



Anti-Freeze-Proteine in Meereis-Diatomeen

Ihre Diversität und Expression am Beispiel von *Fragilariopsis curta*

Diplomarbeit

Fachhochschule Aachen, Standort Jülich

Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften und Technik

Studiengang Bioingenieurwesen

Erstgutachter: Prof. Dr. Marcus Baumann

Zweitgutachter: Dipl.-Biol. Maddalena Bayer

Christiane Uhlig

November 2006

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in der Arbeitsgruppe Meereis durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und verfasst zu haben. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Bremerhaven, den 20. November 2006

(Christiane Uhlig)

Vielen lieben Dank

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Marcus Baumann (FH Aachen, Standort Jülich), der mir die Durchführung dieser Arbeit am AWI ermöglicht und die Betreuung und Begutachtung mit großem Interesse übernommen hat.

Maddalena Bayer möchte ich sehr für die Stellung des Themas und die direkte Betreuung der Arbeit danken. Dies gilt insbesondere der freundschaftlichen Zusammenarbeit inklusive der Hilfe bei nächtlichen Probenahmeaktionen, sowie für die nette Abwechslung von der Arbeit.

Bei Dr. Klaus Valentin bedanke ich mich für die zahlreichen Ratschläge und Hilfestellungen bei allen Fragen zur Planung der Arbeit und zu molekularbiologischen Problemen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. Gerhard Dieckmann, der mir die Durchführung der Diplomarbeit in seiner AG Meereis ermöglicht hat. Des Weiteren möchte ich mich bei ihm bedanken, dass er mir die Gelegenheit gegeben hat an einer unvergesslichen Expedition in die Antarktis teilzunehmen und mich so über das Thema hinaus für die Polarforschung begeistert hat.

Erika Allhusen, Andreas Krell, Birte Gerdes, Jessica Kegel und Nikolai Hoch möchte ich für die liebevolle Aufnahme in die große Meereis-Familie danken. Sie standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und haben mir meine Zeit in Bremerhaven mit vielen schönen Abenden sehr angenehm gemacht.

Für die freundliche Hilfe und zahlreichen Ratschläge bei diversen Problemen möchte ich mich auch bei zahlreichen Kollegen der AG Cembella und AG Medlin bedanken.

Ein besonders lieber Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner Studienzeit liebevoll und finanziell unterstützt haben und mich immer wieder motiviert haben meinen Weg zu gehen.

Ich bedanke mich bei meinen Schwestern Barbara und Johanna und meinen Freunden, die trotz der Entfernung immer ein offenes Ohr für mich hatten. Meinen beiden Sandras danke ich besonders für das gute WG-Zusammenleben in Jülich und Bremerhaven. Michael Köppinger möchte ich für seine Geduld und liebevolle Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung und Ziel der Arbeit	1
2 Methoden	3
2.1 Suche nach Isoformen von AFPs in <i>Fragilariopsis curta</i>	3
2.1.1 PCR und Primerdesign	3
2.1.2 Klonierung	8
2.1.3 Plasmidpräparation	12
2.1.4 Sequenzierung	13
2.1.5 Analyse der Sequenzen	16
2.1.6 Design der Primer für die quantifizierende PCR	17
2.2 Kultivierung	18
2.2.1 Herkunft der Kultur und Vorkultur	18
2.2.2 Vorversuche	18
2.2.3 Hauptversuch	19
2.2.4 Probenahme	20
2.2.5 Bestimmung der Zellzahl	22
2.2.6 Bestimmung der Quanten-Ausbeute	22
2.2.7 pH und Nährstoffanalyse	24
2.3 RNA-Extraktion und Expressionsanalyse	25
2.3.1 RNA-Extraktion	25
2.3.2 Kontrolle der Qualität und Reinheit der RNA	26
2.3.3 Expressionsanalyse	27
2.3.4 cDNA-Synthese	27
2.3.5 Herstellung der Standards	29
2.3.6 Halbquantitative PCR	29
2.3.7 Real-Time-PCR	31
3 Ergebnisse	33
3.1 Isoformen von AFPs in <i>Fragilariopsis curta</i>	33
3.1.1 Primer zur Amplifikation aus genomischer DNA	33
3.1.2 PCR	35
3.1.3 Restriktionsverdau der Plasmide	35
3.1.4 Isoformen von AFPs	35

3.1.5	Primer für die quantifizierende PCR	37
3.2	Kultivierung	39
3.2.1	Vorversuche	39
3.2.2	Hauptversuch	42
3.3	RNA-Extraktion und Expressionsanalyse	48
3.3.1	RNA-Extraktion	48
3.3.2	Halbquantitative PCR	51
3.3.3	Expression	53
3.3.4	Real-Time-PCR	55
4	Diskussion	61
4.1	AFPs in <i>Fragilariopsis curta</i>	61
4.2	Versuchsbedingungen	62
4.3	Physiologische Anpassung	63
4.4	Expressionsanalyse	65
4.4.1	Regulation der Haushaltsgene	66
4.4.2	Regulation ausgewählter AFPs	67
4.5	Ausblick	69
5	Zusammenfassung	70
	Abbildungsverzeichnis	71
	Tabellenverzeichnis	72
	Literaturverzeichnis	73
A	Puffer- und Medien	78
B	Ergebnisse	81
C	Geräte und Materialien	90

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AFP	Anti-Freeze-Protein (engl.: anti freeze protein)
bp	Basenpaare (engl.: base pair)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: complementary desoxyribonucleic acid)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
ds	doppelsträngig (engl.: double stranded)
dNTP	Desoxy Ribonukleosid Triphosphat
EPS	Extrazelluläre Polymerische Substanzen
F_0	Grundfluoreszenz
F_m	maximale Fluoreszenz
F_v	variable Fluoreszenz, $F_v = F_m - F_0$
\vec{g}	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s
G	Guanin
kb	Kilobasenpaare (engl.: kilo base pair)
lacZ	Gen, das im lac-Operon für β -Galactosidase codiert
MA	Gen aus dem Kohlweißling, diente in dieser Arbeit als interner Standard
N	Zellzahl: Zellen/mL, Z/mL
NSP	Gen aus dem Kohlweißling, diente in dieser Arbeit als interner Standard
PE	Poly-Ethylen
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
Q_A	Plastochinon
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNA MA	künstliche RNA eines Gens aus dem aus dem Kohlweißling, diente in dieser Arbeit als interner Standard
ss	einzelsträngig (engl.: single stranded)
T	Thymin
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
X-Gal	künstliches Substrat für β -Galactosidase im Blau-Weiß-Test, 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Z	Zellen

1 Einleitung und Ziel der Arbeit

Rund ein Zehntel der Meeresoberfläche der Erde wird ständig durch Meereis bedeckt, wobei dessen Dicke und Ausdehnung starken saisonalen Schwankungen unterliegen. Mit seiner maximalen Ausdehnung von $35 \cdot 10^6 \text{ km}^2$ [PARKINSON UND GLOERSEN, 1993] stellt Meereis einen bedeutenden Lebensraum für Organismen dar, obwohl es zunächst den Eindruck einer kargen Kältewüste erweckt. Die Dichte der Organismen im Meereis ist darüber hinaus sogar wesentlich höher als die im darunter befindlichen Meerwasser [EICKEN, 1992; GARRISON, 1983]. So tragen allein die photosynthetisch aktiven Organismen innerhalb des antarktischen Meereises mit 63 bis 70 Tg Kohlenstoff pro Jahr ca. 5 % zur Primärproduktion der antarktischen Meereis-Gebiete bei [LIZOTTE, 2001].

Während des Gefrierens von Meerwasser werden die im Wasser gelösten Stoffe (insbesondere Salze) nicht in die Kristallstruktur des Eises eingebaut, sondern konzentrieren sich in so genannten Solekanälen, die die feste Eismatrix durchziehen. Planktische Organismen bleiben während der Eisbildung an Eiskristallen haften und werden so in den Solekanälen in das Eis eingeschlossen [EICKEN, 1992].

Eine große Gruppe der Organismen, die im Meereis leben und sich sogar noch vermehren können, stellen die Diatomeen (*Bacillariophyta*) dar [KIRST UND WIENCKE, 1995]. Diatomeen sind einzellige oder kettenbildende photosynthetisch aktive Mikroalgen, die als spezifisches Merkmal eine silikathaltige Zellwand besitzen. Eine im antarktischen Meereis häufig zu findende Art ist *Fragilariopsis curta* [SCOTT ET AL., 1994, LIZOTTE, 2001, GARRISON ET AL., 1983]. Bei RYAN ET AL. (2004) stellte sie sich im Vergleich zu anderen untersuchten Arten als relativ unempfindlich gegen verringerte Salzkonzentrationen heraus. Das lässt eine gute Anpassung an den Lebensraum Meereis mit stark unterschiedlichen Salzgehalten während der Eisbildung und Eisschmelze vermuten. *F. curta* diente in der vorliegenden Arbeit als Modellorganismus für die durchgeführten Untersuchungen.

Im Meereis sind die Organismen im Vergleich zum gepufferten System der Wassersäule extremen und zugleich stark schwankenden physikalischen und chemischen Bedingungen ausgesetzt. Geringe Lichtintensitäten, niedrige Temperaturen von bis zu -20°C sowie Veränderungen der Zusammensetzung der Sole in Abhängigkeit von Temperatur und Besiedlung erfordern spezielle Anpassungsmechanismen der Organismen. Anorganische Nährstoffe und Kohlendioxid sind in Folge der biologischen Aktivität schnell verbraucht. Sauerstoff, gelöste organische Substanzen und Ammonium hingegen sammeln sich als Stoffwechselprodukte an [THOMAS UND DIECKMANN, 2002]. Aufgrund der schnellen Veränderungen der oben genannten Faktoren müssen die Anpassungsmechanismen außerdem regulierbar sein [MOCK ET AL., 2005].

