *Chlamydomonas moewusii*. *Plant Physiol.* **61**: 953-956

Kobayashi M, Kakizono T and Nagai S (1991): Astaxanthin Production by a Green Alga *Haematococcus pluvialis* Accompanied with Morphological Changes in Acetate Media. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **71**(5): 335-339

Kobayashi M and Sakamoto Y (1999): Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters* **21**: 265–269

Kobayashi M (2003): Astaxanthin Biosynthesis Enhanced by Reactive Oxygen Species in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **8**: 322-330

Köhler J (2008): Untersuchungen zur Ketocarotinoid-Biosynthese in *Chlamydomonas reinhardtii* und anderen Grünalgen. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität, Mainz

Kubo T, Abe J, Oyamada T, Ohnishi M, Fukuzawa H, Matsuda Y and Saito T (2008): Characterization of novel genes induced by sexual adhesion and gamete fusion and of their transcriptional regulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* **49**(6): 981–993

Lee J-H, Lin H, Joo S and Goodenough U (2008): Early Sexual Origins of Homeoprotein Heterodimerization and Evolution of the Plant KNOX/BELL Family. *The Cell* **133**: 829–840

León R., Couso I and Fernández E (2007): Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthesis in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology* **130**: 143-152

Lemoine Y and Schoefs B (2010): Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynth Res.* **106**:155–177

Lewin Y C (1950): Obligate Autotrophy in *Chlamydomonas moewusii* Gerloff. *Science* **112**: 652-653

Li Y, Sommerfeld M, Chen F and Hu Q (2010a): Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Appl Phycol.* **22**: 253–263

Li Y, Han D, Hu G, Sommerfeld M and Hu Q (2010b): Inhibition of Starch Synthesis Results in Overproduction of Lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering* **107**: 258-268

Lin H, Kwan A and Dutcher S (2010): Synthesizing and Salvaging NAD⁺: Lessons Learned from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plos* **6** (9): e1001105

Linden H (1999): Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. *Biochim Biophys Acta* **1446**: 203–212

Lohr M (2000): Beziehungen zwischen den Xanthophyllzyklen und der Biosynthese von Lichtsammelxanthophyllen in Chlorophyll a/c-haltigen Algen. Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Lohr M, Im C-S and Grossman A (2005): Genome-Based Examination of Chlorophyll and Carotenoid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **138**: 490–515

Lohr M (2009): Carotenoids. In: The *Chlamydomonas* Sourcebook, Volume 2: Organellar and Metabolic Process, *Academic Press*, 799-817

Lotan T and Hirschberg J (1995): Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4-oxygenase, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Letters* **364**: 125-128

Lottspeich F and Zorbas H (1998): Bioanalytik, Lehrbuch, Spektrum Akademischer Verlag, 1. Auflage

Margalith P Z (1999): Production of ketocarotenoids by microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 431-438

Martin N and Goodenough U (1975): Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*: I. Production of Gametes and Their Fine Structure. *Journal of Cellbiologie* **67**: 587-605

Merchant S, Prochnik S, Vallon O, Harris E, Karpowicz S, Witman G, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin L, Maréchal-Drouard L, Marshall W, Qu L, Nelson D, Sanderfoot A, Spalding M, Kapitonov V, Ren O, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas S, Grimwood J, Schmutz J, Chlamydomonas Annotation Team, JGI Annotation Team, Grigoriev I, Rokhsar D and Grossman A (2007): The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* **318**: 245-251

Miao F, Lu D, Li Y and Zeng M (2006): Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **352**: 176–181

Miao F, Lu D, Zhang C, Zuo J, Geng Y, Hu H and Li Y (2008): The synthesis of astaxanthin esters, independent of the formation of cysts, highly correlates with the synthesis of fatty acids in *Haematococcus pluvialis*. *Science in China Series C: Life Science* **51**(12): 1094-1100

Millikin B and Weiss R (1984): Distribution of Concanavalin A Binding Carbohydrates during Mating in *Chlamydomonas*. *Journal of Cell Science* **66**: 223-239

Moellering E.R and Benning C (2010): RNA Interference Silencing of a Major Lipid Droplet Protein Affects Lipid Droplet Size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eucaryotic Cell* **9** (1): 97-106

Montsant A, Zarka A and Boussiba S (2001): Presence of a Nonhydrolyzable Biopolymer in the Cell Wall of Vegetative Cells and Astaxanthin-Rich Cysts of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Mar. Biotechnol.* **3**: 515–521

Mühlhardt C (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. *Spektrum Akademischer Verlag* Heidelberg, 6. Auflage

Pineau B, Gérard-Hirne C and Selve C (2001): Carotenoid binding to photosystems I and II of *Chlamydomonas reinhardtii* cells grown under weak light or exposed to intense light. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 73–85

Rabbani S, Beyer P, v. Lintig J, Huguene P and Kleinig H (1998): Induced β -Carotene Synthesis Driven by Triacylglycerol Deposition in the Unicellular Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **116**: 1239–1248

- Ranga R, Sarada A R, Baskaran V and Ravishankar G A (2009): Identification of Carotenoids from Green Alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC-MS (APCI) and Their Antioxidant Properties. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19** (11): 1333–1341
- Remias D, Lütz-Meindl U and Lütz C (2005): Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *Eur. J. Phycol.* **40**(3): 259-268
- Remias D, Karsten U, Lütz C and Leya T (2010): Physiological and morphological processes in the Alpine snow alga *Chloromonas nivalis* (Chlorophyceae) during cyst formation. *Protoplasma* **243**: 73-86
- Richter G (1998): Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. Lehrbuch, *Thieme Verlag* 6. Auflage
- Riekhof W and Benning C (2009): Glycerolipid Biosynthesis. In: *Chlamydomonas Source Book. Volume 2 Organellar and Metabolic Processes*, *Academic Press, Elsevier*
- Rise M, Cohen E, Vishkautsan M, Cojocar M, Gottlieb H and Arad S (1994): Accumulation of Secondary Carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *Journal Plant Physiology* **144**: 287-292
- Rodríguez-Concepción M (2010): Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **504**: 118–122
- Roughan P G and Slack C R (1982): Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 97-132
- Rozen S and Skaletsky H J (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. *Humana Press*: 365-386
- Sager R and Granick S (1953): Nutritional Studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **56**(5): 831-838
- Sager R and Granick S (1954): Nutritional Control of Sexuality in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of General Physiology* **37** (6): 729-742
- Sambrook and Russell (2001): *Molecular Cloning*. *CSHL Press*
- Sandmann G, Linden H and Böger P (1989): Enzyme-Kinetic Studies on the Interaction of Norflurazon with Phytoen Desaturase. *Zeitschrift für Naturforschung* **44c**: 787-790
- Sandmann G (2002): Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. *Physiol. Plant* **116**: 431-440
- Sanpedro L and Kula M-R (1998): Studies of Astaxanthin Biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Effect of Inhibitors and Low Temperature. *Yeast* **14**: 1007–1016

Santos M und Mesquita J (1984): Ultrastructural Study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis. *Cytologia* **49**: 215-228

Schlegel H (1992): Allgemeine Mikrobiologie. Lehrbuch. *Thieme Verlag*.

Schlösser U.G. (1994): SAG – Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen. Catalogue of strains 1994. *Bot. Acta* **107**:113-186

Schmidt G (2007): Untersuchungen zur Biosynthese von Ketocarotinoiden in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, Staatsexamensarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Schmidt M, Geßner G, Luff M, Heiland I, Wagner V, Kaminski M, Geimer S, Eitzinger N, Reißerweber T, Voytsekh O, Fiedler M, Mittag M and Kreimer G (2006): Proteomic Analysis of the Eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* Provides Novel Insights into Its Components and Tactic Movements. *The Plant Cell* **18**: 1908–1930

Schoefs B, Rmiki N, Rachadi J and Lemoine Y (2001): Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. *FEBS Letters* **500**: 125-128

Schopfer P und Brennicke A (2006): Pflanzenphysiologie. Lehrbuch, *Spektrum Akademischer Verlag München*, 6. Auflage

Schwender J, Gemünden C and Lichtenthaler H (2001): Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *Planta* **212**:416-423

Siaut M, Cuiné S, Cagnon C, Fessler B, Nguyen M, Carrier P, Beyly A, Beisson F, Triantaphylidès C, Li-Beisson Y and Peltier G (2011): Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology* **11**:7

Siloto R, Findlay K, Lopez-Villalobos A, Yeung E.C, Nykiforuk C.L and Moloney M (2006): The Accumulation of Oleosins Determines the Size of Seed Oilbodies in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**: 1961–1974

Skorupinska-Tudek K, Poznanski J, Wojcik J, Bienkowski T, Szostkiewicz I, Zelman-Femiak M, Bajda A, Chojnacki T, Olszowska O, Grunler J, Meyer O, Rohmer M, Danikiewicz W and Swiezewska E (2008): Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Dolichols in Plants. *The Journal of Biological Chemistry* **283**(30): 21024-21035

Socaciu C, Jessel R and Diehl H (2000): Carotenoid incorporation into microsomes: yields, stability and membrane dynamics. *Spectrochimica Acta Part A* **56**: 2799–2809

Sprey B (1970): Die Lokalisierung von Sekundärcarotinoiden von *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille. *Protoplasma* **71**: 235-250

Stålberg K, Lindgren O, Ek B and Höglund A-S (2003): Synthesis of ketocarotenoids in the seed of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **36**: 771-779

Sun T-H, Liu C-Q, Hui Y-Y, Wu W-K, Zhou Z-G and Lu S (2010): Coordinated Regulation of Gene Expression for Carotenoid Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Integrative Plant Biology* **52** (10): 868–878

Suzuki L, Woessner J, Uchida H, Kuroiwa H, Yuasa Y, Waffenschmidt S, Goodenough U and Kuroiwa T (2000): A Zygote-Specific Protein with Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Domains and Lectin-like Domains involved in the Assembly of the Cell Wall of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **36**: 571-583

Suzuki L and Johnson C H (2002): Photoperiodic Control of Germination in the Unicell *Chlamydomonas*. *Naturwissenschaften* **89**: 214-220

Tan C, Zhao F, Su Z, Liang C and Qin S (2007): Expression of β -carotene hydroxylase gene (crtR-B) from the green alga *Haematococcus pluvialis* in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol* **19**:347–355

Van den Hoek C, Mann D G and Jahns H M (1995): Algae – An Introduction to phycology. Lehrbuch, *Cambridge University Press*

Van Hees P, Jones D, Jentschke G and Godbold D (2005): Organic acid concentrations in soil solution: effects of young coniferous trees and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 771–776

Van Winkle-Swift K (1977): Maturation of Algal Zygotes: Alternative Experimental Approaches for *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Journal of Phycologie* **13**: 225-231

Van Winkle-Swift K and Rickoll W L (1997): The Zygosporangium Wall of *Chlamydomonas monoica* (Chlorophyceae): Morphogenesis and Evidence for the Presence of Sporopollenin. *J. Phycol.* **33**: 655-665

Vechtel B, Eichenberger W and Ruppel H G (1992): Lipid Bodies in *Eremosphaera viridis* De Bary (Chlorophyceae). *Plant Cell Physiol.* **33** (1): 41-48

Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Kamath B, Sarada R and Ravishankar G (2007): Differential expression of carotenogenic genes and associated changes in pigment profile during regeneration of *Haematococcus pluvialis* cysts. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**: 879–887

Wang S-B, Hu Q, Sommerfeld M and Chen F (2004): Cell wall proteomics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Proteomics* **4**: 692-708

Wang Z T, Ullrich N, Joo S, Waffenschmidt S and Goodenough U (2009): Algal Lipid Bodies: Stress Induction, Purification and Biochemical Characterization in Wild-type and Starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eucaryotic Cell* **8**(12): 1856–1868

Weber A (1975): Chlorophylle und Carotinoide der Chaetophorineae (Chlorophyceae; Ulotrichales) 2. Der Einfluss unterschiedlicher Stickstoffkonzentrationen auf die Pigmentgarnitur und die Morphogenese der Grünalge *Fritschiella tuberosa* Iyengar. *Arch. Microbiol.* **102**: 45-52

Wegener D, Treier U and Beck C (1989): Procedures for the Generation of Mature *Chlamydomonas reinhardtii* Zygotes for Molecular and Biochemical Analyses. *Plant Physiology* **90**: 521-151

Wegner D and Beck C F (1991): Identification of novel genes specifically expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* zygotes. *Plant Molecular Biology* **16**: 937-946

Wei M, Sivadas P, Owen H, Mitchell D and Yang P (2010): *Chlamydomonas* Mutants Display Reversible Deficiencies in Flagellar Beating and Axonemal Assembly. *Cytoskeleton* **67**: 71–80

Welsch R, Arango J, Bär C, Salazar B, Al-Babili S, Beltrán J, Chavarriaga P, Ceballos H, Tohme J and Beyer P (2010): Provitamin A Accumulation in Cassava (*Manihot esculenta*) Roots Driven by a Single Nucleotide Polymorphism in a Phytoene Synthase Gene. *The Plant Cell* **22**: 3348-3356

Werner R and Mergenhagen D (1998): Mating Type Determination of *Chlamydomonas reinhardtii* by PCR. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 295-299

Yuan J-P and Chen F (1997): Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnology Techniques* **11** (7): 455–459

Yuan J-P and Chen F (1998): Chromatographic Separation and Purification of trans-Astaxanthin from the Extracts of *Haematococcus pluvialis*. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 3371-3375

Zechmeister L (1962): *cis-trans* Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes. Springer-Verlag

Zhekisheva M, Zarka A, Khozin-Goldberg I, Cohen Z and Boussiba S (2005): Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **41**: 819–826

Zhu C, Bai C, Sanahuja G, Yuan D, Farré G, Naqvi S, Shi L, Capell T and Christou P (2010): The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **504**: 132–141

ANHANG 1: Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
Anthera	Antheraxanthin
Arg	Arginin
ASC	Asta Scan Chrom (HPLC-Methode)
Asta	Astaxanthin
Ax	Astaxanthin
BKT	β -Carotin-Ketolase
bp	Basenpaare
cc	Präfix für alle Algenstämme der Chlamydomonas Research Center Sammlung
°C	Grad Celcius
CAO	Chlorophyllid-A-Oxygenase
α -Car	α -Carotin
β -Car	β -Carotin
cDNA	complementary DNA
Chl	Chlorophyll
CHYB	β -Carotin-Hydroxylase
cM	Centimorgan
Cx	Canthaxanthin
d	Tage
dH ₂ O	einfach entionisiertes Wasser
ddH ₂ O	zweifach entionisiertes Wasser
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
DGTS	Diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserin
DIK	Differenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie
DNA	Deoxyribunukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum

ANHANG 1: Abkürzungsverzeichnis

EZY	Early zygote specific gene (frühes Zygoten spezifisches Gen)
GF	Glasfaserfilter
gRNA	gesamt RNA
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
LM	Lichtmikroskop
Loro	Loroxanthin
Lut	Lutein
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
min	Minuten
MIN	Minimalmedium
MIN-N	Minimalmedium ohne Stickstoffquelle
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimol pro Liter
µM	mikromol pro Liter
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometer
Neo	Neoxanthin
Nfl	Norflurazon
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribunukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Rotations per Minute (Umdrehungen pro Minute)

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	PCR mit vorangegangener reversen Transkription
SBB	Sudanschwarz B (Farbstoff)
s	Sekunde
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	Tris-Acetat-Phosphat-Medium
TAP-N	TAP-Medium ohne Stickstoffquelle
TEM	Transmission-Elektronen-Mikroskopie
UTR	Untranslatierter Bereich
UZ	Ultrazentrifugation
Vio	Violaxanthin
VAZ	Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin
Zea	Zeaxanthin
ZymC	Zygotenspezifisches Gen C
ZZ	Zellzahl

ANHANG 2: Methoden

2.1. Verwendete Medien für die Anzucht von *C. reinhardtii*

2.1.1. TAP-Medium

TAP-Medium

2,42 g Tris in H₂O anlösen

1 ml Phosphatpuffer

1 ml Trace Metal Lösung

1 ml MgSO₄-Lösung (1M)

25 ml Salzlösung (je nach Bedarf mit oder ohne Stickstoffquelle)

pH mit Eisessig auf 7,2 einstellen

auf 1 l auffüllen

Wenn Arginin zugesetzt werden soll, dann nach dem Autoklavieren und erst bei einer Temperatur von ca 50 °C 50 mg/l Lösung zugeben. Die Argininlösung wird daher 50 mg/ml konzentriert angesetzt (steril filtriert). Dann können immer 100 µl auf 100 ml TAP-Medium gegeben werden.

Phosphatpuffer

10,8 g K₂HPO₄

5,6 g KH₂PO₄

Auf 100 ml auffüllen!

MgSO₄-Lösung (1M)

24,64 g MgSO₄ x 2 H₂O

Auf 100 ml auffüllen!

Salzlösung mit Stickstoffquelle

6,4 g NH₄Cl

1,48 g MgCl₂ x 6 H₂O

1,04 g CaCl₂ x 2 H₂O

Auf 400 ml auffüllen!

Salzlösung ohne Stickstoffquelle zur Induktion der Gametenbildung

1,48 g MgCl₂ x 6 H₂O

1,04 g CaCl₂ x 2 H₂O

Auf 400 ml auffüllen!

Am besten setzt man immer 4 Liter TAP in einem 5-Liter-Becherglas (aus Kunststoff) an. Dazu die oben genannten Lösungen bis 1,5 Liter mit dH₂O auffüllen, dann den pH-Wert einstellen. Im Anschluss diese Lösung in einen 2 Liter-Messzylinder überführen, auf 2 Liter auffüllen. Die Lösung dann zurück in den 5-Liter-Becher schütten. Nochmals 2 Liter dH₂O mit dem Zylinder abmessen und in den 5-Liter-Becher schütten. Nochmals gut rühren, in Schraubflaschen abfüllen und autoklavieren.