Bekannte Anpassungsmechanismen, die mit verringerten Temperaturen in Verbindung stehen, sind die Bildung von Cysten als Überdauerungsstadien [STOECKER ET AL. 1998] und die Veränderung der Fettsäurezusammensetzung der Membranen, um die Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen zu erhalten, Enzyme, die auch bei niedrigen Tempe-

raturen aktiv bleiben [GOUNOT UND RUSSEL, 1999] sowie die Bildung von Anti-Freeze-Proteinen (AFPs). AFPs wirken auf die Bildung von Eis ein. Sie können die Eiskristallisation, den primären Prozess der Eisbildung, das Wachstum von Eis und die anschließende Rekristallisation beeinflussen [KNIGHT ET AL., 1991, RAYMOND UND KNIGHT, 2003, DU ET AL., 2003]. Eisbildung stellt in sofern eine Gefahr für die Organismen dar, als dass große Eiskristalle die Zelle mechanisch schädigen können. Außerdem ist Wasser in Eiskristallen fest gebunden und steht den Organismen nicht mehr zur Verfügung. Dieser Trockenstress wird durch die gleichzeitige Konzentrierung der Sole verstärkt. Die Verhinderung der Kristallisation des Wassers in den Solekanälchen dient außerdem der Erhaltung des Lebensraumes der Meereisorganismen [KREMBS ET AL., 2002].

AFPs wurden erstmals Ende der 60er Jahre in polaren Fischen entdeckt [DEVRIES UND WOHLSCHLAG, 1969, SCHOLANDER UND MAGGERT, 1971]. In den folgenden Jahren wurden sie auch in einer Vielzahl anderer Organismen wie Muscheln, Insekten, Bakterien, Pilzen und höheren Pflanzen gefunden [DUMAN UND OLSEN, 1993, HOSHINO ET AL., 1999, THEEDE ET AL., 1976]. Die AFPs aus den verschiedenen Organismen sind sehr divers und gehören unterschiedlichen Protein-Familien an [BARRET, 2001].

Den Nachweis, dass auch Meereis-Diatomeen AFPs bilden, erbrachten RAYMOND ET AL. (1994). Da AFPs in Diatomeen, die in temperierten Lebensräumen zu finden sind, nicht ausfindig gemacht werden konnten [RAYMOND ET AL., 1994], stellen sie einen interessanten Anpassungsmechanismus der Diatomeen an polare Lebensräume dar. Bei molekularbiologischen Untersuchungen an den polaren Diatomeen *Fragilariopsis cylindrus*, *Fragilariopsis pseudonana* und *Navicula glacei* durch KRELL ET AL. (2006 A) und JAN-ECH ET AL. (2006) wurde eine neue Familie von AFP-Sequenzen gefunden, die einer zuvor bekannten Sequenz aus dem Schneepilz *Thyphula ishikariensis* ähnelt. KRELL ET AL. (2006 A) fanden außerdem, dass die AFPs in *F. cylindrus* in verschiedenen Isoformen auftreten.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob auch die Meereis-Diatomee *F. curta* Sequenzen für Anti-Freeze-Proteine in ihrem Genom trägt, sowie einen Überblick über die Anzahl der Isoformen der AFPs zu erhalten. Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, inwiefern die Bildung der AFPs regulierbar ist und wie die Expression durch verringerte Temperatur und erhöhten Salzgehalt, wie sie bei der Bildung von Meereis auftreten, beeinflusst wird. Eine Kultivierung von *F. curta* unter verschiedenen Temperaturen und Salzgehalten diente der Probengewinnung für die Expressionsuntersuchungen mittels Real-Time-PCR und lieferte ergänzende Informationen über den physiologischen Zustand der Kulturen unter Kälte- und Salzstress durch die Bestimmung der Zellzahl und der Photosyntheseleistung.

2 Methoden

Von den verwendeten Kit-Systemen erfolgt hier nur die Erklärung des Funktionsprinzips, dargestellt in kursiver Schrift, die detaillierten Protokolle sind der CD im Anhang beigelegt.

Die Laboruntersuchungen lassen sich in drei Abschnitte gliedern:

1. Aus genomischer DNA von *F. curta* wurden Sequenzen für Anti-Freeze-Proteine (AFP) ausfindig gemacht, ihrem Ähnlichkeitsgrad nach geordnet und in Clades (Gruppen homologer Sequenzen) eingeteilt. Für diese Gruppen erfolgte das Design von Primern, die in einer halbquantitativen PCR und einer Real-Time-PCR zum Einsatz kamen.
2. Die Durchführung eines Kälteschock-Experiments mit je drei parallelen Ansätzen unter drei unterschiedlichen Kulturbedingungen diente der Gewinnung der Proben für die RNA-Extraktion. Während der Kultivierung wurden außerdem die Zellzahl und die Photosyntheseleistung bestimmt, sowie Proben für die Nährstoffanalyse genommen.
3. Die RNA wurde extrahiert und in einer halbquantitativen und einer Real-Time-PCR die Veränderung der Expression ausgewählter AFP unter den verschiedenen Kulturbedingungen untersucht.

2.1 Suche nach Isoformen von AFPs in *Fragilariopsis curta*

2.1.1 PCR und Primerdesign

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ermöglicht die Amplifikation von DNA (Desoxy Ribonucleic Acid) *in vitro*. Für die PCR werden folgende Komponenten benötigt, die auch *in vivo* an der Amplifikation der DNA beteiligt sind: eine Template DNA, Oligonukleotide, freie dNTPs (Desoxy-Ribonukleosid-Triphosphate), eine Polymerase sowie ein Puffer, der den pH-Wert und die Salzkonzentration einstellt. Während des Ablaufs eines für jede Reaktion optimierten Temperaturprogramms finden folgende Reaktionen statt (Abbildung 1):

- A. Denaturierung des Templates (90–94°C): Das doppelsträngige (ds) Template (z.B. genomische DNA oder Plasmide) wird aufgeschmolzen und liegt am Ende einzelsträngig (ss) vor.
- B. Annealing der Oligonukleotide (verschiedene Temperaturen): Die Oligonukleotide lagern sich spezifisch an die komplementäre DNA an und dienen als Primer.

C. Elongation (üblich 72°C): Die DNA-Polymerase (meist Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) fügt vom 3'-Ende der Primer aus die zur Template-DNA komplementären dNTPs an den neu synthetisierten Strang an [MÜLLER, 2001].

Durch eine Wiederholung der Schritte A. bis C. für üblicherweise 25 bis 30 Zyklen kommt es zur Amplifikation des Templates.

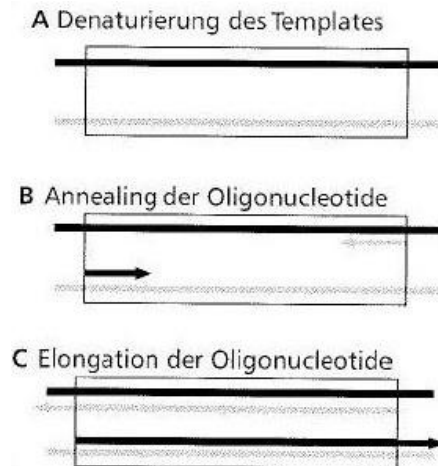


Abbildung 1: Schema der Schritte der PCR (Modifiziert aus MÜLLER, 2001, S. 2)

Am Anfang der Reaktion steht ein längerer Denaturierungsschritt von einigen Minuten, um das Template vollständig in Einzelstränge zu trennen. Die Denaturierung des Amplifikats in den folgenden Zyklen erfordert eine Zeit von nur 5 Sekunden. Die Dauer der Annealing-Phase beträgt 30 Sekunden. Für die Elongation reicht in der Regel eine Zeit von 1 Minute aus, in der die Taq-Polymerase 1000 Basenpaare (bp) anfügen kann. Zuletzt folgt noch eine finale Elongation von 5 Minuten, um die nur teilweise amplifizierten Produkte zu vervollständigen [MÜLLER, 2001].

Zu Beginn der PCR liegt das Template in niedriger Konzentration vor, so dass die Wahrscheinlichkeit, dass Primer, Template und Polymerase zusammen finden, gering ist. Die Reaktion verläuft zunächst langsam. Hat sich genug Template gebildet, liegen alle Komponenten in idealen Konzentrationsverhältnissen vor. Die Amplifikation verläuft exponentiell, d.h. bei einer Effizienz von 100% verdoppelt sich die Produktmenge mit jedem Reaktionszyklus. Nach einer Weile kommt es aber zur Produkthemmung oder Primer und Nukleotide sind größtenteils aufgebraucht. Dadurch sinkt die Effizienz wieder ab bis die Reaktion ein Plateau erreicht [MÜHLHARD, 2003].

Die Primer werden entsprechend der Zielsequenz entworfen. Es ist darauf zu achten, dass „forward“ (vorwärts) und „reverse“ (rückwärts) Primer eine ähnliche Schmelztemperatur besitzen. Ebenso sollen keine Sekundärstrukturen oder Primer-Dimere gebildet werden können. Das kann bei komplementären Sequenzen innerhalb eines Primers oder zwischen den beiden Primern geschehen [MÜHLHARD, 2003].

Primerdesign zur Amplifikation aus genomischer DNA von *Fragilariopsis curta*

Um mögliche AFPs aus der genomischen DNA von *F. curta* zu amplifizieren, wurden aus vorliegenden Sequenzen von AFPs verschiedener Diatomeen Primer entworfen. Es handelte sich dabei um 3 Sequenzen aus *F. cylindrus*, die in einer cDNA-Bank im Rahmen eines Salz-Stress-Experimentes gefunden worden waren [KRELL ET AL., 2006 A]. Weiterhin lag je eine Sequenz aus *Fragilariopsis pseudonana* und *Navicula glacei* vor [JANECH ET AL., 2006]. Wie in Abbildung 2 zu sehen, bilden zwei der Sequenzen von *F. cylindrus* sowie die Sequenz von *F. pseudonana* ein Clade in einem phylogenetischen Baum. Für dieses lagen bereits Primer vor. Die beiden verbleibenden Sequenzen bilden jeweils ein anderes Clade. Für diese beiden Gruppen sollten weitere Primer entworfen werden. In Kombination mit den schon vorhandenen Primern wurde ein möglichst großes Spektrum der verschiedenen AFP-Sequenzen abgedeckt.

Aus den 5 Genen wurden konservierte Bereiche ausgewählt, das heißt, die Bereiche, die eine möglichst große Übereinstimmung in allen fünf Sequenzen zeigten. Die Wahl von konservierten Bereichen diente dazu, möglichst alle Isoformen der AFP-Gene aus dem Genom zu amplifizieren, da diese Bereiche vermutlich in vielen AFPs zu finden sind.

Die Primer wurden so entworfen, dass Abweichungen der Sequenzen an die Gruppen *N_glacei* und *F_cylindrus_3* angepasst wurden.

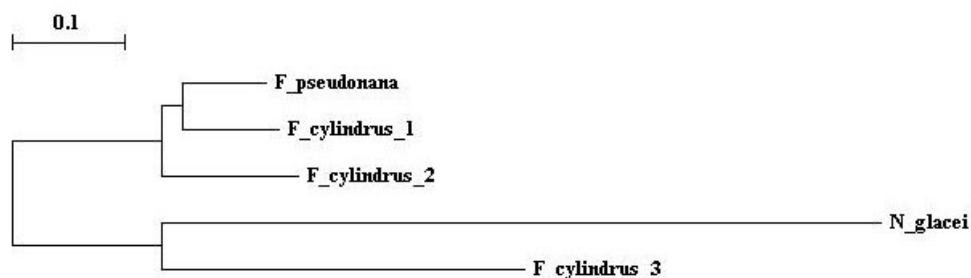


Abbildung 2: Phylogenetischer Baum auf Aminosäurebasis der AFP-Sequenzen aus *F. cylindrus*, *F. pseudonana* und *N. glacei*, die als Grundlage zum Design der Primer für die Amplifikation von AFPs aus genomischer DNA von *F. curta* genutzt wurden. Die Astlängen geben die phylogenetischen Unterschiede zwischen den Sequenzen an, 0,1 entspricht 10%

Als Referenzgen sollte die Sequenz für ein ribosomales Protein dienen. Die Primer hierfür wurden basierend auf einem Gen von *F. cylindrus* entworfen, da es für *F. curta* keine geeigneten Sequenzinformationen gab. Geeignete konservierte Bereiche aus dem Gen konnten durch einen Vergleich mit Sequenzen aus *Thalassiosira pseudonana* ausfindig gemacht werden. Für diese temperierte Diatomee liegt das gesamte Genom vor.

PCR aus genomischer DNA

Die vorhandenen und neu entworfenen Primer wurden zur Amplifikation möglicher AFPs aus genomischer DNA von *F. curta* mittels der PCR verwendet. Die DNA lag bereits isoliert vor.

Für die PCR wurden die fertigen Reaktionsmischungen HotMasterMix (Eppendorf, Deutschland) oder ReadyMixTM (Sigma, USA) verwendet. Sie enthalten bereits in passender Zusammensetzung Nukleotide, Enzym und Salze und müssen lediglich durch Primer, Template DNA und Wasser ergänzt werden. Die Zusammensetzung für einen 50 μL PCR-Ansatz ist Tabelle 1 zu entnehmen. Für einen 25 μL Ansatz wurden die Mengen halbiert.

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die PCR aus genomischer DNA

	HotMasterMix	ReadyMix TM
Reaktionsmischung	20 μL	25 μL
Primer forward (10 μM)	1 μL	1 μL
Primer reverse (10 μM)	1 μL	1 μL
genomische DNA	ca. 100 ng	ca. 100 ng
H ₂ O molecular biology grade	ad. 50 μL	ad. 50 μL

Zur Amplifikation der Template DNA wurde für alle AFP Primer (außer Primerpaar 1, Auflistung siehe Ergebnisse Tabelle 18) und die ribosomalen Primer das Temperaturprogramm aus Tabelle 2 in einem Mastercycler[®] ((Gradient), Eppendorf, Deutschland) verwendet. Für das Primerpaar 1, das weniger spezifische Sequenzen besitzt, fand die Amplifikation mit dem Temperaturprogramm aus Tabelle 3 statt.

Für die ribosomalen Primer wurde das gleiche Programm wie in Tabelle 2 mit einer Annealingtemperatur von 56°C eingesetzt. Bei beiden Programmen erfolgte die Elongation nicht wie für die Taq-Polymerase üblich bei 72°C, sondern bei 68°C. Diese Temperatur liegt in dem Bereich, der für die Elongation mit HotMasterMix vom Hersteller angegeben ist.

Die niedrigere Annealingtemperatur des Temperaturprogramms in Tabelle 3 in den ersten vier Zyklen diente dazu, eine ausreichende Template Menge zu produzieren, auch wenn die Bindung der Primer noch nicht spezifisch war. Die Erhöhung der Temperatur in den nächsten 24 Zyklen erbrachte die benötigte Spezifität.

Tabelle 2: Temperaturprogramm für die Amplifikation aus genomischer DNA mit den AFP-Primern (außer Primerpaar 1) und den ribosomalen Primern

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
1	Anfängliche Denaturierung	94°C	2 min
2	Denaturierung	94°C	5 s
3	Annealing	60°C	30 s
4	Elongation	68°C	1 min
34 Wiederholungen der Schritte 2–4			
5	Finale Elongation	68°C	5 min
6	Kühlung	4°C	∞

Tabelle 3: Temperaturprogramm für die Amplifikation aus genomischer DNA für das Primerpaar 1

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
1	Anfängliche Denaturierung	94°C	2 min
2	Denaturierung	94°C	5 s
3	Annealing	53°C	30 s
4	Elongation	68°C	1 min
4 Wiederholungen der Schritte 2–4			
5	Denaturierung	94°C	5 s
6	Annealing	58°C	30 s
7	Elongation	68°C	1 min
24 Wiederholungen der Schritte 5–7			
8	Finale Elongation	68°C	5 min
9	Kühlung	4°C	∞

Kontrolle der PCR mittels Gelelektrophorese

Der Erfolg der PCR wurde mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid oder SYBR[®]Green-Färbung (Molecular Probes[™], Invitrogen GmbH, Deutschland) kontrolliert. Nach Auftrennung der PCR-Produkte (5 μ L PCR-Produkt mit 2 μ L Loading Buffer (Applied Biosystems, USA)) auf einem 1% igen Agarosegel für 60 Minuten bei 70 Volt, wurde das Gel 10 Minuten in einem 0,1% igen Ethidiumbromid-Bad gefärbt und anschließend 10 Minuten in Wasser gewaschen. Die Visualisierung erfolgte unter UV-Licht mit einem Photo-Imager (Vilber Lourmat, Frankreich) und dem EDV Programm BioCapt Version 12.02 (LTF Labortechnik).

Eine Alternative zur Anfärbung von DNA mit Ethidiumbromid stellt SYBR[®]Green (Molecular Probes[™], Invitrogen GmbH, Deutschland) dar. Dazu wurden 5 μ L des PCR-Produkts mit 2 μ L Loading Buffer und 1 μ L SYBR[®]Green-Lösung (als Verdünnung 1:100 in 1x TAE-Puffer), auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und die Banden durch die Betrachtung auf dem Dark Reader (Clare Chemical Research, USA) mit blauem Licht der Wellenlänge 420 bis 500 nm sichtbar gemacht.

Der Vorteil der Anfärbung der DNA mit SYBR[®]Green gegenüber Ethidiumbromid liegt darin, dass die DNA nach der Visualisierung weiter verwendet werden kann. Bei der Färbung mit Ethidiumbromid erfolgt die Sichtbarmachung mit UV-Licht, wodurch die DNA geschädigt wird. Das macht den Einsatz in folgenden Experimenten schwierig. Bei Bestrahlung mit sichtbarem blauem Licht bleibt die DNA intakt und so in anderen Anwendungen einsetzbar.

2.1.2 Klonierung

Als Produkt der PCR erhält man ein Gemisch aller Sequenzen, die mit den verwendeten Primern amplifiziert werden können. Zur weiteren Analyse werden jedoch die Einzelsequenzen benötigt, die man durch Klonierung gewinnen kann. Das PCR Produkt wird in einen Vektor eingebracht, wobei in jeden Vektor nur ein Fragment gelangt. Bei der Transformation der Vektoren in *E. coli* nehmen die Zellen unter Umständen mehrere Plasmide auf, von denen sich im Endeffekt aber immer nur ein Plasmid durchsetzt. Vereinzelt man die Zellen durch Ausplattieren, kann man davon ausgehen, dass in jeder Kolonie nur eine der Sequenzen vorhanden ist. Eine Vervielfältigung des Plasmids erreicht man durch die Anzucht der Zellen in Flüssigmedium. Ein Schema der Klonierung ist in Abbildung 3 dargestellt.

Zur Klonierung der PCR-Produkte wurde das Topo TA Cloning Kit[®] (Invitrogen, Deutschland) verwendet.