Huttler's Trace Metal-Solution :

1. 10 g EDTA in 50 ml ddH₂O lösen. Dabei erwärmen.
2. In einem zweiten Becherglas werden die folgenden Reagenzien nacheinander und genau in der Reihenfolge gelöst. Das Endvolumen dieser Lösung sollte 110 ml betragen. (Am besten legt man rund 50 ml ddH₂O vor und spült dann immer die Wägeschälchen mit den restlichen 60 ml ddH₂O aus). Die Lösung muss auf rund 100 °C hoch erhitzt werden (also alles auf der Heizplatte zusammengeben).
 - a. 2,28 g BO₃H₃
 - b. 4,4 g ZnSO₄ x 7 H₂O
 - c. 1,012 g MnCl₂ x 4 H₂O
 - d. 1 g FeSO₄ x 7 H₂O
 - e. 0,323 g CoCl₂ x 6 H₂O
 - f. 0,314 g CuSO₄ x 5 H₂O
 - g. 0,22 g Mo₇O₂₄(NH₄)₆ x 4 H₂O (Ammoniummolybdat)
3. Die zwei Lösungen zusammen schütten. Die Lösungen sollten dann lt. Protokoll blaugrün werden, wurden bisher aber immer dunkelgrün, da der pH-Wert bei etwa 1 liegt.
4. Nochmals auf 100 °C erhitzen und dann langsam abkühlen lassen. Dabei darf die Temperatur aber nicht unter 80-90 °C fallen.
5. pH-Wert einstellen mit ca. 16 ml 20%iger KOH. Bis zum Erreichen des gewünschten Wertes von 6,5 bis 6,8 darf die Temperatur nicht unter 70 °C fallen. Ab einem pH-Wert von etwa 6 wird die Lösung orange-braun. Wenn man nun die Lösung sedimentieren lässt, entsteht ein rostbrauner Niederschlag und darüber eine grünliche Lösung. Das Sediment nochmals aufschütteln und die orangefarbene Lösung auf 200 ml auffüllen und in einen 500 ml-Erlenmeyerkolben überführen. Mit einem Stopfen versehen und dann 14 Tage in den Kühlraum stellen. In dieser Zeit verfärbt sich die Lösung lila. Dies geschieht aber nur, wenn das rostfarbene Sediment nicht vorher abfiltriert wird.
6. Nach den zwei Wochen die Lösung mittels Wasserstrahlpumpe über drei Lagen Whatman Filter Papier (oder Schleicher und Schüll Filter für Trichter) abfiltrieren. Das Ganze so lange wiederholen, bis kein rostfarbenedes Sediment mehr im Filter verbleibt.
7. Die Lösung in einer dunklen Flasche im Kühlschrank aufbewahren.

2.1.2. Minimalmedium

Minimalmedium

100 ml modifizierte Beijerinck's Solution
 100 ml Phosphatpuffer
 1 ml Spurenelementlösung (Huttner, identisch zu TAP)
 800 ml Wasser

Modifizierte Beijerinck's Solution

1,5 g NH_4NO_3 (für MIN-N-Medium nicht zugeben)
 0,2 g K_2HPO_4
 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
 0,1 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 1000 ml dest. H_2O

Phosphatpuffer

7,17 g K_2HPO_4
 3,63 g KH_2PO_4
 1000 ml H_2O

Ggf. können die Substanzen der modifizierten Beijerinck's Solution als 10 fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt werden und dann gemischt werden. Dies ermöglicht ein einfaches Ansetzen des Mediums mit und ohne Stickstoffquelle.

2.2. Verwendete Medien für die Anzucht weitere Algen

2.2.1. Basalmedium

für die Anzucht von *C. moewusii*

	Stammlösung (g/100 ml)	Eingesetzte Lösung (in ml) für 1 Liter Nährmedium
KNO_3	1	20
K_2HPO_4	0,1	20
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1	20
Erddekot		30
Spurenelementlösung		5

Erddekot:

Gartenerde wurde in einen 6 Liter-Behälter befüllt und so lange ddH_2O zugegeben, bis es ca. 5 cm über der Erde stand. Anschließend wurde das Gemisch für eine Stunde im Autoklaven sterilisiert, 24 Stunden abgekühlt und anschließend noch einmal für eine Stunde sterilisiert. Der Überstand wurde abgenommen und anschließend durch Zentrifugation von Schwebstoffen abgetrennt. Diese Lösung wurde aliquotiert und erneut mittels Autoklav sterilisiert oder bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Spurenelementelösung:

Lösung 1:

	Stammlösung (g/100 ml)	Eingesetzte Lösung (in ml)
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1	1
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	0,1	2
H ₃ BO ₄	0,2	5
Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	0,02	5
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,02	5
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,0005	1
ddH ₂ O		881

Lösung 2:

	Zugabe (in g)
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,7
EDTA	0,8
ddH ₂ O	100

Beide Lösungen wurden separat autoklaviert und nach dem Abkühlen vereint.

2.2.2. Desmidiaceenmedium

für die Anzucht von *H. pluvialis*

	Stammlösung (g/100 ml)	Eingesetzte Lösung (in ml) für 1 Liter Nährmedium
KNO ₃	1	10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,2	5
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1	10
CaSO ₄	Gesättigte Lösung	10
Erddekot (Siehe Basalmedium)		20
Torfextrakt (In Anlehnung an Erddekot)		10
Spurenelementelösung (Siehe Basalmedium)		5

2.3. Laborprotokoll zur Herstellung von Zygosporen von *C. reinhardtii*

- Ca. fünf Tage vor dem gewünschten Paarungstermin einen 500 ml-Kolben, der 200 ml TAP-Medium mit Stickstoffquelle enthält, mit einer Plattenkultur animpfen (einmal mit der Impföse über eine mind. 1 Woche alten Platte streichen). Beim Animpfen aus einer Flüssigkultur ist es häufiger vorgekommen, dass die Zellen wenig mobil waren.
- Anzucht bei 18 °C oder bis zu 30 °C als Schüttelkultur im Tag-Nacht-Rhythmus (16 h/8 h).
- Nach vier Tagen sollte die Zellzahl mindestens bei etwa $4\text{-}5 \times 10^6$ Zellen pro ml liegen. Für die Zellzahlbestimmung versetzt man die Zellen mit 2-3 Tropfen Lugolscher Lösung.
- Die Zellkultur bei 2000 rpm, 10 min, bei 4 °C abzentrifugieren (autoklavierte 500 ml-Schraubgefäße), Beckman (Labor AG Paulsen)
- Pellet in 200 ml TAP ohne Stickstoffquelle (TAP-N) vorsichtig resuspendieren, Inkubation sowohl bei 18 °C als auch bei 22 °C möglich, sowohl als Standkultur wie auch Schüttelkultur (120 rpm). Die Gametenbildung erfolgt unter Dauerlicht, aber auch mit einem Tag-Nach-Rhythmus, wenn vor der Paarung eine mindestens zweistündige Inkubation im Licht stattfindet.
- Am nächsten Tag Zellzahl bestimmen und unter dem Mikroskop eine Paarung der Stämme überprüfen. Ungepaarte Algen schwimmen schnell und einzeln durcheinander. Bei einer Paarung bilden sich Zellgruppen und einige Zellen verschmelzen (Knubbelbildung an verschiedenen Zellen). Z.T. sieht man große Zellen, die sich sehr schnell um ihre eigene Achse drehen.
- Zellen im 500 ml-Schraubgefäß abzentrifugieren (bei 2000 rpm, für 10 min, 4 °C, Beckman) und Suspension so in TAP -N lösen, dass die Zellzahl der beiden Stämme etwa gleich ist. Am besten eignen sich beim Wildtyp Zellzahlen von 1×10^8 . Man sollte aber wenn möglich 5 ml Lösungsvolumen nicht unterschreiten. Wenn die Zellen unterschiedlich stark mobil sind, sollte man dies in die Verdünnung mit einberechnen (wenn z.B. die Zellzahl der beiden Kulturen gleich ist, bei einer Kultur aber nur 2/3 der Zellen mobil sind, dann sollte man diese Kultur um ein Drittel höher konzentrieren. Bei immobilen Zellen besteht die Gefahr, dass sie keine Geißeln ausgebildet haben. Aber nur über die Geißeln findet die Kontaktaufnahme der paarenden Zellen statt).
- Jeweils 600 µl der beiden Lösungen zusammen in einem 2 ml-Epi mischen und für 2 Stunden ins Dauerlicht bei etwa 60 µE und ohne Schütteln stellen. Alternativ einen großen Ansatz in einem 50 ml-Falcontube mischen. Wichtig ist, dass die Gefäße nur max zu 2/3 gefüllt sind so dass die Zellen noch mit Luft versorgt sind.
- Falls man eine Pellicula erhalten möchte, kann man die Zellen über Nacht paaren lassen.
- Ca. 1,2 ml Paarungssuspension auf einer großen (14 cm Durchmesser) TAP-N-Platte ausplattieren, 0,8 ml auf einer kleinen (9,2 cm Durchmesser). Dazu die Kultur mit dem Drygalskispatel grob verstreichen und dann bei geöffneter Platte unter der Sterilbank für etwa 30 min antrocknen lassen.
- 24 Stunden ins Licht stellen (Dauerlicht, 60 µmol Photonen pro m²s, 22 °C).
- Am nächsten Tag in Alufolie schlagen und dunkel stellen für ca. 14 Tage. Dann sollte sich die Platte orange verfärbt haben.
- Möglichst die Platten in der Zwischenzeit nicht aus der Alufolie nehmen und keinem Licht aussetzen.

2.4. Laborprotokoll zur Paarung von *C. moewusii*

- Stämme 1.98 und 2.98 auf Basalmedium in Petrischalen kultivieren, aufrecht stellen (wie *Chlamydomonas reinhardtii* Zygoten). Kulturbedingungen 18 °C, Tag-Nacht-Rhythmus von 16/8 Stunden
- Nach ca. drei Wochen sind die Algen relativ dicht gewachsen (hellgrüne Kultur)
- Petrischalen jeweils mit 4 ml destilliertem Wasser (von AG Wernicke, kein Austauschwasser) überschichten, ca. 3 Stunden bei 70-80 $\mu\text{mol Photonen pro m}^2\text{s}$ belichten bei 22 °C
- Stämme sind dann zum Teil mobil
- Algen mit einer sterilen Pasteurpipette absaugen und in eine sterile Petrischale (ohne Medium!) überführen. Dabei beide Stämme vereinen
- Platten sind dann zum Teil noch recht grün, daher ist es möglich, die Platten nachmals mit Medium zu spülen (ca. 4 ml) und in einer weiteren sterilen Petrischale zu vereinen
- Petrischalen ca. 1 Stunde ins Licht stellen, 22 °C
- Danach jeweils die Hälfte der Flüssigkeit auf eine Minimalmediumplatte geben, antrocknen lassen
- 36 Stunden (ggf. 48 Stunden) ins Dauerlicht stellen, 22 °C
- Danach dunkel stellen bei 22 °C
- Nach ca. 1 Woche sind Zygoten sichtbar, da sie kreisrund und etwas in den Agar eingesunken vorliegen, die Gameten/vegetativen Zellen sind deutlich oval/länglich/fast stäbchenförmig.

2.5. Tetradenanalyse

2.5.1. Laborprotokoll für die Tetradenanalyse

- Benötigte Hilfsmittel:
 - Mikroskop unter der Sterilbank, am besten mit Ethanol abwischen (Scharfstellrädchen nicht vergessen) und mindesten 30 min unter der Sterilbank abblasen lassen
 - Wolframdraht (0,15 mm), zu einem Haken gebogen, in einem Impfösenhalter (kurz), der in der Flamme sterilisiert werden kann – dazu aber immer nur kurz aufglühen lassen, weil der Draht recht schnell verglüht
 - Zellschaber, in Ethanol desinfiziert
 - Steriles Skalpell
 - Frische TAP+Amp-Agarplatten, in die auf der Unterseite mit dem Skalpell ein Gitter eingeritzt wurde
- Zygoten sollten ca. 14 Tage alt sein.
- Am Morgen oder maximal 1 Tag vorher frische TAP+Amp-Platten herstellen, mit 1,5 % - 2 % Agar
- Ungepaarte Gameten mit einem Zellschaber entfernen – es reichen 1-2 Bahnen
- Unter dem Mikroskop mit dem Wolframdraht eine kleine Menge Zygoten vom Agar ablösen und sammeln (Alternativ: mit einem kugelförmigen Glastool).
- Diese Zygotenansammlung mit einem Skalpell pyramidenförmig ausschneiden, d.h. die Oberfläche mit Zygoten ist dann die größte Oberfläche der Pyramide
- Mit der Skalpellspitze die Pyramide lösen und mit der großen Oberfläche auf die vorbereitete Agarplatte ca. 1 cm oberhalb der Startlinie aufsetzen und etwas verstreichen.
- Eine kleine Menge von Zygoten mit dem Wolframdraht sammeln, zur Startlinie bringen und entlang der Startlinie verteilen. Am besten platziert man an den Kreuzungspunkten immer eine isolierte Zygote und zwischen den Kreuzungspunkten mehrer vereinzelte Zygoten. So hat man Alternativen, falls die gut positionierten Zygoten nicht auskeimen.
- Die Platten mit der Agarseite nach oben im Dauerlicht lagern, bei ca. 30-50 $\mu\text{mol Photonen/m}^2\text{s}$ für 36-48 Stunden.
- Danach die ausgekeimten Zygoten/Tetraden entlang der senkrechten Linien vereinzeln und an jedem Kreuzungspunkt eine Zelle platzieren. Wichtig ist, dass die Zellen in einer Art Feuchtigkeitspfütze verschoben werden, so entsteht der geringste Widerstand und der höchste Wachstumserfolg der vegetativen Zellen.
- Meistens sieht man die Zygotenhülle, sobald man die Tetrade anstößt. Manchmal kann man die Hülle im Mikroskop nur schlecht von den Zellen unterscheiden – dann am besten alle „fünf“ Zellen vereinzeln.
- Die Zellen gehen recht schnell unter dem Mikroskop verloren, deshalb am besten so fokussieren, dass man die Zellen als dunklen Punkt wahrnimmt (hat leider den Nachteil, dass man dann die Hülle nicht so gut unterscheiden kann).
- Platten für mindesten eine Woche bei 30-50 $\mu\text{mol Photonen/m}^2\text{s}$ im Dauerlicht anwachsen lassen.
- Die Mutantenzygoten sind oft weniger rund als die WT-Zygoten und die ausgekeimten Zellen sind deutlich kleiner und wirken weniger gefärbt.

2.5.2. Verwendete Tools

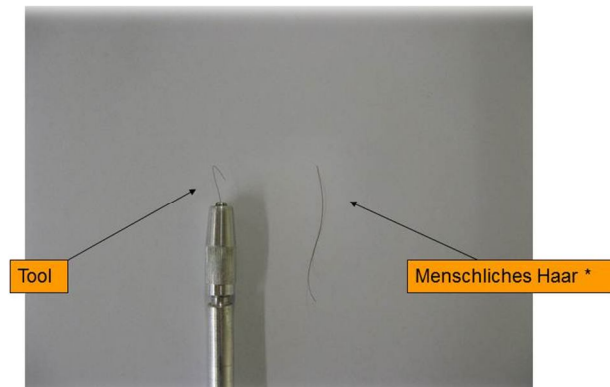


Abbildung A-1: Tool für die Tetradenanalyse (in Anlehnung an Cain und Cain 1984): Wolframdraht zum Positionieren der Zellen, zum Haken gebogen in Impfösenhalter gespannt, das menschliche Haar (*) soll die Dünne des Wolframdrates demonstrieren.

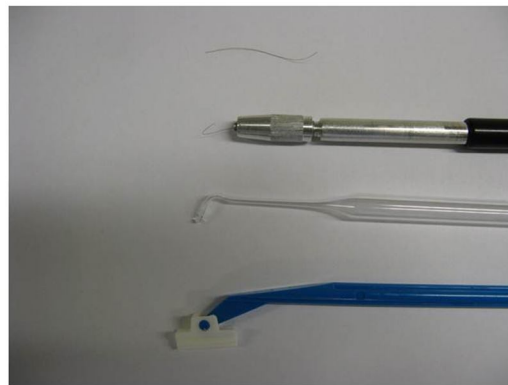


Abbildung A-2: Verschiedene Tools für die Tetradenanalyse: Zellschaber zum Abschaben der Gameten, Glastool zur Kugel geschmolzen, das z.T. beim Sammeln der Zygoten eingesetzt wurde, Wolframdraht-Tool zum Sammeln und Positionieren der Zygoten und Tetraden (von unten nach oben).