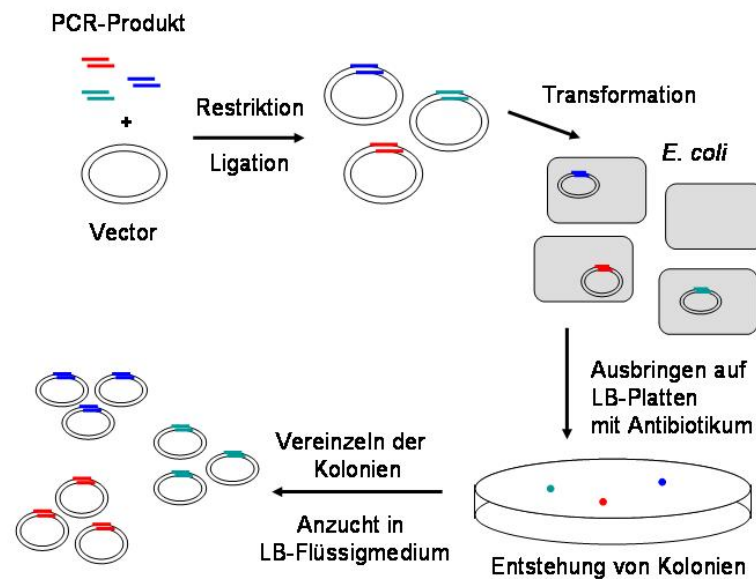


Abbildung 3: Schema der Klonierung. Die in rot, blau und grün dargestellten unterschiedlichen Sequenzen des PCR-Produkts werden im Laufe der Klonierung vereinzelt und amplifiziert.

Aufreinigung des PCR-Produkts

Es ist vorteilhaft, das PCR Produkt vor der Klonierung aufzureinigen, um Enzyme, Salze, einzelne Nukleotide, Primer und andere kurze DNA-Fragmente zu entfernen. So werden Störungen durch die oben genannten Komponenten während der Klonierung vermieden und der Einbau von kurzen DNA-Fragmenten in den Vektor verhindert. Plasmide mit kurzem Insert werden aufgrund ihrer geringeren Größe leichter in die Zellen aufgenommen und senken dadurch die Effizienz der Transformation mit den gewünschten längeren Fragmenten.

Die Aufreinigung des PCR Produkts erfolgte mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Deutschland) mit vorhergehender Agarose-Gelelektrophorese mit SYBR[®]Green-Färbung nach folgendem Prinzip.

Ein Gelstück mit der Bande der gesuchten Größe wird aus dem Gel ausgeschnitten und in einem guanidinthiocyanathaltigen Puffer suspendiert, der die passenden Bedingungen von pH-Wert und Salzkonzentration stellt, um die DNA nach der Zugabe von Isopropanol an die Silikatmembran der MinElute Säulen zu binden. Einzelne Nukleotide oder kurze DNA-Fragmente, wie z.B. Primer oder unvollständige Amplifikate, werden dabei nicht gebunden, sondern mit der Flüssigkeit eluiert. Nach dem Waschen der Membran mit einem ethanolhaltigen Puffer erfolgt die Elution der DNA von der Membran mit Tris-Puffer. Neben der Aufreinigung kommt es außerdem zur Aufkonzentrierung des PCR Produkts.

Das aufgereinigte PCR-Produkt konnte bei -20°C gelagert werden.

Ligation

Abbildung 4 zeigt den zur Klonierung eingesetzten Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] (3,9 kb). Er enthält für die Selektion sowohl ein Ampicillin- als auch ein Kanamycin-Resistenzgen, sowie das lacZ Gen, welches die Selektion positiver Klone mittels Blau-Weiß-Test ermöglicht. Das lacZ Gen befähigt die Zellen, X-Gal abzubauen, wodurch ein blauer Farbstoff freigesetzt wird. Da das Insert direkt in das lacZ Gen einkloniert wird, sind die Zellen, die ein Plasmid mit Insert tragen, nicht in der Lage, X-Gal zu spalten. Kolonien ohne Insert erscheinen deshalb blau, Kolonien mit Insert weiß.

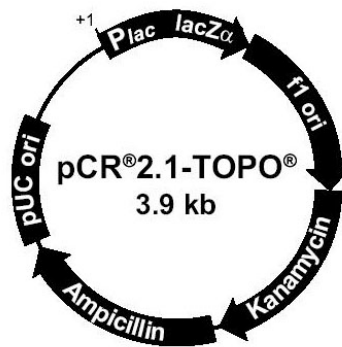


Abbildung 4: Vektorkarte des Kloniervektors pCR[®]2.1-TOPO[®] [TOPO TA CLONING[®] MANUAL, 2004]

Das Prinzip beruht auf der in Abbildung 5 dargestellten TA-Ligation. Das PCR-Produkt trägt auf Grund der Terminalen-Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase einen 3'-Adenosin-Überhang.

Der Vektor ist mit Topoisomerase I aus dem Vaccina Virus hinter CCCTT geschnitten, so dass ein einzelsträngiger Thymidin-Rest am 3'-Ende überhängt, an dem die Topoisomerase kovalent gebunden bleibt. Die einzelsträngigen Thymidin- und Adenin-Nukleotide können ein Basenpaar bilden, wodurch der Vektor und das PCR-Produkt verbunden werden. Der 5'-Hydroxyl-Rest des PCR-Produkts spaltet die Phospho-Tyrosyl-Bindung zwischen Enzym und Vektor und ligiert so das PCR-Produkt mit dem Vektor.

Zur Ligation wurde das PCR-Produkt mit dem Vektor und einer Salzlösung zusammen gegeben, die Salzlösung stellt dabei die für die Ligation benötigten Bedingungen ein.

Neben der Ligation und Klonierung der eigenen PCR-Produkte wurden zwei Kontrollen durchgeführt, eine nur mit dem Vektor und eine mit einem Kontroll-PCR-Produkt. Die Kontrolle nur mit Vektor diente der Überprüfung der Transformation. Aus der Kontrolle mit dem Kontroll-PCR-Produkt konnte man Rückschlüsse auf den Erfolg der Ligation ziehen. Mit diesen zwei Kontrollen wurde außerdem die Funktion des Blau-Weiß-Tests überprüft.

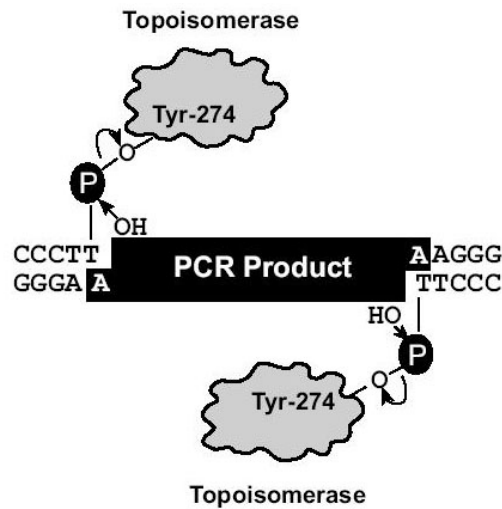


Abbildung 5: Prinzip der TA Ligation [TOPO TA CLONING[®] MANUAL, 2004]

Transformation

Als zweiter Schritt folgte die Transformation des ligierten Vektors in One Shot[®]TOP 10 Chemically Competent *E. coli* Zellen (Invitrogen, Deutschland). Der Ligationsansatz wurde mit den *E. coli*-Zellen gemischt und auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock und erneuter Abkühlung im Eisbad schloss sich eine Inkubation der Zellen für eine Stunde bei 37°C an.

Zuletzt wurden zwei unterschiedliche Volumina des Klonierungs-Ansatzes auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit Kanamycin als Selektionsantibiotikum und X-Gal für den Blau-Weiß-Test ausplattiert. Nach einer Inkubation von 16 Stunden bei 37°C konnten 202 Klone ausgewählt und in 15 mL PE-Zentrifugenröhrchen (Orange Scientific, Belgien) mit 5 mL LB-Flüssigmedium bzw. 96-well-Deepwell-Platten (Omnilab, Deutschland) mit 1,2 mL LB-Medium für die Plasmidpräparation herangezogen werden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und 260 rpm auf einem Unimax 1010-Schüttler mit Heizmodul Inkubator 1000 (Heidolph Instruments, Deutschland) für die Plasmidpräparation.

Back-up-Herstellung

Um später noch auf die sequenzierten Klone zugreifen zu können, wurden vor den Plasmidpräparationen Back-ups erstellt. Nach dem Versetzen von je 100 µL der Über-Nacht-Kultur mit 80 µL 70 % igem Glycerol, erfolgte die Lagerung der Back-ups bei -80°C.

2.1.3 Plasmidpräparation

Die Plasmide wurden für die weitere Analyse mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Deutschland) bzw. dem R.E.A.L.® Prep 96 Kit (Quiagen, Deutschland) aus den Klonen isoliert, aufgereinigt und anschließend bei -20°C gelagert.

Beim QIAprep Spin Miniprep Kit werden die Zellen nach dem Ernten durch Zentrifugation resuspendiert und durch alkalische Lyse in einem natriumhydroxidhaltigen Puffer aufgeschlossen. Auf die Neutralisation mit einem essigsäurehaltigen Puffer folgt eine Zentrifugation bei der sich Zelltrümmer und die an der Zellwand haftende DNA absetzen. Das klare Lysat wird auf eine Silikatmembransäule aufgegeben, die unter passendem pH-Wert und Salzgehalt die Plasmid-DNA bindet. Nach mehreren Waschschrritten mit verschiedenen Puffern zur Entfernung der Salzreste wird die Plasmid-DNA von der Membran eluiert.