2.6. Medien für die TEM

5 mM Sörensen's Phosphat Puffer (pH 7,4):

81,8 ml einer 5mM Na₂HPO₄-Lösung mit 19,2 ml einer 5mM KH₂PO₄-Lösung mischen

Spurr's Medium:

10 g Vinylcyclohexendioxid (Serva)

26 g Nonenylbernsteinsäureanhydrid (Fluka)

6 g Polypropylenglycol-Diglycidylether (Agar Scientific)

0,4 g Dimethylaminoethanol (Serva)

2.7. Isolierung von DNA aus *C. reinhardtii*

(aus: Lee, Joo and Goodenough 2008, Supplemental data)

- Ca. 500 μ l einer 5 Tage alten Kultur (ca. 1×10^7 Zellen/ml) abzentrifugieren bei 5.000 x g für 2 min bei RT
- Überstand vollständig abnehmen.
- Pellet in 50 μ l Iso-Puffer resuspendieren
- Lösung in ein PCR-Tube überführen
- 1 Stunde bei 58 °C und 1 Stunde bei 94 °C im Thermocycler inkubieren
- Danach kurz abzentrifugieren, in einer Tischzentrifuge bei max. Geschwindigkeit für 1 min (Überstand bleibt etwas grün)
- 1 μ l in einen 25 μ l PCR-Ansatz einsetzen oder
- DNA-Lösung einfrieren

- Iso-Puffer: 1 X PCR-Puffer mit 2,5 mg/ml Proteinase K
 - 1 mg Proteinase K (Sigma) in 100 μ l ddH₂O lösen
 - Dazu 80 μ l 5 x PCR-Puffer A (mit MgCl₂) aus dem KAPA2G Robust PCR-Kit (Peqlab) geben
 - Mit 220 μ l ddH₂O auffüllen

2.8. RNA-Extraktion aus *C. reinhardtii*

mittels ROCHE High Pure RNA Isolation Kit

- 10 ml Chlamydomonas-Zellen 5 Tage alt, ca. 1×10^7 Zellen/ml
- Zellen abzentrifugiert bei RT, ca. 3.000 x g
- Pellet in 200 μ l Tris (10 mM, pH 8,0) resuspendiert
- Zugabe von 400 μ l Lysispuffer (im Kit enthalten)
- Lösung in Tubes mit Perlen überführt (Tubes: Lysing Matrix B für Fast-Prep-Homogenisator (B wird eigentlich für Bakterien empfohlen))
- Im Mini Bead Beater aufgeschlossen, 3 x 10 sec bei max. power, zwischendrin auf Eis gekühlt
- Bei Bedarf kann das Volumen von Tris/Lysispuffer verdoppelt werden und ein Stück GF6-Filter zugegeben werden.
- Perlen kurz abzentrifugiert (30 sec bei 5.000 x g)
- Überstand auf Säule überführt
- Dann Protokoll weiter folgen
- In 50 μ l ddH₂O oder Elutionspuffer eluiert
- Erhaltene Konzentrationen: 50 μ g/ml, bei $OD_{260}/OD_{280} = 1,9$

2.9. Übersicht über verwendete Primer

Name	Sequenz (5'→3')	Besonderes
CrBKT-end-a2p	TACCACTTCGACCTGCACTG	Bindet im vorletzten Exon, Intron-überspannende Amplifikation möglich
CrBKT-3UTR-e1m	GCCACGTGTGCCATGTTA	Bindet im 3'UTR-Bereich
CrBKT-3UTR-e2m	GTCGGTCCGTTTCACCAG	Bindet im 3'UTR-Bereich
CrCAO-end-a2p	AGACGCTGCCGACTTC	Bindet im vorletzten Exon, Intron-überspannende Amplifikation möglich
CrCAO-3UTR-e1m	CCGCTCTATCCTCCACC	Bindet im 3'UTR-Bereich
CrCHYB-end-a2p	ATCACGCTGTTCGGCATC	Bindet im drittletzten Exon, Intron-überspannende Amplifikation möglich
CrCHYB-3UTR-e2m	CGGTCTTTCCTAGGACGTTG	Bindet im 3'UTR-Bereich
CrZymC-a2p	GCGGGACTTCATGGACTTTA	Bindet im drittletzten Exon, Intron-überspannende Amplifikation möglich
CrZymC-e2m	GTCCTGGATGTCCTCAAACG	Bindet im letzten Exon, Intron-überspannende Amplifikation möglich
CrEZY15-a1p	GTCGACGCAAGACCAAACAC	Amplifikation des Gens innerhalb des codierenden Bereiches
CrEZY15-e1m	GCCGTAGTCACCCAGCA	Amplifikation des Gens innerhalb des codierenden Bereiches
Cr-fus1-up	ATGCCTATCTTTCTCATTCT	Amplifikation eines Paarungstyp „plus“ spezifischen Gens
Cr-fus1-low	GCAAATACACGTCTGGAAG	Amplifikation eines Paarungstyp „plus“ spezifischen Gens
Cr-mid-up	ATGGCCTGTTTCTTAGC	Amplifikation eines Paarungstyp „minus“ spezifischen Gens
Cr-mid-low	CTACATGTGTTTCTTGACG	Amplifikation eines Paarungstyp „minus“ spezifischen Gens

Tabelle A-1) Übersicht über die verwendeten Primer und deren Sequenz sowie den Bindungsort.

2.10. Übersicht über Bedingungen für die Amplifikation der verschiedenen Gene aus *C. reinhardtii*

PCR-Ansatz GC-RICH KIT:

Reagenz	Volumen (μ l)
Template-DNA	2
Primer 1 (3 μ M)	3,5
Primer 2 (3 μ M)	3,5
GC-RICH Puffer	10
GC resolution solution	5
dNTP-Mix (2,5mM)	4
GC-RICH DNA Polymerase	1
ddH ₂ O	21
Gesamt	50 μ l

PCR-Programm:

Step	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (in s)	Zyklenzahl
1	Initiale Denaturierung	95	120	1
2	Denaturierung	95	30	38
3	Annealing	*	30	38
4	Elongation	72	90	38
5	Finale Elongation	72	420	1

Tabelle A-2: Übersicht über die Amplifikation der Gene aus *C. reinhardtii*, * Annealingtemperatur abhängig vom amplifizierten Gen, siehe Kapitel Material und Methode 6.4.1.

2.11. Mating-Type-PCR

PCR-Ansatz:

Reagenz	Volumen (µl)
Template-DNA	1
Primermix (jeder 5 µM)	8
KAPA Puffer A	5
KAPA Enhancer 1	5
25 mM MgCl ₂	1
dNTP-Mix 10 mM	0,5
KAPA2G Robust Polymerase	0,05
ddH ₂ O	4,45
Gesamt	25 µl

PCR-Programm:

Step	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (in s)	Zyklenzahl
1	Initiale Denaturierung	95	120	1
2	Denaturierung	95	30	40
3	Annealing	52	30	40
4	Elongation	72	60	40
5	Finale Elongation	72	60	1

Tabelle A-3: Übersicht über die Amplifikation der Matingtype-Loci aus *C. reinhardtii*.

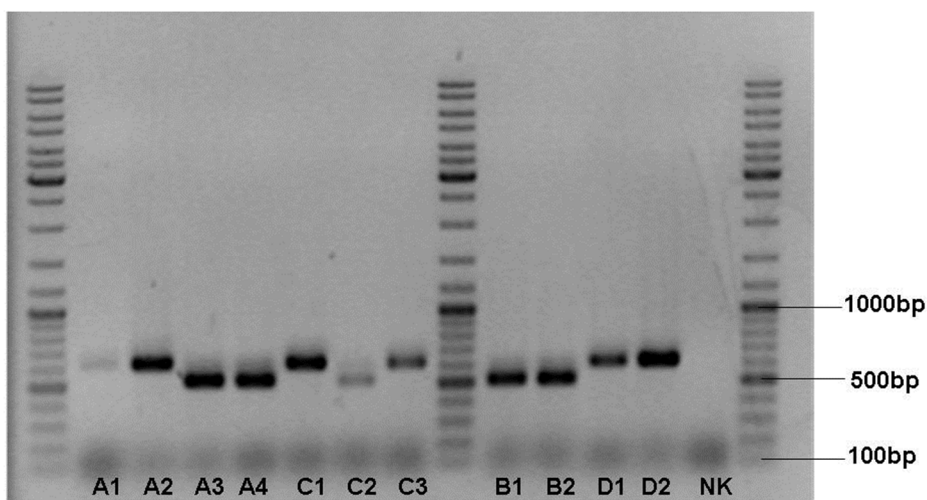


Abbildung A-3) Agarosegel zum Nachweis des Paarungstypes der vereinzelteten Tetraden (cc620 und cc621), Bande in Höhe von 500 bp zeigen den Paarungstyp „plus“ an, Banden in Höhe von 650 bp den Paarungstyp „minus“ A, B, C und D: Tetradenklone, NK: Negativkontrolle, Marker: Laddermix; Gel: TAE, 1% Agarose.

2.12. TAE-Puffer

Für 50 x konzentrierte Stammlösung:

242 g TRIS

57,1 ml Essigsäure

100 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)

Mit dH₂O auf 1000 ml auffüllen.

Für die Elektrophorese wurde der Puffer 1:50 verdünnt, so dass eine einfach konzentrierte Lösung verwendet wurde.

2.13. DNA-Marker

GeneRuler™ DNA Ladder-Mix, Fermentas

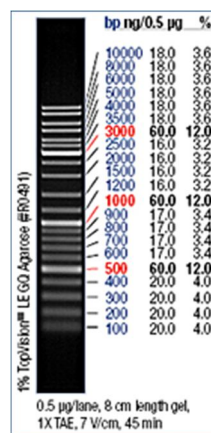


Abbildung A-4) Übersicht über das Bandenmuster und die zugehörige DNA-Größen des Markers (Quelle: www.fermentas.com)

2.14. HPLC-Methoden und Materialien

2.14.1. Methoden

2.14.1.1. Gradient 1 (_B): AstaScanChrom 6B (_UV)

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Eluent C (%)
0	1,5	70	30	
4	1,5		100	
10	1,5		80	20
15	1,5		60	40
17	1,5		30	70
22	1,5		30	70
23	1,5		100	
24	1,5	70	30	

Tabelle A-4: Zur Pigmenttrennung eingesetzter HPLC-Gradient AstaScanChrom6B (_UV), in Verbindung mit der Chromolithsäule (Merck).

2.14.1.2. Gradient 2: AstaScanChrom 12

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Eluent C (%)
0	1	70	30	
4	1		100	
10	1		80	20
13	1		60	40
22	1		45	55
25	1		30	70
29	1		30	70
30	1		100	
31	1	70	30	

Tabelle A-5: Zur Pigmenttrennung eingesetzter HPLC-Gradient AstaScanChrom12, in Verbindung mit der Chromolithsäule (Merck).

2.14.1.3. Gradient 3: AstaScanChrom 4

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Eluent C (%)
0	1	70	30	
2	1		100	
7	1		60	40
15	1		30	70
18	1		30	70
19	1		100	
20	1	70	30	

Tabelle A-6: Zur Pigmenttrennung eingesetzter HPLC-Gradient AstaScanChrom4, in Verbindung mit der Chromolithsäule (Merck).

2.14.2. Eluenten

	Eluent A	Eluent B	Eluent C
Zusammensetzung	85 % Methanol 15 % H ₂ O 0,075 M Ammoniumacetat	90 % Acetonitril 10 % H ₂ O	100 % Ethylacetat

Tabelle A-7: Zusammensetzung der verschiedenen Eluenten der HPLC-Gradienten.

2.15. Pigmentquantifizierung

Pig.Nr.	Pigment	HPLC λ . max	Lit. λ . max	Lit. α . max	λ . quant	α -Faktor	Math. α . quant	Math. Molgew	Area / μ g	Korrekt. fakt.	Korrigierte Area / μ g
1	cis-No	439	439	2240	440	0,992	2222	600,89	6755123	1	6755123
2	Viola	443	441	2500	440	0,984	2460	600,89	7478400	1	7478400
3	Astaxanthin	481	478	2100	480	1	2100	596	6384000	1	6384000
4	Antheraxanthin	449	448	2350	480	0,880	2088	584,89	6286720	1	6286720
5	4-Ketolutein	476	448	2100	480	0,978	2053	582	6240861	1	6240861
6	Lutein	449	447	2550	440	0,855	2180	568,89	6627960	1	6627960
7	Zeaxanthin	455	454	2500	480	0,881	2203	568,89	6695600	1	6695600
8	cis-Cartha	480	480	2092	480	1	2092	564	6359680	1	6359680
9	Canthaxanthin	480	480	2092	480	1	2092	564	6359680	1	6359680
10	Chl b	458	646	514	440	1,274	655	907,51	1990701	1	1990701
11	Chl a	430 / 663	664	877	440	0,708	621	893,52	1887822	1	1887822
12	Asta-Monoeste	481	478	2100	480	1,000	2100	596	6384000	1	6384000
13	4-KL-Ester	476	0	2100	480	0,978	2053	582	6240861	1	6240861
14	4-KL-Ester	476	0	2100	480	0,978	2053	582	6240861	1	6240861
15	Asta-Monoeste	481	478	2100	480	1,000	2100	596	6384000	1	6384000
16	4-KL-Ester	476	0	2100	480	0,978	2053	582	6240861	1	6240861
17	beta-Car	456	454	2500	480	0,879	2198	536,89	6680400	1	6680400
18	4-KL-Ester	476	0	2100	480	0,978	2053	582	6240861	1	6240861
19	Asta-Diester	481	478	2100	480	1,000	2100	596	6384000	1	6384000
20	Phytoen	286	286	756	286	1,000	756	544,96	2298240	1	2298240

Tabelle A-8) Übersicht über die verwendeten Extinktionskoeffizienten zur Bestimmung der Pigmentquantitäten, Quelle der Extinktionswerte: Lohr (2000) und Britton (2004).

2.16. Puffer für die Untersuchung der Lipidfraktionen mittels Ultrazentrifugation

Homogenisierungspuffer (pH 7,5)

10 mM HEPES

1 mM MgCl₂

2 mM EDTA

Resuspendierungspuffer (pH 7,5)

10 mM HEPES

1 mM MgCl₂

2 mM EDTA

250 mM Sorbitol

45 % Saccharose

Saccharoselösungen:

Entsprechende Saccharosekonzentrationen wurden in Homogenisierungspuffer resuspendiert.

ANHANG 3: Ergebnisse

3.1. Zu Kapitel 1: Herstellung und Charakterisierung der Zygosporen von *C. reinhardtii*

3.1.1. HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten vegetativer Zellen

3.1.1.1. Stämme CLS 31-10 und CLS 31-8

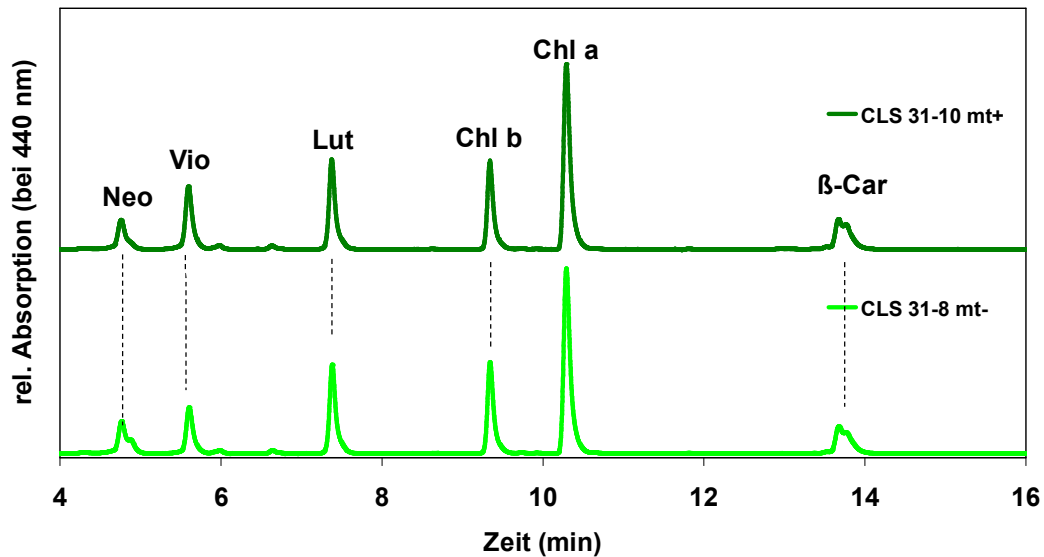


Abbildung A-5) Vegetative Zellen CLS 31-10 und CLS 31-8, Standardanzucht, HPLC-Gradient 3.

3.1.1.2. Stämme cc620 und cc621

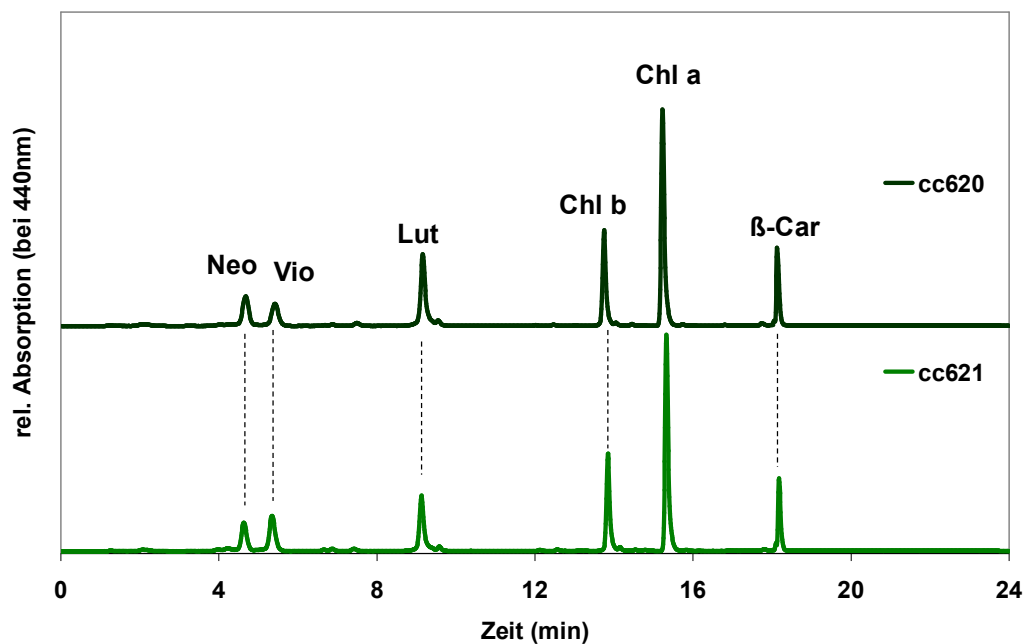


Abbildung A-6) Vegetative Zellen cc620 und cc621, Standardanzucht, HPLC-Gradient 1.

3.2. Zu Kapitel 2: Nachweis der Identität der Ketocarotinoide aus Zygosporen

3.2.1. Quantitative Pigmentbestimmung von vegetativen Zellen der *lor1*-Mutante

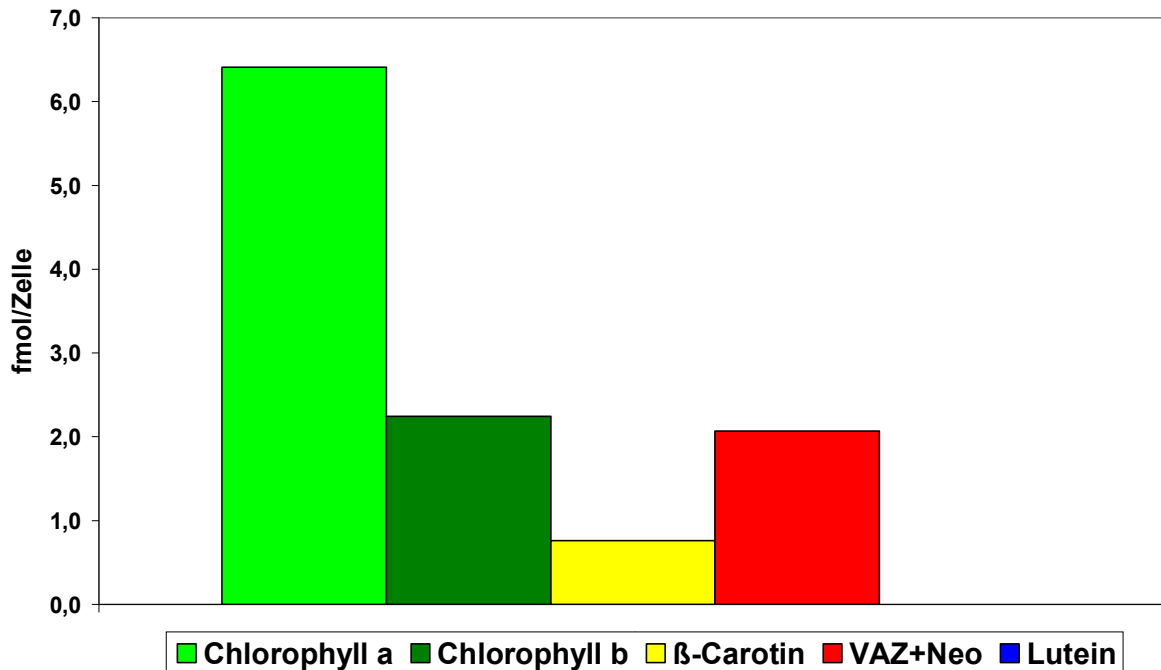


Abbildung A-7) Quantitative Pigmentbestimmung vegetative *lor1*-Zellen Stamm ASX2-11D, Anzucht: 7 Tage als Flüssigstandkultur bei 22 °C und 60 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

3.3. Zu Kapitel 3: Änderung der Pigmentgehalte in Gameten und Zygoten

3.3.1. Untersuchung der Zygotenreifung

Für die Untersuchung der Zygotenreifung innerhalb der ersten zwei Wochen mittels TEM und HPLC waren die geernteten Zygosporen auf Eis gelagert worden, da nur zu zwei Zeitpunkten (T=6 und T=12) eine Fixierung für die TEM-Untersuchungen möglich war.

Daher wurden HPLC-Messungen der frisch geernteten Zygoten und der auf Eis gelagerten Zygoten durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Änderung der Pigmentverhältnisse im Zuge der Lagerung auf Eis auftrat. Im Folgenden ist exemplarisch das HPLC-Chromatogramm der 10 Tage auf TAP-N-Agarplatten gereiften Zygosporen dargestellt, zum einen direkt nach der Ernte mittels HPLC untersucht („OZ“, Originalzeitpunkt), zum anderen die abgeernteten Zellen weitere 2 Tag auf Eis gelagert und dann am Messtag mittels HPLC untersucht („MZ“, Messzeitpunkt“). Die HPLC-Chromatogramme wurden nicht normiert. Extrahiert wurden die gleiche Anzahl von Zellen unter gleichen Bedingungen und identische Mengen in die HPLC injiziert.

Es sind keine wesentlichen Schwankungen der Pigmentgehalte und Pigmentzusammensetzung in den HPLC-Chromatogrammen erkennbar.

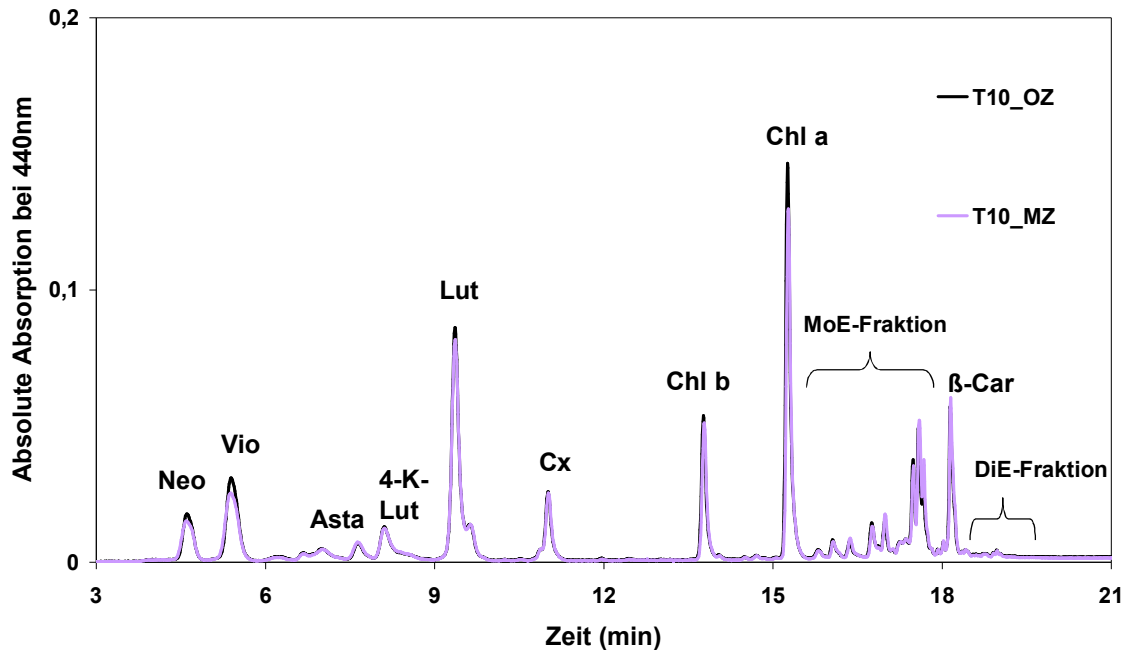


Abbildung A-8) HPLC-Chromatogramme der identischen 10 Tage lang im Dunkeln bei 22 °C gereiften Zygosporen, zum einen direkt nach dem Abernten mittels HPLC untersucht (OZ), zum anderen zwei weitere Tage auf Eis inkubiert (MZ).

3.3.2. Der Zusatz von Ampicillin Zygotenkulturen

TAP-N-Platten wurde Ampicillin zugesetzt, um die Kontamination der Zygosporenkulturen durch Bakterien während der langen Reifung zu minimieren. Dazu wurde eine Endkonzentration an Ampicillin von 100 µg/ml verwendet. Diese Konzentration war als unproblematisch bei der Anzucht von vegetativen Zellen beschrieben worden (Harris 2009), für Zygosporen lagen keine Literaturdaten vor. Um einen Einfluss auf die Zygosporenreifung auszuschließen, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem gleiche Paarungsansätze auf TAP-N-Agarplatten und auf TAP-N+Amp-Agarplatten inkubiert wurden. Die Auswertung des Versuchs nach fünf Wochen zeigte, dass dabei keine Unterschiede in der Pigmentzusammensetzung auftraten (Abb. A-9), so dass bei allen Ansätzen weiterhin Ampicillin zugesetzt wurde.

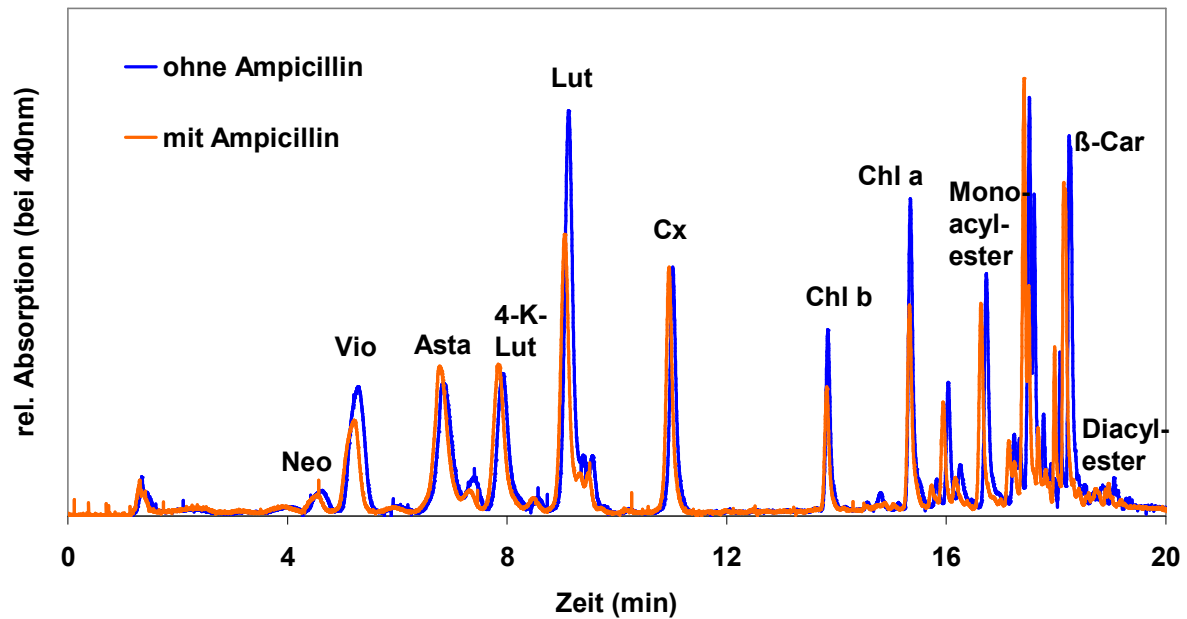


Abbildung A-9) HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten aus Zygosporen von *C. reinhardtii* deren Medium z.T. Ampicillin zugesetzt wurde, normiert auf Canthaxanthin, 5 Wochen auf TAP-N-Agarplatten bei 22 °C im Dunkeln gelagert

Bei diesen Untersuchungen wurde aber auch deutlich, dass es zwischen den Ansätzen Schwankungen in der Pigmentzusammensetzung gab. Diese traten auch bei Ansätzen der gleichen Paarung auf und konnten u.a. durch leichte Feuchtigkeitsschwankungen zwischen den verschiedenen Agarplatten erklärt werden. Daher wurden diese Schwankungen quantifiziert. Dazu wurde zunächst berechnet, wie hoch die Standardabweichung jedes Pigmentes bei identischen Ansätzen (Plattenduplikate) und wie hoch dieser Anteil am Pigmentgehalt war. Dieser prozentuelle Anteil wurde über die Gesamtanzahl der Duplikate gemittelt. Grundlage hierfür waren Duplikate aus der Zeitreihe mit Norflurazon-zusatz (Kapitel III-4), Wildtyp-Platten zu drei Zeitpunkten (3, 5 und 8 Wochen).

Dabei wurde deutlich, dass die Schwankungen im Ketocarotinoidanteil innerhalb identischer Zygosporenansätzen rund 29 % betragen, ebenso wie die Anteile der Gesamtcarotinoide (Abb. A-10). Die Anteile der PS-Carotinoide schwankten um rund 25 %, die der Chlorophyllanteile um rund 45 %. Die hohe Schwankung kann aber mit der nur noch geringen Konzentration der Chlorophylle in reifen Zygosporen erklärt werden, so dass geringe absolute Konzentrationsunterschiede große Auswirkungen auf die relativen Unterschiede ausüben.

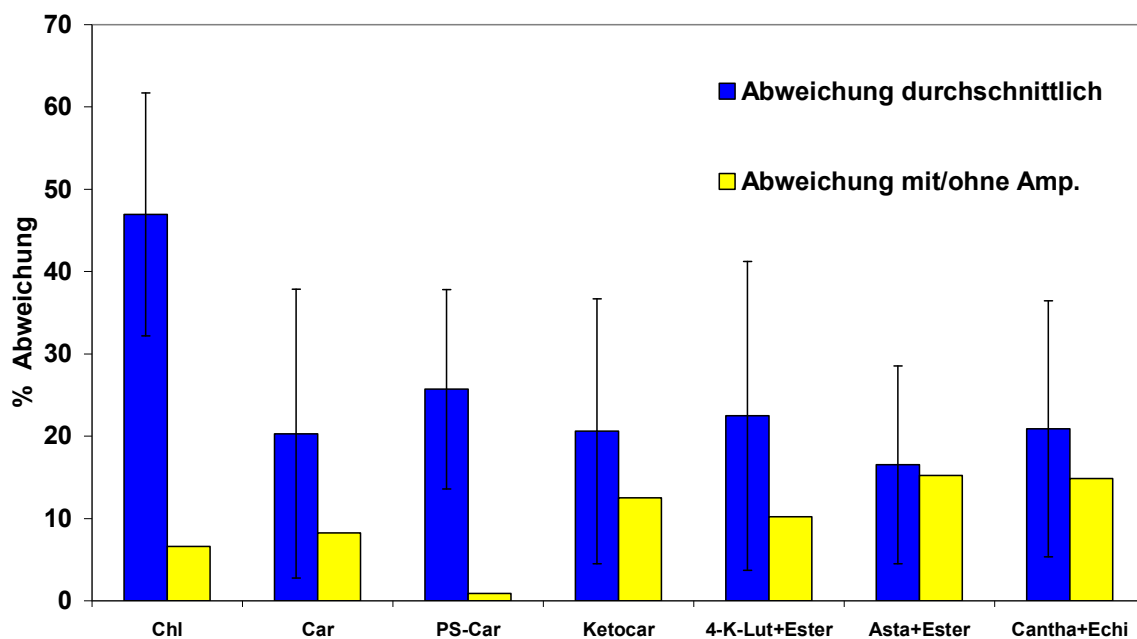


Abbildung A-10) Abweichungen der Pigmentverhältnisse bei Verwendung von Duplikaten und die Abweichung zwischen Proben mit und ohne Ampicillinzugabe.
 Fehlerberechnung: Datenbasis Plattenduplikate zu drei Zeitpunkten (d.h. 3 Paarvergleiche), die Fehlerbalken geben an, wie hoch die Standardabweichung zwischen den drei Paarvergleichen ist.

3.4. Zu Kapitel 9: Untersuchung der BKT und Vergleichsgenen in verschiedenen Zellstadien

3.4.1. Nachweis der BKT in dem weiteren Stamm CLS 31-10 von *C. reinhardtii*

Die BKT wurde auch in einem weiteren Stamm, CLS 31-10, in cDNA von vegetativen Zellen nachgewiesen. Dabei wurden Primer verwendet, die intronüberspannende Sequenzen amplifizierten, allerdings nicht im 3' UTR banden. Die amplifizierten Banden entsprachen der erwarteten Größe von 753 bp bei cDNA und nicht der Größe von DNA von 3747 bp (Primerkombination CrBKTa2p-NdeI und CrBKTe2m-XhoI, aus Bauch 2007).

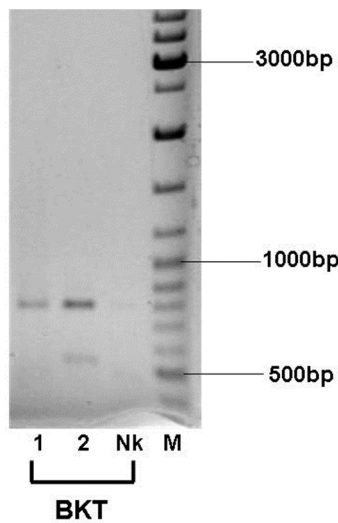


Abbildung A-11) Amplifizierung der CrBKT aus vegetativen Zellen des Stammes CLS 31-10, Zellmaterial: Standardanzucht für 7 Tage, Einsatz für RNA-Extraktion 1×10^7 Zellen, Verwendung von zwei verschiedenen RNA-Extraktionskits: Bahn 1: Macherey-Nagel, Bahn 2: Promega, Nk: Negativkontrolle mit Wasser als Template, Marker: Laddermix (Fermentas), 1x Agarose, 1x TAE,

3.4.2. Gensequenzen

3.4.2.1. CrBKT

Für die Amplifizierung einer Teilsequenz der BKT wurden die Kombination CrBKT-end-a2p (forward Primer) und CrBKT-3UTR-e1m (reverse Primer) verwendet. Im Folgenden sind dargestellt:

Die Gensequenz der BKT („gen. CrBKT“), der ORF der BKT („ORF CrBKT“), in rot farbig markiert ist die Sequenz des forward Primers, in blau farbig markiert die invers komplementierte Sequenz des reverse Primers.