Wie oben beschrieben erfolgt auch beim R.E.A.L.® Prep 96 Kit nach der Resuspendierung des Zellpellets eine alkalische Lyse der Zellen. Nach der Neutralisation werden die Zelltrümmer durch Vakuumfiltration über eine Membran abgetrennt. Der Fällung der Plasmid-DNA aus dem klaren Lysat mit Isopropanol folgt ein Waschschrtritt mit Ethanol, das Trocknen des Pellets und die Resuspendierung in Tris-Puffer.

Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA

Um mit aufgereinigten Nukleinsäuren weiterarbeiten zu können, ist es oft wichtig, ihre Konzentration und mögliche Verunreinigungen, die in weiteren Reaktionen stören könnten, zu kennen. Beides kann durch photometrische Messungen bestimmt werden. Die Konzentrationen von DNA und RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., USA) bestimmt. Anders als bei einem herkömmlichen Küvetten-Photometer wird die Lösung aufgrund ihrer Oberflächenspannung zwischen den Enden zweier Glasfaserkabel gehalten. Hierzu sind nur sehr geringe Probenmengen (1 μ L) notwendig. Neben der Konzentration können auch Verunreinigungen mit Proteinen, Phenolen oder Kohlenhydraten bestimmt werden. Für die Messung von Nukleinsäuren wird ein Absorptionsspektrum von etwa 220 bis 350 nm aufgenommen. Aus dem Absorptionswert bei 260 nm (A₂₆₀) wird nach der Berechnung mit dem Lambert-Beerschen-Gesetz und dem passenden Absorptionskoeffizient die Konzentration angezeigt. Die Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ und A₂₆₀/A₂₃₀ geben Auskunft über die Reinheit der Probe. Der A₂₆₀/A₂₈₀-Wert gibt z.B. Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolen an. Eine DNA gilt ab einem Wert von 1,8, eine RNA bei einem Wert von 2,0 als rein, niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen hin. Der A₂₆₀/A₂₃₀-Wert sollte höher als 1,8 liegen und zeigt Verunreinigungen mit Kohlenhydraten, Peptiden, Phenolen oder Aromaten [NANODROP USER'S MANUAL, 2005].

Restriktion

Zum Nachweis eines Inserts der gewünschten Größe in den Plasmiden wurde eine Restriktionsanalyse mit EcoRI durchgeführt. Der Restriktionsansatz pro 500 ng Plasmid-DNA enthielt 10 U Enzym, entsprechend einem Volumen von 0,5 μL des EcoRI 20.000 U/mL (New England BioLabs, UK), 1,5 μL 10x NEBufferEcoR I (New England BioLabs, UK) und H₂O molecular biology grade (Eppendorf, Deutschland), das den Ansatz zu 15 μL ergänzte. Nach einer Inkubation von 4 bis 5 Stunden bei 37°C wurden die Restriktionen auf ein 1,2 %iges Agarosegel mit 0,001 % Ethidiumbromid aufgetragen und bei 100 V 90 Minuten eine Gelektrophorese durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte unter UV-Licht mit einem Photo-Imager (Vilber Lourmat, Frankreich) und dem Analyseprogramm Bio-Capt Version 12.02 (LTF Labortechnik).

2.1.4 Sequenzierung

Von den Plasmiden, bei denen eine Insertbande bei ca. 300–800 bp (Größe des gesuchten Inserts) zu erkennen war, wurde eine Taq-Cycle-Sequenzierung mit dem System ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) durchgeführt.

Das Prinzip beruht auf der „Kettenabbruch“-Methode nach SANGER (1977). Während einer PCR-Reaktion werden neben den normalen Desoxy-Nukleotiden auch fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide eingebaut. Jedes Mal wenn die Polymerase ein solches Nukleotid an die schon bestehende Nukleotidsequenz anfügt, kommt es zu einem Kettenabbruch. Dadurch entsteht als Endprodukt der PCR kein einheitliches Amplifikat sondern ein Gemisch aus allen DNA-Fragmenten, die beim Abbruch der Reaktion an einem Nukleotid entstehen können. Dieses Gemisch wird während der eigentlichen Sequenzierung im so genannten Array durch Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Durch einen Laser können die vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe, die jeweils ein Didesoxy-Nukleotid markieren, detektiert werden. Die Fragmente passieren vom kleinsten bis hin zum größten den Detektor, der jedes Mal den Farbstoff am letzten Nukleotid detektiert. Die Zuordnung der Signale zu den zugehörigen Nukleotiden erfolgt durch die zugehörige Software.

M13-PCR

Von einigen Proben mit niedriger Plasmidkonzentration wurde vor der eigentlichen Sequenzier-PCR noch eine M13-PCR durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte aus ca. 50 ng Plasmid-DNA in einem wie in Tabelle 1 beschriebenen Reaktionsansatz mit dem in Tabelle 4 gezeigten Programm. Da die Bindungsstellen für die M13-Primer die Insertionsstelle des Vektors flankieren (Abbildung 6), kommt es durch den Einsatz von M13-Primern zur Vervielfältigung des Inserts. Dadurch wird eine Anpassung der Template-Menge für die Sequenzier-PCR möglich.

Beim MinEluteTM 96 UF Purification Kit erfolgt die Bindung der DNA an eine Membran durch Ultrafiltration. Nach dem Waschen der Membran mit Wasser, geschieht die Elution durch Aufgabe von Wasser auf die Membran und eine Inkubation im Thermomixer comfort (Eppendorff, Deutschland). Die Lösung, welche die DNA enthält, wird von oben von der Membran wieder abgenommen.

Sequenzier-PCR

Für die Sequenzier-Reaktion wurden die Materialien des BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) verwendet. Die Zusammensetzung der Sequenzier-PCR ist in Tabelle 5 angegeben, wobei zur Amplifikation das in Tabelle 6 aufgeführte Programm verwendet wurde.

Aufreinigung des Sequenzier-Produkts

Bevor das PCR-Produkt mit dem Sequenzierer analysiert werden kann, müssen fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide und Primer, die nicht in die Reaktion eingegangen sind, entfernt werden, da sie die Analyse stören.

Die Aufreinigung des Sequenzier-Produkts erfolgte mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Deutschland) oder dem DyeEx 96 Kit (Qiagen, Deutschland).

Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf Gelfiltrationschromatographie. Nach der Vorbereitung des Gelharzes wird die Sequenzier-Reaktion mittig auf das Gel aufgegeben. Salze, freie Nukleotide oder ungebundene Primer und Polymerase-Reste dringen in die Poren des Gels ein und verbleiben dort. Das PCR Produkt durchläuft das Gel und wird bei der Zentrifugation eluiert.

Bis zu Analyse mit dem ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) konnten die aufgereinigten Produkte bei -20°C aufbewahrt werden.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die Sequenzier-PCR

Template	ca. 100 ng
M13 forward oder reverse Primer (1 μ M)	1,0 μ L
5x Sequencing buffer	1,5 μ L
Nucleotid Premix	1,0 μ L
H ₂ O molecular biology grade	ad. 10 μ L

Tabelle 6: Temperaturprogramm für die Sequenzier-PCR

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

2.1.5 Analyse der Sequenzen

Bearbeitung der „Roh“-Sequenzen

Da die Qualität und Intensität der Sequenzierung nach einigen hundert Basen abnimmt, setzt man je eine Sequenzierreaktion mit einem „reverse“ und eine mit einem „forward“ Primer an. Per Alignment mit einem der Programme Mafft [KATHO ET AL., 2005], ClustalW [HIGGINS UND SHARP, 1989] oder Lasergene SeqMan (DNASTAR) konnte man diese Sequenzen zusammenfügen. Bei nicht übereinstimmenden Nukleotidpaaren wurden die Chromatogramme der Sequenzen überprüft und das Nukleotid mit dem besseren Signal ausgewählt. Nach der Entfernung von Sequenzbereichen mit sehr schlechter Qualität am Anfang und Ende, folgte das „Vektor-Clipping“, bei dem die am Anfang und Ende mitsequenzierten Bereiche des Klonier-Vektors entfernt wurden. Als letzter Schritt wurde mit Hilfe eines Alignments mit einer der vorhandenen Sequenzen die korrekte Orientierung der Sequenz festgestellt.

Zuordnung der Sequenzen zu Gruppen

Um die Sequenzen Gruppen zuzuordnen wurden je etwa 10 der neuen Sequenzen mit einer der vorhandenen Sequenzen in Mafft oder ClustalW aligned und aus sehr ähnlichen Sequenzen vorläufige Gruppen gebildet. Die Sequenzen eines Clades durften maximal in 1 % der Nukleotide von einer aus diesem Clades ausgewählten Beispielsequenz abweichen und keine Insertionen oder Deletionen im Vergleich zur Beispielsequenz aufweisen. Die Beispielsequenz sollte dabei die anderen Sequenzen des Clades möglichst gut repräsentieren, eine gute Qualität haben und möglichst lang sein. Durch ein Alignment der Beispielsequenzen wurden die Clades miteinander verglichen und gegebenenfalls zusammengefügt. Die Clades wurden außerdem mit den schon vorliegenden Sequenzen aus *F. cylindus*, *F. pseudonana* und *N. glacei* verglichen. Das Alignment der Beispielsequenzen diente als Grundlage zur Erstellung eines „Neighbour joining“ Baums mit dem Programm Treecon, der das Maß der Ähnlichkeit der Sequenzgruppen darstellt.

2.1.6 Design der Primer für die quantifizierende PCR

Ziel des Primerdesigns für die quantifizierende PCR war es, gruppenspezifische Primer für die verschiedenen AFPs zu finden.

für die halbquantitative PCR

Für drei Sequenzgruppen der AFP wurden Primer entworfen, die in einer halbquantitativen PCR zum Einsatz kamen. In einem Alignment der Mustersequenzen wurden die Primer so gelegt, dass sie gruppenspezifische Insertionen oder Deletionen überspannten, um eine möglichst hohe Spezifität der Primer für die Gruppe zu gewährleisten. Die Amplikonlänge betrug 550 bis 680 bp.

für die Real-Time-PCR

Das Design der Primer für die quantitative Real-Time-PCR erfolgte mit dem Programm Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, USA). Es mussten jedoch zuvor solche Bereiche in den Sequenzen ausgewählt werden, die für die Gruppe eine spezifische Erkennung erhoffen ließen, d. h. die zu den Sequenzen der anderen Gruppen ausreichend Unterschiede aufwiesen.

Primer für quantitative Real-Time-PCR müssen einige andere Kriterien erfüllen als Primer für die herkömmliche PCR. Das Amplifikat sollte eine Länge von 100 bis 150 Basenpaaren haben, um eine vollständige Amplifikation mit hoher Effektivität zu gewährleisten. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 58 und 60°C liegen, da das Annealing in einem Schritt mit der Elongation ausgeführt wird. Außerdem sind Basenwiederholungen (repeats) vor allem von Guanosin-Nukleotiden zu vermeiden, um die Gefahr unspezifischer Bindungen zu minimieren [BUSTIN, 2000, [HTTP://DORAKMT.TRIPOD.COM](http://DORAKMT.TRIPOD.COM), 31.07.2006].

Wie schon für die Primer zur Amplifikation aus genomischer DNA (Kapitel 2.1.1) wurde auch für die Real-Time-PCR ein Primerpaar für ein ribosomales Protein entworfen. Ein Primerpaar für Aktin, das ebenfalls als Referenzgen dienen sollte, stand aus vorhergehenden Experimenten von KRELL ET AL. (2006 B) zur Verfügung.

2.2 Kultivierung

2.2.1 Herkunft der Kultur und Vorkultur

Die Kultur von *Fragilariopsis curta* wurde 1999 auf der Polarsternfahrt ANT XVI/3 von Thomas Mock im östlichen Weddell-Meer isoliert. Seitdem wird sie als unialgale Kultur im Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung (AWI) in Bremerhaven kultiviert.

Die Vorkulturen wurden in 1 L und 2 L Erlenmeyerkolben in ANT F/2 Medium (nach GULLIARD, 1975; Anhang A) gehalten. Die Kolben waren mit Wattestopfen verschlossen, mit Alufolie locker abgedeckt und maximal bis zur Hälfte des Füllvolumens gefüllt. Die Kulturen wurden aus einer Stammkultur angeimpft und über mehrere Generationen von Zellkonzentrationen (im Folgenden werden die Begriffe Zellkonzentration und Zellzahl synonym verwendet) von 100.000 Z/mL bis 1.000.000 Z/mL bei +5°C und 25 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert.

Die Vorkulturen dienten zum Animpfen der Kulturen für die Vorversuche und der Kulturen für das Hauptexperiment.

2.2.2 Vorversuche

In einigen Vorversuchen sollte die Reaktion der Algen bei verschiedenen Zellkonzentrationen auf eine Verringerung der Temperatur und eine Erhöhung des Salzgehalts untersucht und getestet werden, ob die Kulturen ein Aufsalzen mit kristallinem Salz oder mit einer hochkonzentrierten Sole besser vertragen. Dazu wurde das Wachstumsverhalten (Kapitel 2.2.5) und die Quanten-Ausbeute des Photosystems II (Kapitel 2.2.6) erfasst. Die Vorkulturen dienten außerdem zur Optimierung der RNA-Extraktion.

Die Kulturen wurden zu je 300 bis 400 mL in 500 mL Erlenmeyerkolben angesetzt und bei den in Tabelle 7 dargestellten Versuchsbedingungen kultiviert. Die Zellzahlen der Kulturen a bis d betragen zu Versuchsbeginn jeweils ca. 100.000 Z/mL, die der Kulturen e1 bis f3 jeweils ca. 500.000 Z/mL. Einige Kulturen wurden mit kristallinem Salz Instant Ocean (Aquarium Systems, Frankreich) oder Sea Salts (Sigma, Deutschland) aufgesalzen, einige andere mit einer Sole-Lösung (300 g Salze auf 1 L ANT F/2 Medium). Die Zusammensetzung der künstlichen Seesalze entspricht für die Hauptelemente der Zusammensetzung natürlichen Seewassers, eine vergleichende Tabelle dazu ist im Anhang A angefügt. Während der Kultivierung wurden regelmäßig die Zellzahl und die Photosyntheseleistung bestimmt. Bei einer maximalen Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ Z/mL erfolgte die Probenahme für die RNA-Extraktion durch Vakuumfiltration (250 mbar, Pumpe Emerson) der Zellen auf Polycarbonatfilter (Porengröße 1,2 μm , Millipore).

Tabelle 7: Kulturbedingungen für die Vorversuche

Kultur	Temperatur [°C] (± 0,5°C)	Salzgehalt [‰] (± 2‰)	Zellkonzentration [Z/mL]
a	0	34	100.000
b	+5	34	100.000
c	+5	70 (Salz)	100.000
d	0	70 (Salz)	100.000
e1	0	70 (Sole)	500.000
e2	0	70 (Salz)	500.000
e3	0	50 (Sole)	500.000
f1	+5	70 (Sole)	500.000
f2	+5	70 (Salz)	500.000
f3	+5	50 (Sole)	500.000

2.2.3 Hauptversuch

Der Hauptversuch diente dazu, Informationen über die kurz- und langfristige Reaktion von *F. curta* auf einen Kälteschock zu erlangen. Dazu wurden je drei parallele Kulturen unter drei verschiedenen Kulturbedingungen (Kulturen 1 bis 3) untersucht. Tabelle 8 zeigt die verschiedenen Kulturbedingungen im Hauptversuch.

Die Kulturen 1 wurden bei +5°C und einem Salzgehalt von etwa 34‰ gehalten. Ein Salzgehalt von 34‰ entspricht dem durchschnittlichen Salzgehalt des Oberflächenwassers im Weddell-Meer [OLBERS ET AL.,1992]. Diese Kulturen, die keinem Stress ausgesetzt waren, dienten als Kontrollkulturen. Bei den Kulturen 2 erfolgte eine Erhöhung des Salzgehalts auf 70‰ und die Temperatur betrug ebenfalls +5°C. Diese Kulturen sollten den Einfluss des Salzgehalts unabhängig von der Temperatur zeigen. Bei den Kulturen 3 wurde neben der Erhöhung des Salzgehalts auf 70‰ außerdem die Temperatur auf -4°C abgesenkt.

Tabelle 8: Kulturbedingungen für den Hauptversuch

Kulturen	Temperatur [°C] ($\pm 0,5^\circ\text{C}$)	Salzgehalt [‰] ($\pm 2\text{‰}$)	Zellkonzentration [Z/mL]
1	+5	34	100.000
2	+5	70	100.000
3	-4	70	100.000

Die Kultivierung für den Hauptversuch erfolgte in 5 L Schott Flaschen, die mit Silikonstopfen mit je 3 Bohrungen für 2 Zuluftschläuche und einen Abluftschlauch verschlossen waren. Die Zu- und Abluft wurde durch Sterilfilter (Midisart 2000, Sartorius, Deutschland) geleitet. Für die Begasung wurden jeweils 3 Kulturflaschen an eine Aquariumspumpe (EcoAir, JBL GmbH & Co.KG, Deutschland) bzw. eine Optima Pumpe (Holm, Deutschland), mit einer Förderleistung von ca. 10 L/h, angeschlossen, so dass sich eine Begasung pro Flasche von ca. 3,3 L/h ergab. Je einer der Begasungsschläuche diente außerdem zur Probenahme.

Vor dem Animpfen der Kulturen aus den Vorkulturen mit einer Zellzahl von 100.000 Z/mL, wurden die Flaschen mit ANT F/2 Medium befüllt und in den Kulturschränken (Lichtthermostat, RUMED, Rubarth Apparate GmbH, Deutschland) auf $+5^\circ\text{C}$ temperiert. Das Volumen betrug nach dem Animpfen und Aufsalzen jeweils 5 L. Bis zu einer Zellzahl von ca. 500.000 Z/mL erfolgte die Kultivierung bei $+5^\circ\text{C}$ und $25 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\pm 10 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Der Versuch startete durch die Zugabe von insgesamt 730 mL Sole (mit 300 g Instant Ocean auf 1 L ANT F/2) in kleinen Volumina, so dass der Salzgehalt der Kulturen 2 und 3 nach 4 Stunden 70 ‰ ($\pm 2\text{‰}$) betrug. Gleichzeitig mit dem Beginn der Solezugabe wurde die Temperatur des Kulturschranks der Kultur 3 auf -4°C abgesenkt. Die Einstellung der Temperatur in den Kulturen dauerte 2 Tage.

Kontinuierliches Rühren mit einem Magnetrührstäbchen sollte dabei die Einstellung der Temperatur und das Lösen der Salze beschleunigen.

2.2.4 Probenahme

Vorversuche

Bei den Vorversuchen wurden je 15 mL Probe zur Bestimmung der Zellzahl und Quantenausbeute genommen, sowie 50 mL für die RNA-Extraktion auf Polycarbonatfilter (Isopore 1,2 μm RTTP, Millipore, Deutschland) filtriert (Tabelle 9). Die Durchführungen sind für den Hauptversuch detailliert beschrieben.