	5	15	25	35	45	55	65
gen. CrBKT	ATGGGCCCTG	GGATACAACC	CACTTCCGCG	CGACCGTGTT	CTAGGACCAA	ACACAGTCGA	TTTGCGCTAC
ORF CrBKT	ATGGGCCCTG	GGATACAACC	CACTTCCGCG	CGACCGTGTT	CTAGGACCAA	ACACAGTCGA	TTTGCGCTAC

	75	85	95	105	115	125	135
gen. CrBKT	TTGCCGCAGC	GCTGACCGCA	CGACGCGTCA	AGCAGTTCAC	GAAGCAGTTC	CGCTCGCGTA	GGATGGCGGA
ORF CrBKT	TTGCCGCAGC	GCTGACCGCA	CGACGCGTCA	AGCAGTTCAC	GAAGCAGTTC	CGCTCGCGTA	GGATGGCGGA

	145	155	165	175	185	195	205
gen. CrBKT	GGACATACTG	AAGCTGTGGC	AGCGCCAATA	TCACCTGCCG	CGCGAGGATT	CTGACAAGCG	CACGCTGCGC
ORF CrBKT	GGACATACTG	AAGCTGTGGC	AGCGCCAATA	TCACCTGCCG	CGCGAGGATT	CTGACAAGCG	CACGCTGCGC

	215	225	235	245	255	265	275
gen. CrBKT	GAGCGGTTTC	ACCTGTACCG	CCCGCCGCGT	TCAGACCTAG	GTGGCATTGC	GGTCGCTGTG	ACAGTCATCG
ORF CrBKT	GAGCGGTTTC	ACCTGTACCG	CCCGCCGCGT	TCAGACCTAG	GTGGCATTGC	GGTCGCTGTG	ACAGTCATCG

	285	295	305	315	325	335	345
gen. CrBKT	CGCTGTGGGC	GACGCTGTTT	GTCTACGGGC	TGTGGTTCGT	CAAGCTGCCA	TGGGCGCTCA	AAGTGGGCGA
ORF CrBKT	CGCTGTGGGC	GACGCTGTTT	GTCTACGGGC	TGTGGTTCGT	CAAGCTGCCA	TGGGCGCTCA	AAGTGGGCGA

	355	365	375	385	395	405	415
gen. CrBKT	GACAGCCACG	TCCTGGGCAA	CCATTGCTGC	TGTATTCTTT	AGCCTGGAAT	TCCTTTACAC	CGGGCTCTTC
ORF CrBKT	GACAGCCACG	TCCTGGGCAA	CCATTGCTGC	TGTATTCTTT	AGCCTGGAAT	TCCTTTACAC	CGGGCTCTTC

	425	435	445	455	465	475	485
gen. CrBKT	ATCACCACGC	ACGACGCGAT	GCATGGCACC	ATCGCGCTGC	GCAACCGGCG	CCTGAACGGT	GAGTGCCTGC
ORF CrBKT	ATCACCACGC	ACGACGCGAT	GCATGGCACC	ATCGCGCTGC	GCAACCGGCG	CCTGAACG--	-----

	495	505	515	525	535	545	555
gen. CrBKT	GCTTAACGGG	GCCAACTCTG	CGGCTGGCTT	GCGGTTTGGT	CGGCATTGGT	GCAAGGGTTA	GAGCGTGAGC
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	565	575	585	595	605	615	625
gen. CrBKT	ACTGAAGAAG	GGCGAGGGCG	AGGCCGGGGT	CTGACCAAGT	GACACGCTAG	GTGTGTGTGA	CGCGCGGATG
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      635      645      655      665      675      685      695
gen. CrBKT  CGTGGCAGCT GCACCGCCGC GAACATGGTG ATAGCGCTGA CGCCACTGTA TTGAACCCGC GAGGGGCAAT
ORF CrBKT  -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      705      715      725      735      745      755      765
gen. CrBKT  GCTAGTAGTT TACAGTTCCC GCCCGTGCCG CCCCTGCTGC TTTCAGTGAA ATTAATCATA GCTCCCCCCC
ORF CrBKT  -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      775      785      795      805      815      825      835
gen. CrBKT  CCCCAAAGTC AAATTCCCCC AACCCAACAA ACGCACCTTG CACAACCTCT TCACCCACAG CGGCCCTTGC
ORF CrBKT  -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      845      855      865      875      885      895      905
gen. CrBKT  TCTCCCCGCA GACTTTCTGG GCCAGCTGGC AATCAGCCTA TGTGAGCTCT TTGCAGTTCC TTAGGGTTTA
ORF CrBKT  -----ACTTTCTGG GCCAGCTGGC AATCAGCCTA T-----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      915      925      935      945      955      965      975
gen. CrBKT  GGCGCGAGGC AAGGGGGCTA TGC GTTCCGGT GCCAGAAGGC CGGCGGGCGC CCAGCACACA AAGAGTGGAG
ORF CrBKT  -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      985      995      1005      1015      1025      1035      1045
gen. CrBKT  AAGGGTAGCT GGTAGTGGCG GTACAGGCGT GGTAGGGACA GTAGGAGTGA TGTGGGTTTG CCTTCGCGGC
ORF CrBKT  -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1055      1065      1075      1085      1095      1105      1115
gen. CrBKT  TGCGCACGCG CCGCCGGCCA GCCAGGAACG GCACGACTTG GGGGGGCGCT TGTGTGGGT GGGATGGGTC
ORF CrBKT  -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1125      1135      1145      1155      1165      1175      1185
gen. CrBKT  CTTGCATGTG CGGGGGGAGA GCCGGGTCGC TTGCGCCATC CCCTGCACGT GCCGGCACGC CGCTGTTCAC
ORF CrBKT  -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1195      1205      1215      1225      1235      1245      1255
gen. CrBKT  CCCCTCCTCC TCCCCTGCG CGGCCCCCT GCACGCACC TCCTTGCTGA CAGACGCTG GTTTGACTAC
ORF CrBKT  -----ACGCCTG GTTTGACTAC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1265      1275      1285      1295      1305      1315      1325
gen. CrBKT  TCCGTCCTGC ACCGCAAGTG AGTCAAGCGG GATGACCCCA GTATGCCTGG GGAGCGGGGC ACGGGAGTTT
ORF CrBKT  TCCGTCCTGC ACCGCAAG--

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1335      1345      1355      1365      1375      1385      1395
gen. CrBKT  GTTCCGAACC CAACTATGAT GCGGCCAAGA CGGGGGGTTG GGCTCCTCCA GTTGCGGCCC CGGCTTGTGC
ORF CrBKT  -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1405      1415      1425      1435      1445      1455      1465
gen. CrBKT  GCCAGTTGAA CGGTTGTGCG GTGCAAAGGA GGAAATCTTT GAGTGGCTGT AGCTCATGAG GAACGACGAT
ORF CrBKT  -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1475      1485      1495      1505      1515      1525      1535
gen. CrBKT  CATCACGGCT CACGCAGCCT GTCTCCCCCT CATCTCCCTC CACGCCACGC CACGCTACCA ACGCCACGCT
ORF CrBKT  -----

```

ANHANG 3: Ergebnisse

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1545      1555      1565      1575      1585      1595      1605
gen. CrBKT GCCACCCCCA CCAACTCCAC CTATCCCACG CCTCCCTGTT CCCCACGATT GTCTACCGAC TACCGTTTAC
ORF CrBKT -----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1615      1625      1635      1645      1655      1665      1675
gen. CrBKT CACTTCCTCA AGTAATCATG AATGTAACCC CCCCCACAC ACACACCTCT CCCCCAACCT CTCCCCCACC
ORF CrBKT -----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1685      1695      1705      1715      1725      1735      1745
gen. CrBKT ACGGCGCCAA CAGGCACCTGG GAGCACCACA ACCACACCGG GGAGCCCGGT GTGGATCCGG ACTTCCACCG
ORF CrBKT -----CACTGG GAGCACCACA ACCACACCGG GGAGCCCGGT GTGGATCCGG ACTTCCACCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1755      1765      1775      1785      1795      1805      1815
gen. CrBKT CGGCAACCCC AACCTGGCGG TGTGGTTCGC GCAGTGAGTG GAAGAGTGCG TCGGTGTGTG TTTTGGCGGG
ORF CrBKT CGGCAACCCC AACCTGGCGG TGTGGTTCGC GCA-----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1825      1835      1845      1855      1865      1875      1885
gen. CrBKT GGGCGGGGGG GCTGGAGGGG GGGGAGGTAG TCGTTCATGG TGATCCCAGC GATGAAGTCA CATGTACGAG
ORF CrBKT -----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1895      1905      1915      1925      1935      1945      1955
gen. CrBKT GTACCGACGT CCAGTACAGC TGTACAGGGG GCGGTGTGAA GGTGGGCATG GGCATGGGA GGGCCGTGGG
ORF CrBKT -----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1965      1975      1985      1995      2005      2015      2025
gen. CrBKT AGGGCGGTGG GAGCCAGTGG CAAAGAGTGG CGGTGGAGGT GGAGGTTTGT CTCAGAATGT GCCACAGCCA
ORF CrBKT -----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 2035      2045      2055      2065      2075      2085      2095
gen. CrBKT AGTCTCCCC TCCCCCACT CTGGTTACCG CATCCCCCCC CCCTCCAACC CACCTCCACC CCCGCCCCCC
ORF CrBKT -----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 2105      2115      2125      2135      2145      2155      2165
gen. CrBKT CCTCCCCCG CCCAGGTTCA TGGTGTGCGTA CATGACCCTC AGCCAGTTCC TCAAGATCGC GGTCTGGTCC
ORF CrBKT -----GTTCA TGGTGTGCGTA CATGACCCTC AGCCAGTTCC TCAAGATCGC GGTCTGGTCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 2175      2185      2195      2205      2215      2225      2235
gen. CrBKT AACCTGTGTC TGCTGGCGGG TGCGCCGCTG GCCAACCAGC TGCTGTTTTCAT GACGGCGGTG AGGCGGGCGG
ORF CrBKT AACCTGTGTC TGCTGGCGGG TGCGCCGCTG GCCAACCAGC TGCTGTTTTCAT GACGGCG---

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 2245      2255      2265      2275      2285      2295      2305
gen. CrBKT GGGGGGGGGT GCTAACTCTG AACCAACCCC GTAAGGAAAC AGTCGAGGCG GGAGGGGTTT GCAAGGTTAA
ORF CrBKT -----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 2315      2325      2335      2345      2355      2365      2375
gen. CrBKT CAGCATTGAT TAACAGCATT GGAACAGGA TACAAGCAGG GAATCAAGGG ACAGCAGGCT AGGGGAGGCT
ORF CrBKT -----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 2385      2395      2405      2415      2425      2435      2445
gen. CrBKT TGTTTTTACC ATTCTCAGTA AGGAGTCAGA GGCACGAAGA CGACGCAGGA GGGAGACGTT GCGCTTGGTG
ORF CrBKT -----

```


	2455	2465	2475	2485	2495	2505	2515
gen. CrBKT	TTGGGTTTGG	AACGCCAGCG	CCTCCACTGC	CCCGCCCCTC	CACTCTTCAG	GCGCCCATCC	TGTCCGCCTT
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	GCGCCCATCC	TGTCCGCCTT

	2525	2535	2545	2555	2565	2575	2585
gen. CrBKT	CCGCCTGTTC	TACTACGGTG	GGTGTGGTAA	TGGTGGTTAA	GGTGGTTAGG	GTGGTTGGG	TGGTTAGGGT
ORF CrBKT	CCGCCTGTTC	TACTACG---	-----	-----	-----	-----	-----

	2595	2605	2615	2625	2635	2645	2655
gen. CrBKT	GGGATAGCGG	GACACAGCTT	GAGGGTGTGT	ATGTGTGTGT	AGGGGGGGGG	GGGTACCAGC	CCAAAGTGAA
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2665	2675	2685	2695	2705	2715	2725
gen. CrBKT	TCGAAGGGGG	GTGCTGCACT	GGGTTGCTG	TGAGGCCCGC	AACCCCACT	ACGCACGCAC	CTACGCACGC
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2735	2745	2755	2765	2775	2785	2795
gen. CrBKT	ACAGGCACCT	ACGTGCCGCA	CCACCCGGAG	AAGGGGCACA	CCGGCGCCAT	GCCCTGGCAG	GTGCGGCCGC
ORF CrBKT	---GCACCT	ACGTGCCGCA	CCACCCGGAG	AAGGGGCACA	CCGGCGCCAT	GCCCTGGCAG	-----

	2805	2815	2825	2835	2845	2855	2865
gen. CrBKT	TTGCCAGCCG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGCG	AGTGGCAGTA	TGTGACAGTG	CGTGGAAGTT	TGGGTCCGTG
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2875	2885	2895	2905	2915	2925	2935
gen. CrBKT	GGGGTTGGGG	TGTGCGTTTG	TGAGCGCGCA	TGTGTGCACA	CGCTACGTGT	GTAGGCGTGG	GGGCTAGTCG
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2945	2955	2965	2975	2985	2995	3005
gen. CrBKT	GTAGAACACC	CCTTGTTTTCAG	AGGCCAGTA	CCGGCGCC	GCGCCAGC	CCACCTTGTA	TACTCCCAT
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3015	3025	3035	3045	3055	3065	3075
gen. CrBKT	GTCACCCCTG	TGAGGGGGT	CTGCCAGCCG	GTGTGAGCCG	CAGCATCAG	GGTCTGTAAC	ACACGTCGGC
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3085	3095	3105	3115	3125	3135	3145
gen. CrBKT	CCTCGCAACT	TGTGCCAAG	CATCACCCCT	GCAAACCTCT	GACCCACCT	TCCGCAACCT	AACCCGTTGC
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3155	3165	3175	3185	3195	3205	3215
gen. CrBKT	CAAGCACAAAC	ACGGGCGAAA	CATGTAGCCA	TGCACGATCA	CGTGTCAACA	CACACACACA	CACGCACACA
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3225	3235	3245	3255	3265	3275	3285
gen. CrBKT	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACACGCGCA	CATGCACATG
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3295	3305	3315	3325	3335	3345	3355
gen. CrBKT	CACACGCACA	CGCACACGCA	CACGCACACG	CACACGCACA	CGCACACACA	CACACACACA	CACGCACACG
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ANHANG 3: Ergebnisse

	3365	3375	3385	3395	3405	3415	3425
gen. CrBKT	CACACACACA	CGCACACGCA	CACGCACACG	CACACGCACA	CACACGCACA	CACATTTTCC	TTTCGATTTT
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3435	3445	3455	3465	3475	3485	3495
gen. CrBKT	TTAACACACA	CATACACACA	CATACACACA	CAGGCACATG	CACACGTGCA	GGTATCCCGC	ACCAGTCCG
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-GTATCCCGC	ACCAGTCCG

	3505	3515	3525	3535	3545	3555	3565
gen. CrBKT	CCTCCCGGCT	GCAGTCGTTC	CTCACCTGCT	ACCACCTCGA	CCTGCCTGG	GTGAGCGGCG	CGCTGGGGCT
ORF CrBKT	CCTCCCGGCT	GCAGTCGTTC	CTCACCTGCT	ACCACCTCGA	CCTGCCTGG	-----	-----

	3575	3585	3595	3605	3615	3625	3635
gen. CrBKT	GTGGGGGCTG	TGGGGGCCGT	GGGTGTGTGT	GAGGGGGGGA	GGGGGGCTGC	GGCAAGTGG	ATCATGTTGG
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3645	3655	3665	3675	3685	3695	3705
gen. CrBKT	AGGTGCGCC	GGATGACGG	GGCAGGTCGG	TACCGTGTCT	GTTCACACGC	CCCTCAGTGC	CACGTGCCGC
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3715	3725	3735	3745	3755	3765	3775
gen. CrBKT	CGTGCCCTTC	CCCGCGCCCG	CCCTTCGCCA	AGTCCCACAT	TCCGCACCCA	CGCCCGCCT	CCACACACCC
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3785	3795	3805	3815	3825	3835	3845
gen. CrBKT	CACCCCTCCC	TGATFCCCCT	GCTGTGTACC	TGTCCCCAGT	GGCTTAAGCT	TGCAACCTTA	CCCCTCAGGA
ORF CrBKT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----GA

	3855	3865	3875	3885	3895	3905	3915
gen. CrBKT	GCACCACCGC	TGGCCCTACG	CGCCCTGGTG	GGAGCTGCC	AAGTGCCGCC	AGATTGCCCG	CGGCGCAGCC
ORF CrBKT	GCACCACCGC	TGGCCCTACG	CGCCCTGGTG	GGAGCTGCC	AAGTGCCGCC	AGATTGCCCG	CGGCGCAGCC

	3925	3935	3945	3955	3965	3975	3985
gen. CrBKT	CTGGCGCCCG	GGCCGCTGCC	CGTGCCGGCA	GCGGCGGCGG	CTACAGCCGC	CACCGCGGCG	GCGGCAGCAG
ORF CrBKT	CTGGCGCCCG	GGCCGCTGCC	CGTGCCGGCA	GCGGCGGCGG	CTACAGCCGC	CACCGCGGCG	GCGGCAGCAG

	3995	4005	4015	4025	4035	4045	4055
gen. CrBKT	CAGCTACAGG	CAGCCCCGCT	CCCGCCAGCC	GAGCAGGGTC	AGCTTCCTCC	GCCTCCGCAG	CGGCCTCCGG
ORF CrBKT	CAGCTACAGG	CAGCCCCGCT	CCCGCCAGCC	GAGCAGGGTC	AGCTTCCTCC	GCCTCCGCAG	CGGCCTCCGG

	4065	4075	4085	4095	4105	4115	4125
gen. CrBKT	ATTTGGATCC	GGACACAGCG	GCTCTGTGGC	TGCGCAGCCG	CTGTCTTCGC	TGCCCTTGCT	GAGCGAGGGC
ORF CrBKT	ATTTGGATCC	GGACACAGCG	GCTCTGTGGC	TGCGCAGCCG	CTGTCTTCGC	TGCCCTTGCT	GAGCGAGGGC

	4135	4145	4155	4165	4175	4185	4195
gen. CrBKT	GTGAAGGGGT	TGGTGGAGGG	GGCGATGGAG	TTGGTGGCAG	GTGGCAGCAG	CAGCGGCGGT	GGTGGAGAGG
ORF CrBKT	GTGAAGGGGT	TGGTGGAGGG	GGCGATGGAG	TTGGTGGCAG	GTGGCAGCAG	CAGCGGCGGT	GGTGGAGAGG

	4205	4215	4225	4235	4245	4255	4265
gen. CrBKT	GCGGCAAGCC	GGGCGCGGGG	GAGCACGGGC	TGCTGCAGCG	GCAGCGGCAG	CTGGCGCCTG	TTGGCGTGAT
ORF CrBKT	GCGGCAAGCC	GGGCGCGGGG	GAGCACGGGC	TGCTGCAGCG	GCAGCGGCAG	CTGGCGCCTG	TTGGCGTGAT

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4275      4285      4295      4305      4315      4325      4335
gen. CrBKT GGCTTGAGGT GTGTAGAGGC AAGGGAGGAG GTGGGAGAGT GTGAGATTGT GATGGGAGGT GTCAGGCGGA
ORF CrBKT  GGCTTGA--- -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4345      4355      4365      4375      4385      4395      4405
gen. CrBKT AGACACACAC CACCTGGTGA AACGGACCGA CGTTGATGTT GCTGGGACTA CATGGAGTAG GAAATAAGGG
ORF CrBKT  -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4415      4425      4435      4445      4455      4465      4475
gen. CrBKT ACATGAAAGA GTGAAAGGTG TTTGGGTTGC GTTGACACAG CGGTTTGGAA TTGAACCGTA TCGTTCAGGG
ORF CrBKT  -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4485      4495      4505      4515      4525      4535      4545
gen. CrBKT TTGTCGGATG AGAGAGAGTA ACATGGCACA CGTGGCCGCG GTGCTGCAGG GAAGTGTGTT GCACTGAGTG
ORF CrBKT  -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4555      4565      4575      4585      4595
gen. CrBKT CAGGGAGAGG AAGATTCCGA GCGATGACAT GAGAGGGGTC GGTGACTGGT
ORF CrBKT  -----

```

3.4.2.2. CrCAO

Für die Amplifizierung einer Teilsequenz der CAO wurden die Kombination CrCAO-end-a2p (forward Primer) und CrCAO-3UTR-e1m (reverse Primer) verwendet. Im Folgenden sind dargestellt:

Die Gensequenz der CAO („CrCAO-geno“), der ORF der CAO („CrCAO-ORF“), in rot farbig markiert ist die Sequenz des forward Primers, in blau farbig markiert die invers komplementierte Sequenz des reverse Primers.

	5	15	25	35	45	55	65
CrCAO-geno	ATG CTTCCTG	CGTCGCTTCA	ACGCAAGGCC	GCTGCCGTTG	GCGGTCGCGG	CCCCACCAAC	CAGAGTCGCG
CrCAO-ORF	atg cttcctg	cgtcgcttca	acgcaaggcc	gctgcccgttg	gcggtcgcgg	ccccaccaac	cagagtgcgcg

	75	85	95	105	115	125	135
CrCAO-geno	TGGCAGTTTCG	CGTCTCTGCT	CAGCCGAAGG	AAGCTCCTCC	CGCCTCGACA	CCCATCGTTG	AGGACCCGGA
CrCAO-ORF	tggcagttcg	cgtctctgct	cagccgaagg	aagctcctcc	cgcctcgaca	cccatcgttg	aggaccggga

	145	155	165	175	185	195	205
CrCAO-geno	GAGCAAGTTC	CGCCGCTATG	GCAAGCATTT	CGCGGGCATT	CACAAGCTGA	GCATGGATTG	GCTTGATAGC
CrCAO-ORF	gagcaagttc	cgccgctatg	gcaagcattt	cgcgggcatt	cacaagctga	gcatggattg	gcttgatagc

	215	225	235	245	255	265	275
CrCAO-geno	GTTCCTCGCG	TGCGCGTGCG	CACCAAGGAC	TCTCGCCAGC	TGGACGATAT	GTTGGAGCTG	GCAGTGCTCA
CrCAO-ORF	gttcctcgcg	tgcgcgctgcg	caccaaggac	tctcgccagc	tggacgatat	gttggagctg	gcagtgcctca

	285	295	305	315	325	335	345
CrCAO-geno	ACGAGCGCCT	TGCGGGTTCG	TTGGAGCCCT	GGCAGGCTCG	TCAGAAGCTT	GAGTACCTCC	GTAAGCGGCG
CrCAO-ORF	acgagcgcct	tgcgggctgc	ttggagccct	ggcaggctcg	tcagaagctt	gagtacctcc	gtaagcggcg

	355	365	375	385	395	405	415
CrCAO-geno	GAAGAACTGG	GAGCGCATTT	TCGAGTACGT	GACGCGTCAG	GATGCGGCCG	CGACCTTGGC	CATGATCGAG
CrCAO-ORF	gaagaactgg	gagcgcattt	tcgagtacgt	gacgcgtcag	gatgcggccg	cgacctggc	catgatcgag

	425	435	445	455	465	475	485
CrCAO-geno	GAGGCAAATC	GCAAGGTACG	CGCCACAACC	ATTGACCGCG	CGACCTCCAT	GTATAAATGA	GGACGAATAT
CrCAO-ORF	gaggcaaatc	gcaag-----	-----	-----	-----	-----	-----

	495	505	515	525	535	545	555
CrCAO-geno	GCTCACTCGC	CGGGCAAGGG	GCTGTTTTAG	GCAGGTCGCG	CGCGTCCTTC	CGCTCACGCA	CTACTACATC
CrCAO-ORF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	565	575	585	595	605	615	625
CrCAO-geno	TCGGTTTGGC	AAGGCGCACG	CAACTGATCG	CCGCATCTGC	ATTTTGTTCG	GGTCCTTCAT	GCGTGACGCG
CrCAO-ORF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	635	645	655	665	675	685	695
CrCAO-geno	GCTTACATGG	CTGCAGGTGG	AGGAGTTCGCT	GAGCGAGGAG	GCACGCGAGA	AGACTGCTGT	AGGCGACCTC
CrCAO-ORF	-----	-----gtgg	aggagtcgct	gagcgaggag	gcacgcgaga	agactgctgt	aggcgacctc

	705	715	725	735	745	755	765
CrCAO-geno	CGAGACCAGC	TGGAGTCGCT	GCGCGCGCAG	GTGGCGCAGG	CGCAGGAGCG	CCTTGCTATG	ACGCAGTCGC
CrCAO-ORF	cgagaccagc	tggagtcgct	gcgcgcgagc	gtggcgagg	cgcaggagcg	ccttgctatg	acgcagtcgc

	775	785	795	805	815	825	835
CrCAO-geno	GCGTGGAGCA	GAACCTACAG	CGCGTGAATG	AGCTGAAGGC	GGAGGCGGTG	AGTTCTCCTG	CTCGTTCCTT
CrCAO-ORF	gcggtggagca	gaacctacag	cgcgtgaatg	agctgaaggc	ggaggcg---	-----	-----

	845	855	865	875	885	895	905
CrCAO-geno	TGGTGGTAGG	GGGCACGCCG	GTCGCCCGTG	CGGGCGAACA	GGAACGGTGC	GGACGGGATC	ACCGGTACAT
CrCAO-ORF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	915	925	935	945	955	965	975
CrCAO-geno	TGCCGTACGT	ACCGGTGCAA	CCGCTCCGCT	TCATACCGAT	ACCTTGGCGT	CGTATGTATA	CGCATTATGC
CrCAO-ORF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	985	995	1005	1015	1025	1035	1045
CrCAO-geno	CTTTACTCAG	CTTATCTCTT	CTTGACAATG	CTGCTTCATC	ACATTTACAC	AGACCACGCT	AGAGCGCATG
CrCAO-ORF	-----	-----	-----	-----	-----	--accacgct	agagcgcatg

	1055	1065	1075	1085	1095	1105	1115
CrCAO-geno	CGCAAGGCCCT	CGGACCTGGA	CATCAAGGAG	CGCGAGCGCA	TGCCATCTC	CACTGTGCGC	GCCAAGGGAC
CrCAO-ORF	cgcaaggcct	cggacctgga	catcaaggag	cgcgagcgca	tcgccatctc	cactgtgcgc	gccaaagggac

	1125	1135	1145	1155	1165	1175	1185
CrCAO-geno	CGGCCTCGAG	CAGCAGCAGC	GCCGCCCGCG	TCAGCGCCCC	CGCCACGTCG	GCCACGCTGA	CGGTGGAGCG
CrCAO-ORF	cggcctcgag	cagcagcagc	gccgcccgcg	tcagcgcccc	cgccacgctcg	gccacgctga	cgggtggagcg

	1195	1205	1215	1225	1235	1245	1255
CrCAO-geno	CCCCGCCGCC	ACCACGGTGA	CGCAGGAGGT	GCCGTCCACC	AGCTACGGCA	CCCCCGTGGG	CCGCGCGCCG
CrCAO-ORF	ccccgccgcc	accacggtga	cgcaggaggt	gccgtccacc	agctacggca	cccccggtgga	cgcgcgcccg

	1265	1275	1285	1295	1305	1315	1325
CrCAO-geno	CGCCGCAGCA	AGGCGGCCAT	CCGGCGCAGC	CGCGGGCTGG	AAAGCAGCAT	GGAGATTGAG	GAGGGCCTGC
CrCAO-ORF	cgccgcagca	aggcggccat	cggcgcgagc	cgcgggctgg	aaagcagcat	ggagattgag	gagggcctgc

	1335	1345	1355	1365	1375	1385	1395
CrCAO-geno	GCAACTTCTG	GTACCCCGCT	GAGTTCTCAG	CGGTGAGTAG	CGGCCGGTGT	CAAGTGTGCG	TGGCAGGGCT
CrCAO-ORF	gcaacttctg	gtaccccgct	gagttctcag	cg-----	-----	-----	-----

	1405	1415	1425	1435	1445	1455	1465
CrCAO-geno	TGCAGCACAT	TTGGGGCGCG	AAATTGCAGG	GACAATGCTT	GCAAGGGTTT	AGAAAACGTT	TGGGACAACA
CrCAO-ORF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1475	1485	1495	1505	1515	1525	1535
CrCAO-geno	CGACAGGCCG	CGTTGCCTCC	TCTGATGCGA	CTGACAGCGT	TGCCCTGCC	CTGCTTCCCC	CCCCCCCCC
CrCAO-ORF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ANHANG 3: Ergebnisse

	1545	1555	1565	1575	1585	1595	1605
CrCAO-geno	GCCCCACGTC	CCCCACAGCG	CTTGCCGAAG	GACACGCTGG	TGCCCTTTGA	GCTGTTTGGC	GAGCCGTGGG
CrCAO-ORF	-----	-----cg	cttgccgaag	gacacgctgg	tgccctttga	gctgtttggc	gagccgtggg

	1615	1625	1635	1645	1655	1665	1675
CrCAO-geno	TGATGTTCCG	TGATGAGAAG	GGGCAGCCCT	CCTGCATCCG	CGACGAGTGC	GCACACCGCG	GCTGCCCGCT
CrCAO-ORF	tgatgttccg	tgatgagaag	gggcagccct	cctgcatccg	cgacgagtgc	gcacaccgcg	gctgcccgct

	1685	1695	1705	1715	1725	1735	1745
CrCAO-geno	CAGCCTGGGC	AAGGTGGTGG	AGGGACAGGT	CATGTGCCCC	TACCACGGCT	GGGAGTTCAA	CGGCGACGGC
CrCAO-ORF	cagcctgggc	aaggtggtgg	agggacaggt	catgtgcccc	taccacggct	gggagttcaa	cggcgacggc

	1755	1765	1775	1785	1795	1805	1815
CrCAO-geno	GCCTGCACCA	AGATGCCCTC	CACGCCCTTC	TGCCGCAATG	TGGCGTTCG	CGCGCTGCCT	TGCGCGGAGA
CrCAO-ORF	gcctgcacca	agatgccttc	cacgcccttc	tgccgcaatg	tggcgcttgc	cgcgctgcct	tgccgaggaa

	1825	1835	1845	1855	1865	1875	1885
CrCAO-geno	AGGATGGCTT	CATCTGGGTC	TGGCCCGGCG	ACGGCCTGCC	AGCGGAGACG	CTGCCGGACT	TCGCCAGCC
CrCAO-ORF	aggatggctt	catctgggtc	tggcccggcg	acggcctgcc	agcggagacg	ctgccggact	tcgcccagcc

	1895	1905	1915	1925	1935	1945	1955
CrCAO-geno	GCCAGAGGGC	TTTCTGATCC	ACGCGGAGAT	CATGGTGGAT	GTGCCTGTGG	AGCACGGCCT	GCTGATTGAG
CrCAO-ORF	gccagagggc	tttctgatcc	acgcggagat	catggtggat	gtgcctgtgg	agcacggcct	gctgattgag

	1965	1975	1985	1995	2005	2015	2025
CrCAO-geno	AACCTGCTGG	ACCTGGCGCA	CGCGCCGTC	ACGCACACCA	GACCTTCGCG	GCGCGGTGG	CCTGTGCCCG
CrCAO-ORF	aacctgctgg	acctggcgca	cgcgccgttc	acgcacacca	gcaccttcgc	gcgcggtgg	cctgtgcccc

	2035	2045	2055	2065	2075	2085	2095
CrCAO-geno	ACTTCGTCAA	GTTCCATGCC	AACAAGGTAG	ACAGGGCGTA	AAAGGTCATA	TGCTTGATT	AGAAGTACC
CrCAO-ORF	acttcgtcaa	gttccatgcc	aacaag----	-----	-----	-----	-----

	2105	2115	2125	2135	2145	2155	2165
CrCAO-geno	GCGCTGAAAT	CTTTGATCGT	GTCTCGGCTG	TCTCCGGCAC	CAGTCTAGTC	TTGAGCTGTC	GTTTCATCCTC
CrCAO-ORF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2175	2185	2195	2205	2215	2225	2235
CrCAO-geno	AAACGCCTGA	AGTGTACCC	GTTGCCTTTC	CTTCGTTCCT	TGCCGCAGGC	GCTCTCGGGC	TTCTGGGACC
CrCAO-ORF	-----	-----	-----	-----	-----gc	gctctcgggc	ttctgggacc

	2245	2255	2265	2275	2285	2295	2305
CrCAO-geno	CCTACCCCAT	CGACATGGCC	TTCCAGCCGC	CCTGCATGAC	GCTGTCCACC	ATCGGCCTGG	CGCAACCCGG
CrCAO-ORF	cctaccccat	cgacatggcc	ttccagccgc	cctgcatgac	gctgtccacc	atcggcctgg	cgcaaccggg

	2315	2325	2335	2345	2355	2365	2375
CrCAO-geno	CAAGATTATG	CGCGGCGTGA	CCGCCAGCCA	GTGCAAGAAC	CACCTGCACC	AGCTGCACGT	GTGCATGCCC
CrCAO-ORF	caagattatg	cgcggcgtga	ccgccagcca	gtgcaagaac	cacctgcacc	agctgcacgt	gtgcatgccc

	2385	2395	2405	2415	2425	2435	2445
CrCAO-geno	TCCAAGAAGG	GCCACACGCG	GCTGCTGTAC	CGCATGAGCC	TGGACTTCCT	GCCCTGGATG	CGCCACGTGC
CrCAO-ORF	tccaagaagg	gccacacgcg	gctgctgtac	cgcatgagcc	tggaacttct	gccctggatg	cgccacgtgc

	2455	2465	2475	2485	2495	2505	2515	
CrCAO-geno	CCTTCATCGA	CCGCATCTGG	AAGCAGGTGG	CGGCGCAGGT	GCTGGGCGAG	GACCTGGTGC	TGGTGCCTGGG	
CrCAO-ORF	ccttcatcga	ccgcatctgg	aagcaggtgg	cgcgcgaggt	gctgggcgag	gacctgggtgc	tggtgctggg	

	2525	2535	2545	2555	2565	2575	2585	
CrCAO-geno	CCAGCAGGAC	CGCATGCTGC	GCGGCGGCAG	CAACTGGTCC	AACCCCGCGC	CCTACGACAA	GCTGGCGGGTG	
CrCAO-ORF	ccagcaggac	cgcatgctgc	gcgcggcgag	caactggtcc	aacccccgcg	cctacgacaa	gctggcgggtg	

	2595	2605	2615	2625	2635	2645	2655	
CrCAO-geno	CGCTACCGCC	GCTGGCGCAA	CGGCGTAAAC	GCCGAGGTGC	CACGCGTGCG	CGCCGGCGAG	CCACCGTCCA	
CrCAO-ORF	cgctaccgcc	gctggcgcaa	cgcgctaaac	gccgaggtgc	cacgcgtgcg	cgccggcgag	ccaccgtcca	

	2665	2675	2685	2695	2705	2715	2725	
CrCAO-geno	ACCCCGTGGC	AATGAGCGCG	GGCGAGATGT	TCTCGGTGGA	CGAGGATGAC	ATGGACAAC T	AGA AGCCACG	
CrCAO-ORF	accccggtgc	aatgagcgcg	ggcgagatgt	tctcggtgga	cgaggatgac	atggacaact	ag -----	

	2735	2745	2755	2765	2775	2785	2795	
CrCAO-geno	TGGCGTGGAT	TGGCGAGCGG	AGGTGGCAGG	AGCGAGCATG	GGCGT GGTGG	AGGATAGAGC	GG CGAGGGCA	
CrCAO-ORF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

	2805	2815	2825	2835	2845	2855	2865	