Tabelle 9: Probenahme für die Vorversuche

Verwendungszweck	Volumen	Aufbewahrung, Behandlung
Zellzahl und Quanten-Ausbeute	15 mL	Coulter Counter Vial Aufbewahrung bis zur Messung bei +5°C
RNA-Extraktion	50 mL	Filtration auf Polycarbonatfilter, Schockgefrieren in N ₂ , Lagerung bei -80°C

Hauptversuch

Die Probenahme im Hauptexperiment (Tabelle 10) erfolgte für alle zu bestimmenden Parameter mit Hilfe von sterilen 50 mL Spritzen (NormJect, Henke Sass Wolf GmbH, Deutschland) durch einen der Belüftungsschläuche.

Für die Messung der Photosyntheseleistung und die Bestimmung der Zellzahl wurden je 10 mL Probe in Coulter Counter Vials (Beckman Coulter GmbH, Deutschland) abgefüllt und bis zur Messung im Kulturschrank unter den gleichen Bedingungen wie zuvor aufbewahrt.

Für die Nährstoffanalyse wurden je 10 mL der Kultur durch 0,2 μ m-Aufsatzfilter (Minisart, Sartorius, Deutschland) in 15 mL PE-Zentrifugenröhrchen (Orange Scientific, Belgien) filtriert und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Für die RNA-Extraktion erfolgte die Probenahme von 30 bis 70 mL der Kulturen (je nach Zellzahl, Tabelle im Anhang auf der CD) durch Vakuumfiltration (Vakuumpumpe Emerson) bei geringem Druck (ca. 250 mbar) auf einen Polycarbonatfilter (Isopore 1,2 μ m RTTP, Millipore, Deutschland). Nach dem Waschen mit jeweils ca. 10 mL sterilem Seewasser (Satobran Kapsulen, Sartorius, Deutschland), wurden die belegten Filter gefaltet, in Kryo-Vials gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zu jedem Probenahmezeitpunkt wurden zwei Filter pro Kultur erstellt.

Tabelle 10: Probenahme für den Hauptversuch

Verwendungszweck	Volumen	Aufbewahrung, Behandlung
Zellzahl und Quanten-Ausbeute	10 mL	Coulter Counter Vial, Aufbewahrung bis zur Messung bei den Kulturbedingungen der entsprechenden Kultur
Nährstoffe	10 mL	Filtration durch 0,2 μm -Aufsatzfilter in PE-Zentrifugenröhrchen, Lagerung bei -20°C
RNA-Extraktion	30-70 mL (je nach Zellzahl)	Filtration auf Polycarbonatfilter, Schockgefrieren in N_2 , Lagerung bei -80°C

2.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit dem MultisizerTM 3 COULTER COUNTER[®] (Beckman Coulter GmbH, Deutschland) mit folgendem Messprinzip bestimmt.

Eine Kapillare, gefüllt mit einem schwachen Elektrolyten, trennt zwei Elektroden, durch die ein Strom fließt. Wird eine Probe angesaugt, kommt es durch die Partikel (Zellen) zu einer Erhöhung des Widerstands zwischen den Elektroden. Dieser wird gemessen. Die Erhöhung des Widerstands ist proportional zur Größe der Partikel. Da ein definiertes Volumen angesaugt wird, kann außerdem die Zellkonzentration bestimmt werden [[HTTP://WWW.BECKMANCOULTER.COM](http://www.beckmancoulter.com), 06.02.2006].

Die Verdünnung auf den geeigneten Messbereich von 10.000 bis 20.000 Z/mL erfolgte mit sterilem Seewasser auf ein Endvolumen von 20 mL in Coulter Counter Vials.

Aufgrund der Annahme, dass evtl. vorhandene Aggregate oder Ketten von Zellen durch die Verdünnung und das Schütteln während des Transports zerfallen, wurden die Kulturen mit dem COULTER COUNTER[®] gezählt. Die durch den COULTER COUNTER[®] angegebene durchschnittliche Zellgröße zu Anfang der Kultivierung von etwa 3,5 μm entspricht der bei SCOTT UND MARCHANT (2005) genannten Größe für Einzelzellen von *F. curta*.

2.2.6 Bestimmung der Quanten-Ausbeute

Die relative Quanten-Ausbeute (im Folgenden „Quanten-Ausbeute“ genannt) kann als Parameter zur Beschreibung der Vitalität photosynthetisch aktiver Organismen verwendet werden. Sie ist ein Maß dafür, wie effektiv die Anregungsenergie aus den Antennenkomplexen vom Photosystem II aufgenommen und an die Akzeptoren weitergeleitet wird. Sie beschreibt die Produktion von O_2 pro Mol absorbiertes Photonen im Verhältnis zum

theoretischen Wert von $1/8$ (für 1 Mol O_2 werden theoretisch 8 Mol Photonen benötigt). Maximalwerte gesunder Pflanzen liegen bei 0,1 Mol O_2 pro Mol Photonen. Daraus ergibt sich eine relative Quanten-Ausbeute von 0,8. Liegt eine Schädigung des Photosyntheseapparates vor oder steht der Organismus unter Stress, werden weniger als 0,1 Mol O_2 pro Mol Photonen gebildet. Dadurch verringert sich der Wert der relativen Quantenausbeute und er wird kleiner als 0,8 [VON WILLERT ET AL., 1995].

Die Ableitung der Energie, welche die Moleküle durch die Photonen aufnehmen erfolgt über verschiedene Mechanismen. Ein Großteil fließt im Normalfall in die photochemischen Reaktionen, indem die Energie im Photosystem weitergeleitet wird. Teile gehen aber auch durch Wärmeproduktion, Phosphoreszenz, Fluoreszenz oder Anregung anderer Moleküle für die Photosynthese verloren. Die Anteile verschieben sich abhängig voneinander, wenn einige der Mechanismen vermindert stattfinden, steigen andere an. Daher kann man die Fluoreszenz als Messparameter nutzen, um das ganze System zu beschreiben [VON WILLERT ET AL., 1995].

Das Messprinzip der relativen Quanten-Ausbeute beruht auf der 1931 von KAUTSKY UND HIRSCH entdeckten Fluoreszenzinduktionskinetik. Wird ein dunkeladaptierter zur Photosynthese befähigter Organismus (oder Teil eines Organismus z.B. Blatt einer grünen Pflanze) beleuchtet und die Fluoreszenz gemessen, erhält man eine typische Entwicklung der abgestrahlten Fluoreszenz im Laufe der Zeit [KRAUSE UND WEIS, 1991]. Aus dem Kurvenverlauf kann man die Dunkelfluoreszenz F_0 und die maximale Fluoreszenz F_m bestimmen.

F_0 wird als Dunkelfluoreszenz bezeichnet und stellt die Fluoreszenz von Chlorophyll a in den Antennensystemen von Photosystem II dar. F_m ist die maximale Fluoreszenz, die nach einer Bestrahlung mit Licht hoher Intensität gemessen werden kann [VAN KOOTEN UND SNEL, 1990].

Induziert wird dieser Anstieg der Fluoreszenz durch einen starken Lichtimpuls, der den Primärelektronenakzeptor Plastochinon (Q_A) nach dem P680 vollständig reduziert, so dass eine Ableitung der Energie über Q_A nicht möglich ist. Die Energie wird daher zu einem großen Anteil durch Fluoreszenz abgegeben. Nach einiger Zeit wird Q_A reoxidiert und kann wieder Elektronen aufnehmen, so dass die Fluoreszenz langsam wieder abnimmt [VON WILLERT ET AL., 1995].

Aus F_0 und F_m lässt sich der Quotient $(F_m - F_0)/F_m$ berechnen. Mit $F_m - F_0 = F_v$, ergibt sich daraus der Quotient F_v/F_m , der in guter Näherung die Quanten-Ausbeute widerspiegelt [BUTLER UND KITAJIMA, 1975].

Eine Verringerung von F_v kann z.B. bei hohen Lichtintensitäten unter dem Einfluss von Kälte, Hitze oder Trockenheit hervorgerufen werden und unterschiedliche Ursachen haben [BOHLHAR-NORDENKAMPF ET AL., 1989]. Steigt F_0 an, deutet das auf Schädigungen der Akzeptoren im Photosystem II hin. Ein niedrigerer F_m -Wert zeigt eine vermehrte Fluoreszenzlöschung. Dieser Aspekt wird jedoch durch eine Verdunkelung und die Verwendung eines überlagerten Sättigungsimpulses während der Messung ausgeschlossen. Im dunkelad-

aptierten Organismus ist Q_A vollständig oxidiert, die photochemische Fluoreszenzlöschung (Aufnahme der Elektronen durch Akzeptoren, keine Abgabe als Fluoreszenz) ist damit maximal und die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (Abgabe der Energie z. B. durch Wärme) Null. Durch den starken sättigenden Lichtimpuls wird auch die photochemische Fluoreszenzlöschung Null, da Q_A vollständig reduziert wird. Die Faktoren, welche die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung beeinflussen (z.B. pH- und Ionengradient), ändern sich nur sehr langsam, woraus folgt, dass beide Fluoreszenzlöschvorgänge für die Zeit des Anstiegs von F_0 zu F_m Null sind [SCHREIBER ET AL., 1986].

Eine Abnahme von F_v lässt sich bei Verwendung dieser Methode also ausschließlich auf Schädigungen des Photosystems II zurückführen.