CrCAO-geno	GCTAGGGCCG	TGGTGCAGGC	GCGGGGGTGT	ACATGGCTGA	GGTGGGCAGC	GGCAGGCACA	GCAAACGCGG	
CrCAO-ORF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
					
	2875	2885	2895					
CrCAO-geno	CTAGAGACCG	AGGCCAATTC	ATGCAGGAGC					
CrCAO-ORF	-----	-----	-----					

3.4.2.3. CrCHYB

Für die Amplifizierung einer Teilsequenz der CHYB wurden die Kombination CrCHYB-end-a2p (forward Primer) und CrCHYB-3UTR-e2m (reverse Primer) verwendet. Im Folgenden sind dargestellt:

Die Gensequenz der CHYB („gen.CrCHYB“), der ORF der CHYB („ORF CrCHYB“), in rot farbig markiert ist die Sequenz des forward Primers, in blau farbig markiert die invers komplementierte Sequenz des reverse Primers.

	5	15	25	35	45	55	65
gen.CrCHYB	ATG ATGCTGG	CTTCGCGTCC	TGCTGTCGCG	CTAGGGGCAC	GCGCCAGCC	CCAGGTGTTG	CGCCCAACCC
ORF CrCHYB	ATG ATGCTGG	CTTCGCGTCC	TGCTGTCGCG	CTAGGGGCAC	GCGCCAGCC	CCAGGTGTTG	CGCCCAACCC

	75	85	95	105	115	125	135
gen.CrCHYB	TGGTGCCTCG	ACCTGGAATG	GTGTCAAACC	TACGGCTGCA	GCCTGTGAAG	GTCGCGGACC	CCATTGTGGC
ORF CrCHYB	TGGTGCCTCG	ACCTGGAATG	GTGTCAAACC	TACGGCTGCA	GCCTGTGAAG	GTCGCGGACC	CCATTGTGGC

	145	155	165	175	185	195	205
gen.CrCHYB	GTCGGAGACC	TCGCAGGTAC	AGAGGAATCA	GACGCCGCTT	GCATCACGGC	CTGCGCGTTT	GCGCAGTGGC
ORF CrCHYB	GTCGGAGACC	TCGCAG----	-----	-----	-----	-----	-----

	215	225	235	245	255	265	275
gen.CrCHYB	GTTGCTGGTG	CAAATTAAGA	CGCACAACTA	TATAGACGAC	TGCCAGGCAA	TTGACTAGCC	AGGGACACAT
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	285	295	305	315	325	335	345
gen.CrCHYB	CTGCGTCCGC	GGGCGCAGCG	GCGGTGTGTG	GTTCGCGGGC	CGATTGAAGC	TCGCCTGGG	CTCGCGTGGA
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	355	365	375	385	395	405	415
gen.CrCHYB	AGGGACACGA	CCTGCGAGCT	CCCAGCGTTG	CCGCAAACAG	CCCTTTCAGC	TTCTAAATAT	TGCACTTGTG
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	425	435	445	455	465	475	485
gen.CrCHYB	GCGGCCGTCG	GCTGCCGGCC	GCTCGTCCTG	CCAGAGCTGT	CTCCGCCAGT	CGATTGCGAT	TCCGACCAAC
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	495	505	515	525	535	545	555
gen.CrCHYB	GACTTTCTGG	GCGCTTGGCT	GCAGGTCATG	GAGGCGCCGC	AGGAGAAGAA	GCTATCCGAA	TTTGAGCTCA
ORF CrCHYB	-----	-----	----GTCATG	GAGGCGCCGC	AGGAGAAGAA	GCTATCCGAA	TTTGAGCTCA

	565	575	585	595	605	615	625
gen.CrCHYB	AACGCCTCGA	GCGCAAGCAG	CAACGCGCCC	AGTAAGTCGC	CCACGTCCGG	GATGTTGCGT	GTGTGCTCTG
ORF CrCHYB	AACGCCTCGA	GCGCAAGCAG	CAACGCGCCC	A-----	-----	-----	-----

	635	645	655	665	675	685	695

ANHANG 3: Ergebnisse

gen.CrCHYB	TCTGGCCACC	TCGGGGGGTG	CGGTGGCGGA	CGCGTGGCCT	TCTGCCACGC	CACAACTCAC	TCCCTTCCTT
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	705	715	725	735	745	755	765
gen.CrCHYB	CCTTCCCCTA	CTGCCTCTCT	CTCCCCCTG	TCTTACCCAA	CTCCTTCCTC	TCTCTTCCCC	TTCTCTTTCT
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	775	785	795	805	815	825	835
gen.CrCHYB	CTCTTCATCT	TCTCTCCTCG	ACAGAGAGGC	CGCCACCTAC	AAGTTCTCTG	CCATCGCCGC	GACGGTGCTG
ORF CrCHYB	-----	-----	----AGAGGC	CGCCACCTAC	AAGTTCTCTG	CCATCGCCGC	GACGGTGCTG

	845	855	865	875	885	895	905
gen.CrCHYB	GTCTTGAGCA	TCGCCGTGGT	TGCCACCTAC	TACCGCTTCG	CCTGGCACTT	TGCCGAGGAC	GGCGACCTGC
ORF CrCHYB	GTCTTGAGCA	TCGCCGTGGT	TGCCACCTAC	TACCGCTTCG	CCTGGCACTT	TGCCGAGGAC	GGCGACCTGC

	915	925	935	945	955	965	975
gen.CrCHYB	CCGTGGACGA	GATGGCGGCG	ACGCTGCTGC	TGGTGTTTGG	CGGCATGGTG	AGGGAGCCAG	CGGGAGGATG
ORF CrCHYB	CCGTGGACGA	GATGGCGGCG	ACGCTGCTGC	TGGTGTTTGG	CGGCATG---	-----	-----

	985	995	1005	1015	1025	1035	1045
gen.CrCHYB	GTTTGGGCAT	GACAGCGTCC	TGGGGTTGGA	GTGGGGTGGG	GTGGGGACAA	GGCGGATGG	GTAGGAAGCG
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1055	1065	1075	1085	1095	1105	1115
gen.CrCHYB	GCAGCTCGCC	CAGGTTGTGT	GGGGTGCAGA	GTCTGGCGTG	TGCAGCTGCG	GCGTGTGCAG	GAACCATTTG
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1125	1135	1145	1155	1165	1175	1185
gen.CrCHYB	TGGACAGGGC	TGGGGGATGC	GGGGCGCGGA	ATGTGTAGGA	CGCCGGAACG	AGGGTACGGA	ATCTCATGTA
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1195	1205	1215	1225	1235	1245	1255
gen.CrCHYB	CAGCCGGTAC	AGGAGAGGGG	CCCGTACCGC	CCCACATGAC	CCTTCAGTAG	CTTCTACCAT	TTGGTGCACA
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1265	1275	1285	1295	1305	1315	1325
gen.CrCHYB	CCACTGCGGG	CGCTCAAATC	GGTCGCCCAT	AGTCCACAG	CACATCTGCC	CTTCCACCTC	CTCATCCCGC
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1335	1345	1355	1365	1375	1385	1395
gen.CrCHYB	ATCCCTCGCG	TTCCAGACCA	CGCCCCGAAA	GTCCGCAGCC	CAACACAATC	CCATTTACCA	TCCCTAACTC
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1405	1415	1425	1435	1445	1455	1465
gen.CrCHYB	TTACGCTCTC	CCAACTCCCA	TCCCACCCGC	TTCCCTCGCA	GTTCCGGCATG	GAGATGTACG	CCCCTTCGCG
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-TTCGGCATG	GAGATGTACG	CCCCTTCGCG

	1475	1485	1495	1505	1515	1525	1535
gen.CrCHYB	GCACAAGGTG	CTGTGGCAGC	ACTTTGAGCC	GGGCTGGGCG	CTGCACAAGA	GCCACCACGA	GCCGCGCACC
ORF CrCHYB	GCACAAGGTG	CTGTGGCAGC	ACTTTGAGCC	GGGCTGGGCG	CTGCACAAGA	GCCACCACGA	GCCGCGCACC

ANHANG 3: Ergebnisse

	1545	1555	1565	1575	1585	1595	1605
gen.CrCHYB	GGCCCTTTG	AGCTCAACGA	CATCTACGCC	GTCGCCAACG	CCCTGCCCGC	AATGGCGCTG	TGCGCCTACG
ORF CrCHYB	GGCCCTTTG	AGCTCAACGA	CATCTACGCC	GTCGCCAACG	CCCTGCCCGC	AATGGCGCTG	TGCGCCTACG

	1615	1625	1635	1645	1655	1665	1675
gen.CrCHYB	GCTTCTTCAC	GCCGCACGTG	GTGGGTGCCG	TTTGGGACCG	GGGGGACGAG	GGGGCCCGCG	AGAACGAGGG
ORF CrCHYB	GCTTCTTCAC	GCCGCACGTG	-----	-----	-----	-----	-----

	1685	1695	1705	1715	1725	1735	1745
gen.CrCHYB	AGCGAGGGGG	GCTGGAGAGG	AGGTGATGGA	GAGGGAGGAG	GGAGGATGGT	TTTTAGAGGT	GAAGGCGGTG
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1755	1765	1775	1785	1795	1805	1815
gen.CrCHYB	GATGCTTTTG	TCATACTACG	CGTGCTCCAT	CTCGGGCGGG	GCGGTGGCAT	CCCATTCTTC	CCATTTCCCA
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1825	1835	1845	1855	1865	1875	1885
gen.CrCHYB	CCACTACCTG	CCTACCTCCC	ATCCCAAACC	CCCAACCCAG	ATCGGCGGCG	TGTGCTTCGG	CGCGGGTCTG
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	ATCGGCGGCG	TGTGCTTCGG	CGCGGGTCTG

	1895	1905	1915	1925	1935	1945	1955
gen.CrCHYB	GGC ATCACGC	TGTTCGGCAT	CGCCTACATG	TTCTTCCACG	ACGGCCTGGT	GCACCGCCGC	TTCCCCGTGG
ORF CrCHYB	GGCATCACGC	TGTTCGGCAT	CGCCTACAT-	-----	-----	-----	-----

	1965	1975	1985	1995	2005	2015	2025
gen.CrCHYB	GGCCCATCGC	CAACGTGAGT	GTGTGTGTGC	GGGGCTGGGC	TGGGCTGGGT	GTGCTTGGGC	TGGGCTGCGT
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2035	2045	2055	2065	2075	2085	2095
gen.CrCHYB	GCTAGGCTGG	GCTGTGTGTG	CTTGGGCTGG	GCGGTGTGTG	CTTGGGCTTT	TGTGTGCTGG	GCGGGGCTGT
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2105	2115	2125	2135	2145	2155	2165
gen.CrCHYB	GCCTGCCGGG	CTGTGTGGGC	TGGCCTGTGT	GCTTGGGCTT	GTGTGTGCGG	ATGCGTGCGA	CTGTGTGTGA
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2175	2185	2195	2205	2215	2225	2235
gen.CrCHYB	CCGGTATAGT	GGGGCTGGG	CAAGAGCAAT	TGGGTATGCG	CGCGCGAAGG	GCACGCAGGC	GCTGCACACT
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2245	2255	2265	2275	2285	2295	2305
gen.CrCHYB	TGGTGC GGCT	CACTAGCACA	CGCACGGGTG	TCAATGCCCG	TCGCTACCGC	CGGCTGTGTG	CGCCATGGCC
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2315	2325	2335	2345	2355	2365	2375
gen.CrCHYB	GCCCAGTCA	ACGAATGAAG	AGACCGACGA	CCTGACTTCT	GGTCTGGTCC	TGACGACGTC	CTGACCCCTT
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2385	2395	2405	2415	2425	2435	2445
gen.CrCHYB	GTCTGGTCCG	GTCTTCTGTC	CTGACTTCTG	GCCTGGTCC	GTTTTTCTT	TCCGCCTCCG	CAGCTGCCGT
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---CTGCCGT

	2455	2465	2475	2485	2495	2505	2515
gen.CrCHYB	ACATGAAGCG	CATCATGGTG	GCTCATCAGA	TCCACCACAC	CAACAAGTTC	GGCGGCGTGC	CCTTCGGCAT
ORF CrCHYB	ACATGAAGCG	CATCATGGTG	GCTCATCAGA	TCCACCACAC	CAACAAGTTC	GGCGGCGTGC	CCTTCGGCAT

	2525	2535	2545	2555	2565	2575	2585
gen.CrCHYB	GTTTCTGGGC	GTGCAGGTGC	GGGCCGGGAG	AAGGGGGCGG	CGGGGTCGGG	TGGGGTAGGG	GTTGGAGGAG
ORF CrCHYB	GTTTCTGGGC	GTGCAG----	-----	-----	-----	-----	-----

	2595	2605	2615	2625	2635	2645	2655
gen.CrCHYB	GAAAGGCGTA	TGCGCCGTGG	GCCCGTGGCG	AGCGGCGGAT	CGGGCGGGGA	GGAGTGC CGG	GGGAGGAGTG
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2665	2675	2685	2695	2705	2715	2725
gen.CrCHYB	CGCGGCGAGC	AGTGGGTGGG	GAGGAACGAG	GCGGATCGAG	GCGCCCGGCT	CGTGC GGCG	CCGCCGGAGG
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2735	2745	2755	2765	2775	2785	2795
gen.CrCHYB	CCTGGCCCTG	GCAGTGGGAT	TTCTCGTCTC	CCCGTACCTC	TGTTTCTGTG	CGCTTACCTC	TTCTTCGCCC
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2805	2815	2825	2835	2845	2855	2865
gen.CrCHYB	GCCTGCCCTT	CTCCTCCCC	CCTTAGGAGC	TGGAGGCGGT	GCCGGGCGGC	AAGGAGGAGC	TGGACAAGCT
ORF CrCHYB	-----	-----	-----GAGC	TGGAGGCGGT	GCCGGGCGGC	AAGGAGGAGC	TGGACAAGCT

	2875	2885	2895	2905	2915	2925	2935
gen.CrCHYB	CATGGCCGAT	CTGGAGGCGC	GCGAGGCGGC	AGCAGCCAAG	GCCGCCGGCT	CCTCGTAAAG	CGGCCGGCGA
ORF CrCHYB	CATGGCCGAT	CTGGAGGCGC	GCGAGGCGGC	AGCAGCCAAG	GCCGCCGGCT	CCTCGTAA--	-----

	2945	2955	2965	2975	2985	2995	3005
gen.CrCHYB	CACCGGGCAT	AATAATGCCG	CCGCCGACAC	CGGCGACGGT	CTAGCGCCGG	CCTCCTTTAT	TGGCGGCGCC
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3015	3025	3035	3045	3055	3065	3075
gen.CrCHYB	TAATTAGCGG	CGGAATTAGA	TTTTCGAAGC	AAGAGAGCTG	TCGCTGGCCC	CGGTCGGACT	CCGAGAGCCC
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3085	3095	3105	3115	3125	3135	3145
gen.CrCHYB	CTGCCAGTGT	CGCCAACACC	TCGCGGCGAC	AGAGGCAGGC	AGCCGGGCCC	AGTGACGCAC	ACGCGGTTAC
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3155	3165	3175	3185	3195	3205	3215
gen.CrCHYB	CGCGCTGCC	GCTGCCCAT	GTGAAAGCAA	GGCGGCGGC	GGCGGCAGCT	GGCGCGGTGT	GCGCAAAAAG
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3225	3235	3245	3255	3265	3275	3285
gen.CrCHYB	GCGTCGGTGC	TACACCTCCG	CGGCTGCTTG	GTGATCTGCT	CTGCGTGGTG	ACACGAGCGA	GCAACGTCTT
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3295	3305	3315	3325	3335	3345	3355
gen.CrCHYB	AGGAAAGACC	GGATCGCAGC	GTCCTGGGGG	CACGCTGTTT	GAAGCGTCAC	GGAGGCACGC	GCATCGGAGC
ORF CrCHYB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ANHANG 3: Ergebnisse

```
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      3365      3375      3385      3395      3405      3415      3425
gen.CrCHYB CACTGCCACT GTCACAGAAC GACCTAGCGG GTGGGACCTG GGGACTGTTG TATGAGTGTG GCGTTCAAAT
ORF CrCHYB -----
```

```
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      3435      3445      3455      3465      3475      3485      3495
gen.CrCHYB CCATGTGCTT CGGGTCGTGG AGCGGGCGAC GGACCCTCGC TCGCGGTGTC GTGCTCATAA TCGGGCTCTG
ORF CrCHYB -----
```

3.4.2.4. CrZymC

Für die Amplifizierung einer Teilsequenz des Gens ZymC wurden die Kombination CrZymC-a2p (forward Primer) und CrZYMC-e2m (reverse Primer) verwendet. Im Folgenden sind dargestellt:

Die putative Gensequenz von ZymC („put.Gense“), der putative ORF von ZymC („put. ORF-S“), in rot farbig markiert ist die Sequenz des forward Primers, in blau farbig markiert die invers komplementierte Sequenz des reverse Primers.

	5	15	25	35	45	55	65
put. Gense	ACCTTCTCCC	CCCACCCCGC	CAACAACAAG	AACAAGATGG	CGCGGCGCTC	GGCCGCACTG	CTGCTGGTGT
put. ORF-S	ACCTTCTCCC	CCCACCCCGC	CAACAACAAG	AACAAGATGG	CGCGGCGCTC	GGCCGCACTG	CTGCTG----

	75	85	95	105	115	125	135
put. Gense	GCTGCGTGGC	GGCGCTGGCA	GTCGCCTGCG	GCGCGCGGCG	CGAGCCCGCG	GCGCTGCGCG	GTGCCGACGT
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	145	155	165	175	185	195	205
put. Gense	GTCCGCCAAC	GCCGCCGCCT	GGACGTGCTC	GGCACTGCGG	CTGCGCGACA	CACCCGCCAA	CGCCGCCGCC
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	215	225	235	245	255	265	275
put. Gense	GTGCGCGTGA	GTTGCCAGTT	GTCGTGACGC	TATAGGGGGG	CAGCGGGATA	TGGGTGTGCC	CCGTACAGCG
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	285	295	305	315	325	335	345
put. Gense	TGCGCGGCGT	CGGGGGGTTA	TGTGCAAGGT	TATGTGTTGC	GCTTTATGCG	GTTGCGCAAG	AGTTGCGCAA
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	355	365	375	385	395	405	415
put. Gense	CGCGCCGCC	GACCTATCCC	TCCCTCCTCC	ATGCTCCCT	TCCCGGCTTC	CGCTTACCTC	CCCGCCCTCT
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	425	435	445	455	465	475	485
put. Gense	GCCCCCTTCC	CCGGGCCCCCT	CCCCCACCAC	CCCACCCCGG	GCCCCCTGCA	GTGGATCCAG	GAGCGGCTGT
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-TGGATCCAG	GAGCGGCTGT

	495	505	515	525	535	545	555
put. Gense	CCCGTTCGCG	CAAGGACATT	GAGGACGAGC	CCGTGTACTT	CGGCATGAAG	TTCGAGGTGC	CGCCCCACCG
put. ORF-S	CCCGTTCGCG	CAAGGACATT	GAGGACGAGC	CCGTGTACTT	CGGCATGAAG	TTCGAGGTGC	CGCCCCACCG

	565	575	585	595	605	615	625
put. Gense	CCACGACAAG	TTTATGGAGG	AGTGGTGGGT	GCGCGGGGCG	GGGGCGCAGG	GGTGCGGGGT	AGGGAGCCAG
put. ORF-S	CCACGACAAG	TTTATGGAGG	AGTG-----	-----	-----	-----	-----

ANHANG 3: Ergebnisse

	635	645	655	665	675	685	695
put. Gense	TCCAAGTAGG	TGCGTGGTTC	AGGGGGGCGC	GGATCAGGGG	TCAGCGATAA	GGGGTGGCGC	TTTGAGGCTG
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	705	715	725	735	745	755	765
put. Gense	GTATGTGGGG	CGGTGGGGCG	GCAAGTGCCA	GAGGCAGGTG	TGGGTGCGCC	CATGTCCCAC	CGAGTCGCAT
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	775	785	795	805	815	825	835
put. Gense	ACGGTAGCAC	CTGCGGCATA	TGCCAGCAGA	GCACACCCGG	ACGTGGCTCC	CCACCCCACC	ACCCAGGCCA
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	845	855	865	875	885	895	905
put. Gense	CCCCGCCAC	CACCCACCAC	CCATGAACCA	CCCCACCCG	CCCCACCCAT	CACCCCGCCC	CACCAGGATG
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----GATG

	915	925	935	945	955	965	975
put. Gense	CGCACTGAGA	AGACCTGCAG	CAAGGCCAAG	GGACTGGACT	TCTACCAGAT	GTCCAAGACC	CTCACCGACA
put. ORF-S	CGCACTGAGA	AGACCTGCAG	CAAGGCCAAG	GGACTGGACT	TCTACCAGAT	GTCCAAGACC	CTCACCGACA

	985	995	1005	1015	1025	1035	1045
put. Gense	ACACCGACTT	CTGGGTGGGG	CGGGGACGCT	GTGCGTGTGT	GCGCGTGGGT	GCGTGGGGAT	GTGCGTGC GC
put. ORF-S	ACACCGACTT	CTGG-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1055	1065	1075	1085	1095	1105	1115
put. Gense	AAAAAGGGGG	CTGGGGCGGG	TCTGCAAGGG	CAGGAATGCT	GGGGTGGCGA	AGCCTGGTTG	AGCCATGGGC
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1125	1135	1145	1155	1165	1175	1185
put. Gense	TAGATTTGGG	TCGAGCACCG	GGGCCCGCC	TGCCCCATC	GCAGAGTGCC	TGTGCTGCAC	CCTGCGCCGC
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1195	1205	1215	1225	1235	1245	1255
put. Gense	CCCGGCCCGC	CATTGTGACT	TATCACTCCG	TTCCAACGT	CTTTACCCCC	CGACCCCACC	CCACCCAAA
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1265	1275	1285	1295	1305	1315	1325
put. Gense	CACACGTAGA	CCTACACCGA	GTGGGACACC	TTCGAGGACT	GGATGGACCA	CTGCGAGTGA	GTGTTGAGGG
put. ORF-S	-----A	CCTACACCGA	GTGGGACACC	TTCGAGGACT	GGATGGACCA	CTGCGA----	-----

	1335	1345	1355	1365	1375	1385	1395
put. Gense	GAGGGGGCCC	GGGGCGGGTC	TGGTGGGGC	CTGTGCTGCG	TCGCCTCGGC	AGCGGCGAGG	GAGGCGAGTG
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1405	1415	1425	1435	1445	1455	1465
put. Gense	CACGGGTACC	TGCATCGGCC	GCTGCTGCTG	CGCTGCCACA	AGGGAGTTCC	TGCCCGTGTG	CTTGACAGCA
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1475	1485	1495	1505	1515	1525	1535
put. Gense	ATACCGTAAG	AGTACACCGC	CTGCCATCTG	CGGCCTCCTG	CCCATCCCCG	TCGCCCTGCC	CCCTGCCCCC
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

put. Gense	1545	1555	1565	1575	1585	1595	1605
put. ORF-S	GATTCCGGCG	ACAATTCCGG	CATGCAAAGA	GTCCTCGACT	CTTGGGACCT	ACTTCGTTGG	GCTTGGGCGA
put. Gense	1615	1625	1635	1645	1655	1665	1675
put. ORF-S	GTAACGCCCG	CCCCTTCCCC	CGCTCCCTTC	ATTGCCACCC	CCCACCCCCA	CAGGACCAGC	GACGT GCGGC
put. Gense	1685	1695	1705	1715	1725	1735	1745
put. ORF-S	ACTTCATGGA	CTTTA TTGAG	GACAACGACA	TCCTGTTCAC	ACTCTACCCC	CTGGAGGCTG	CAGGCGACAC
put. Gense	1755	1765	1775	1785	1795	1805	1815
put. ORF-S	CAAGCGGGTG	AGCGCCTGCC	CGCCCCCCCA	AACATATTCC	CGCCCCCCCC	GCCCCTTAT	TGCTTGGACG
put. Gense	1825	1835	1845	1855	1865	1875	1885
put. ORF-S	CTTACCCATC	TGAACCATCA	ACACCCCCCG	CCTTCCCCGT	TTCCGGAATG	GTGAGAACAC	CACCCAGGCA
put. Gense	1895	1905	1915	1925	1935	1945	1955
put. ORF-S	CCCTCCTCAC	CACCCTCGCC	CCGTGTGCCG	CCCACAGGAG	TACCGCTCTG	CCCGTGGCCC	CGAGGTTGCC
put. Gense	1965	1975	1985	1995	2005	2015	2025
put. ORF-S	CGCCGCGCCG	CCGAGCGCTC	CAGCTCGCGC	GTGACCCGGC	GCCGCGACCG	CGAGATGGAC	GCAGACGAGG
put. Gense	2035	2045	2055	2065	2075	2085	2095
put. ORF-S	TGGACCCTCG	CGAGACCACC	GCCCACATCG	CCGTCAACTT	CCACGTGCCG	CCCTCCACCG	TGAGTAAACG
put. Gense	2105	2115	2125	2135	2145	2155	2165
put. ORF-S	TGGCAGTGGG	TAGGGAGTTG	CTGACAGCCG	CCTTGGAGCT	GACCCAGATG	CTCGGTGGC	CCACACGCGG
put. Gense	2175	2185	2195	2205	2215	2225	2235
put. ORF-S	CCCACCAGCC	AGCTGACCCC	CGTAAGGCAA	CAACGGCTAG	CGTCAGACCC	AACCTACCCC	ATATCCGCGG
put. Gense	2245	2255	2265	2275	2285	2295	2305
put. ORF-S	TTCACCCATC	CAAACCGCAT	CCCTACCCCA	CCCCGCCCA	AGACTCCTCC	ATGCTCCCC	AAAACCTCAT
put. Gense	2315	2325	2335	2345	2355	2365	2375
put. ORF-S	GCCTCCCCTC	CAGCGTTTCC	CACGATCCTT	TCCTTCCCC	CCCCCCTAAC	ACGCAGCACA	CCGAGTTCGT
put. Gense	2385	2395	2405	2415	2425	2435	2445
put. ORF-S	GGACG CGTTT	GAGGACATCC	AGGAC CGCGT	GGTGGACAAG	GAGGACAGCA	ACCGCTTCTA	CGTGTGAGTG

ANHANG 3: Ergebnisse

	2455	2465	2475	2485	2495	2505	2515
put. Gense	GAAGGACGCA	AGGGGCGTGG	GAGGGTAATC	TGGCGGGTTT	GAGGTTTGCG	GGCTTCGTCC	TGCGTGCGAG
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2525	2535	2545	2555	2565	2575	2585
put. Gense	AATATGAGTG	TAGAGCTGCG	TGTGGGGTGT	AGATGGTGCC	GACATGTACA	TGTGGCGGAC	CCCTGCCCCA
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2595	2605	2615	2625	2635	2645	2655
put. Gense	CGTACACACG	CCCTGCCCAC	CGTCTGCTG	CTGTGCCCCC	CCCCCCCCCC	CGCAGGCTGC	GCAAGTTCGC
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----GCTGC	GCAAGTTCGC

	2665	2675	2685	2695	2705	2715	2725
put. Gense	CACCATGAAC	CGTGAGTGTG	CGCGGGCACC	TGACTGGGTA	ACGAGACTTG	TGTGGGAACC	CAGTTGACGC
put. ORF-S	CACCATGAAC	C-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2735	2745	2755	2765	2775	2785	2795
put. Gense	CCCAGCCTTA	TGCGTACACA	ACCAGGCTG	CCCTGACCAT	TCTTTCCTCA	ACCCACTTCG	CTACCCCTCC
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	2805	2815	2825	2835	2845	2855	2865
put. Gense	CCTCCCCTCG	TCCCCTCCCC	TCCCTCGTC	CCCTCCCCTC	GCTCCCCTCC	TCCAGACCA	CTACGTGCTG
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----ACCA	CTACGTGCTG

	2875	2885	2895	2905	2915	2925	2935
put. Gense	CGCGGCGGCT	GGGATGACCT	GGATGCCTAC	ATGGACCACA	TCACCAGCAA	GACATTCCAC	AACCTGCGCG
put. ORF-S	CGCGGCGGCT	GGGATGACCT	GGATGCCTAC	ATGGACCACA	TCACCAGCAA	GACATTCCAC	AACCTGCGCG

	2945	2955	2965	2975	2985	2995	3005
put. Gense	AGTGAGTGGC	GGGGTCGTAG	GCGGGTGTAG	GAGCGGATGT	GTGTCAGTGC	CCCCTCGTGG	CAGTGACAGT
put. ORF-S	A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3015	3025	3035	3045	3055	3065	3075
put. Gense	GGGACCACGG	GGGAGTGTG	AAGGGCGGGG	TTACACGCA	GCCTGGCGCA	CTCGGCGGCG	TCTTGCAATTT
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3085	3095	3105	3115	3125	3135	3145
put. Gense	GTTACTACTAG	CGTACATTTT	GCTGATGCTT	ATCCCTTGCG	TTAACGTTC	CATTGCAACA	CAGTGTGCT
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3155	3165	3175	3185	3195	3205	3215
put. Gense	CTCACCTGGC	CATGCCGACG	CCTCACCACT	CAACACGCCG	CCACTACACC	CTGCACAACA	CAGGATGACC
put. ORF-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----GATGACC

	3225	3235	3245	3255	3265	3275	3285
put. Gense	GAGGACAACG	ACATTGAGTG	GTACGCCGAG	CCCTTCCAAG	TTCTGGCTGG	CAGTGAGGAT	GAGCGGATGG
put. ORF-S	GAGGACAACG	ACATTGAGTG	GTACGCCGAG	CCCTTCCAAG	TTCTGGCTGG	CAGTGAGGAT	GAGCGGATGG

	3295	3305					
put. Gense	ACGCTGCTGT	CAAGCGCGCC	TAA				
put. ORF-S	ACGCTGCTGT	CAAGCGCGCC	TAA				

3.4.2.5. CrEZY15

Für die Amplifizierung einer Teilsequenz des Gens EZY15 wurden die Kombination CrEZY15-a1p (forward Primer) und CrEZY15-e1m (reverse Primer) verwendet. Im Folgenden sind dargestellt:

Der putative ORF EZY15 („ORF-EZY15“), in rot farbig markiert ist die Sequenz des forward Primers, in blau farbig markiert die invers komplementierte Sequenz des reverse Primers.

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5          15          25          35          45          55          65
ORF-EZY15 atgctgctgcgc ctcgctgcac cacggttget tctgctgcgcgt cgacgcaaga ccaaacacgc gcggtcgcgt

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      75          85          95          105         115         125         135
ORF-EZY15 ctgccgctcg cccgactcgc cgcggtctcc tgctcggtct cggcgcgtct ctggcgggcc tgcctccgg

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      145         155         165         175         185         195         205
ORF-EZY15 cgccaacagc gcgcaggctg cccagctctc agatctggtg aagccgctgg ttgtgtccat ggatgccaac

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      215         225         235         245         255         265         275
ORF-EZY15 ggcgacggtg tgctgtcggg ggacgaggtg cgcggtgcca tccagcgcag cagcggccag gcggccccc

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      285         295         305         315         325         335         345
ORF-EZY15 gcctgactgt ggttcaggac gtaatggcgc ccgtggactt caacaacaat ggggaagtca gtgtggacga

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      355         365         375         385         395         405         415
ORF-EZY15 gttctctcgc ggcattggctc tggagctggg cgtggacgag cgtgggatgc gcgtcatgga gcgcgacggc

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      425         435         445         455         465         475         485
ORF-EZY15 ggcgcggcgc tgagccgcgc cgagctggcg gcgggacctg gcgacctggg ccgcaacggc gacgaggtgc

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      495         505         515         525         535         545         555
ORF-EZY15 tgcgctggtc gttcgacatg gccgatcaga accgcgacgg gcgcctgaac gcggtgagg cgcagcgggc

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| ..
      565         575         585         595         605
ORF-EZY15 catgaacatg atgccaccg gcttgctggg tgactacggc gagggcctgt ga

```

3.4.3. Übersicht über die Präsenz von EZY-Genen in der EST-Datenbank von *C. reinhardtii*

EST		EZY																						
Accession Numbers	Stamm	Untersuchte Zellen	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
BG-XXX	cc1690	veg. Zellen			1	2	19	2	4	4	5	11	3			12	3	2			1	2	5	
BE-XXX	cc1690	veg. Zellen	1			1	6			5	16	2	1	2	4							9		
BI-XXX	cc1690	Stress II	6	4	2	7			8	12	5	1	7	3		7	18	10	1		1	6	2	
BM-XXX	cc1690	Stress II		1	2	2	3		5				4				3	1				1	1	
BU-XXX	cc1690																							
BU-XXX	cc1691	Gameten	3	2			2		3	3		8		2		8	4	5	2	2		2	5	
AV-622 bis-630		0,04-5% CO ₂		5	1		2			2	9	2	1	2	1		3	4	1	1	19	5		
AV-634 bis-640		5% CO ₂		3			2				7						2				1	4		
AW-562 bis-707	cc125	Nutrient repleat -S, -Fe									7		2			5								
BQ-XXX	cc 1690	Deflagellation								2	19	4	1	2			5						9	
BP-XXX	C9	various conditions	2	1					1	2	16	1	2	1		1			1		42	2	1	
BF-XXX	cc1690	Stress I	2							2						8								
CF-XXX	cc1690	Stress III								4														
AV-389 bis-392	C9	unknown		2	1												1	3	1			1		
Gesamt			14	23	9	8	41	4	22	36	84	27	18	15	3	45	39	25	6	3	64	41	14	
Anzahl EST aus vegetativen Zellkulturen ("BG-XXX + BE-XXX")			0	1	1	3	25	2	4	9	21	11	5	1	2	16	3	2	0	0	1	11	5	
Prozentualer Anteil aus vegetativen Zellkulturen			0	4	11	38	61	50	18	25	25	41	28	7	67	36	8	8	0	0	2	27	36	

Abbildung A-12) Übersicht über die Anzahl der detektierten EST-Sequenzen der verschiedenen EZY-Gene aus der Veröffentlichung von Kubo und Mitarbeitern (2008). Aufgrund der Accessionnummern der EST-Sequenzen (z.B. alle Sequenzen mit BG- und einer folgenden Zahl, in der Tabelle als BG-XXX benannt) konnte das zugehörige Zellmaterial (u.a. Stamm und Anzuchtbedingungen) ermittelt werden. Bestimmt wurde zusätzlich der Anteil der EST-Sequenzen, die in vegetativem Zellmaterial nachgewiesen wurden.

3.5. Übersicht über die Experimente zur Etablierung eines In-vitro-Assays zur Untersuchung der BKT

Enzymquelle	Substratquelle	Pufferreagenz	Solubilisierungsagenz	Aufschlussverfahren	Bemerkung
CrBKT 5.1 in pET 44, BL21	β -Carotin in Chloroform	TRIS	-	Lysozym	Substrat löst sich nicht, Keine Bande im Proteingel nachweisbar

Tabelle A-10) Übersicht über den erfolgten in-vitro-Assay mit CrBKT in pET44 (Daten aus Schmidt 2007).

Enzymquelle	Substratquelle	Pufferreagenz	Solubilisierungsagenz	Aufschlussverfahren
CrBKT 5.1 pBAD	β -Carotin	TRIS	MGDG; DGDG	Lysozym
CrBKT 5.1 pBAD	β -XL1 sowie Z-XL1	TRIS	DGDG	Lysozym
CrBKT 5.1 pBAD sowie Δ präCrBKT (Zx)	β -XL1 sowie Z-XL1	TRIS	TWEEN 60	Lysozym
CrBKT 5.1 pBAD sowie Δ präCrBKT (Zx)	β -XL1 sowie Z-XL1	TRIS oder TRICINE	TWEEN 60	French-Press
CrBKT 5.1 pBAD sowie Δ präCrBKT (β)	β -XL1 sowie Z-XL1	TRICINE	TWEEN 60	French-Press
Δ präCrBKT (Zx)	β -XL1 sowie Z-XL1	TRICINE	-	French-Press

Tabelle A-11) Übersicht über den erfolgten in-vitro-Assay mit CrBKT in pBAD; Δ präCrBKT (Zx): Konstrukt Δ präCrBKT in Zeaxanthin produzierenden XL1- Blue-Zellen; Δ präCrBKT (β): Konstrukt Δ präCrBKT in β -Carotin produzierenden XL1-Blue-Zellen; β -XL1: β -Carotin synthetisierende XL1-Blue-zellen, Z-XL1: Zeaxanthin produzierende XL1-Blue-Zellen (Daten aus Köhler 2008).