Die Bestimmung der Quanten-Ausbeute erfolgte mit einem Xe-PAM-Fluorometer (Walz Mess- und Regeltechnik, Deutschland) unter Verwendung der Sättigungspulsmethode [SCHREIBER ET AL., 1986]. Durch Dekantieren wurden 6 bis 8 mL der Probe aus dem Coulter Counter Vial in ein schwarz lackiertes Szintillationsgefäß gefüllt und nach einer Dunkelinkubation für 5 bis 10 Minuten 2 mL der Kultur in die Messküvette gegeben. Bevor die Messung gestartet werden konnte, musste die Signalintensität bei Messlicht durch Einsetzen von Lochfiltern (5 % bis 50 %) und Drahtnetzen vor Lampe und Detektor auf 0,2 bis 0,4 V eingestellt werden. Von jeder Kultur wurden 2 Messungen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Flwin Fluorometer Version 2.4. Die detaillierten Geräteeinstellungen und das Messprogramm sind im Anhang (CD) beigefügt.

2.2.7 pH und Nährstoffanalyse

Um ggf. einen Begasungsmangel mit CO_2 und damit eine Verschiebung des pH-Wertes ins Basische detektieren zu können, wurde der pH-Wert halbquantitativ mit pH-Fix 4,5–10,0 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) bestimmt.

Die Proben für anorganische Nährstoffe wurden in einem Evolution III Autoanalyzer (Alliance Instruments, Österreich) prozessiert. Die Methode basiert auf einer photometrischen Messung nach GRASSHOFF ET AL. (1983) mit leichten Veränderungen. Die Messung wurde nicht selbstständig sondern von Frau Martha Maria Wolff durchgeführt, der ich an dieser Stelle dafür danken möchte.

2.3 RNA-Extraktion und Expressionsanalyse

2.3.1 RNA-Extraktion

RNA wurde von bestimmten Probenahmezeitpunkten extrahiert, die anhand der Zellzahlen und Quanten-Ausbeute ausgewählt wurden. Diese sind im Ergebnisteil in Tabelle 23 aufgeführt.

Die RNA-Extraktion wurde mit TRIreagent (Sigma, Deutschland) durchgeführt. Anschließend folgte die Aufreinigung mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Deutschland) bzw. RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Deutschland) inklusive DNase Verdau mit dem RNase-free DNase Set (Qiagen, Deutschland). Bei einer Zellzahl unter 20 Mio Zellen pro Filter wurde das RNeasy MinElute Cleanup Kit verwendet, da dieses für kleinere RNA-Mengen optimiert ist, ansonsten das RNeasy Plant Mini Kit.

War die Qualität der RNA für die Verwendung in der cDNA-Synthese nicht ausreichend, wurde die Aufreinigung wiederholt.

RNA-Extraktion mit TRIreagent (Sigma, Deutschland)

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C und 12.000 \bar{g} in einer Centrifuge 5417 R (Eppendorff, Deutschland).

1. **Zellaufschluss und Inaktivierung der RNasen:** Die Algen wurden mit 1 mL auf 60°C temperiertem TRIreagent (Sigma, Deutschland) vom Filter gespült und in ein 2 mL Eppendorf-Cup mit Glas-beads (Sigma, Deutschland) gegeben. Es handelte sich um eine 1:1-Mischung von Beads mit 212-300 μm und 425-600 μm Durchmesser. Zweifaches vortexen von je 30 Sekunden diente dem Aufschluss der Zellen.
2. **Extraktion:** Die Extraktion der RNA erfolgte durch Zugabe von 0,2 μL Chloroform (MERCK, Deutschland) und vortexen (15 Sekunden). Nach der Phasentrennung (Ruhezeit 5 Minuten) wurde die Flüssigkeit ohne die Glasperlen in ein Phase-Lock-Tube (Eppendorf, Deutschland) überführt, 15 Sekunden kräftig geschüttelt und erneut zur Phasentrennung 5 Minuten ruhig stehen gelassen. Durch eine 15-minütige Zentrifugation trennten sich die wässrige und die organische Phase auf. Die organische Phase befand sich nach der Zentrifugation unter dem Phase-Lock-Gel, die wässrige darüber.
3. **RNA-Fällung:** Die Fällung der RNA aus der wässrigen Phase erfolgte durch Zugabe der gleichen Menge Isopropanol (ca. 500 μL) in einem neuen 1,5 mL Cup, anschließendem Vortexen und einer Inkubation für mindestens 15 Minuten bei -20°C. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig vom Pellet abgenommen und verworfen.

4. **Waschen des Pellets:** Nach der Aufgabe von 1 mL 75 %igem Ethanol und einer erneuten Zentrifugation (10 Minuten) wurde der Überstand so vollständig wie möglich abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet.
5. **Resuspendierung des Pellets:** Die Resuspendierung des Pellets erfolgte in 100 μ L RNase-freiem Wasser.

Aufreinigung der RNA aus der Trizol Extraktion

Die Aufreinigung erfolgte nach dem RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup (RNeasy Plant Mini Kit, RNase-free DNase Set) bzw. mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit. Das Funktionsprinzip der beiden Kits ist identisch. Die MinElute Säulen sind an kleinere Elutionsvolumina angepasst und ermöglichen es dadurch, auch aus kleineren Zellmengen ausreichend hoch konzentrierte RNA zu erhalten.

Die RNA wird unter hohen Salzkonzentrationen in ethanolhaltiger Lösung an einer Silica-Gel Membran gebunden. Durch verschiedene Waschschriffe mit ethanolhaltigen Puffern werden Salze und andere Verunreinigungen entfernt. Um die RNA von DNA zu befreien, kann ein DNase-Verdau durchgeführt werden. Die DNase wird aufgegeben, während die RNA noch an der Membran gebunden ist. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei 30°C folgen weitere Waschschriffe mit ethanolhaltigen Puffern. Zuletzt wird die RNA mit Wasser von der Membran eluiert.

Zur Analyse mit dem NanoDrop[®] (NanoDrop Technologies, Inc., USA) und dem Bioanalyzer (Agilent technologies, Deutschland) wurden 3 μ L aliquotiert, die Lösung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2 Kontrolle der Qualität und Reinheit der RNA

Wie schon für die DNA (Kapitel 2.1.3) beschrieben, erfolgte die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA mit dem Nanodrop[®] Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., USA). Zusätzlich wurde der Grad der Degradation der RNA mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers unter Verwendung von RNA Nano Chips (Agilent Technologies, Deutschland) festgestellt.

Für die quantitative PCR ist es wichtig, intakte RNA zu verwenden, um sicher zu gehen, dass die gesuchten Sequenzen vollständig vorliegen. Auf dem LabChip[®] werden die Nukleinsäuren ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Sie erreichen den Detektor somit zu unterschiedlichen Zeiten und können dort auf Grund der Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe eines Lasers detektiert werden.

Zur Vorbereitung mussten die Mikrokanäle des LabChip[®] zunächst mit einer Mischung aus Gel und Farbstoff gefüllt werden. Dann wurden in jedes Well für Proben und Ladder ein Marker, in die 12 Probenwells je 1 μ L Probe und in ein weiteres Well 1 μ L RNA

6000 Ladder (Ambion) gegeben. Die Messung des Chip erfolgte mit dem Agilent Bioanalyzer und die Ausgabe der Ergebnisse durch die zugehörige Software. Der Ladder diente als Standard zur Bestimmung der Größe der einzelnen Fragmente und der Konzentration [HTTP://WWW.CHEM.AGILENT.COM, 31.07.2006; REAGENT KIT GUIDE RNA 600 NANO ASSAY, 2003].

2.3.3 Expressionsanalyse

Zur Untersuchung der Expression ausgewählter AFP-Gene wurden zwei Methoden angewendet, zum einen die halbquantitative PCR und zum anderen die Real-Time-PCR. Für beide Methoden musste zunächst die isolierte RNA über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden, bevor die Amplifikation der cDNA in einer PCR-Reaktion möglich war.

Die Art der Detektion der beiden Methoden unterscheidet sich voneinander. Bei der halbquantitativen PCR findet die Detektion des Produkts erst am Ende der Reaktion z. B. über ein Agarose-Gel statt. Dadurch können sich Fehler ergeben, da man, sobald sich die Amplifikation in der Plateauphase (Kapitel 2.1.1) befindet, nicht mehr von der Produktmenge auf die Templatemenge schließen kann. Die Einstellung der Zyklenzahl ist der wichtigste Parameter, der darauf Einfluss hat. Die Zyklenzahl muss so gewählt werden, dass man bei niedrigen Template-Konzentrationen ausreichend Produkt erhält, um dieses detektieren zu können und gleichzeitig bei hochkonzentrierten Proben noch nicht die Plateauphase erreicht [MÜLLER, 2001].

Dieses Problem wird bei der Real-Time-PCR umgangen, indem die Quantifizierung während der Reaktion geschieht. Das ist möglich durch Zugabe von Fluorophoren, wie z. B. SYBR[®]Green, die nach Anregung fluoreszieren, wenn sie an doppelsträngiger DNA angelagert sind. In der Real-Time-PCR findet die Quantifizierung schon im unteren Bereich der exponentiellen Phase statt, da zu diesem Zeitpunkt die Effektivität noch nicht nachgelassen hat und sich bei einer Effizienz von 100 % das Produkt pro Zyklus verdoppelt. Es wird ein Schwellenwert des Fluoreszenzsignals festgelegt, der sich deutlich von der Basislinie unterscheidet, aber möglichst im unteren Bereich der Amplifikation liegt. Die Proben erreichen diesen Schwellenwert (engl.: threshold) je nach Menge des Ausgangstemplates bei unterschiedlichen Zyklenzahlen, eine Probe mit viel Template früher als eine mit wenig Template. Diese Zyklenzahl c_t (engl.: c: cycle, t: threshold) kann mit Hilfe einer Standardgeraden einer Templatemenge zugeordnet werden [FREEMAN ET AL., 1999, BUSTIN, 2000].

2.3.4 cDNA-Synthese

Für die Umschreibung der extrahierten RNA in cDNA wurde das Omniskript[®] RT Kit (Qiagen, Deutschland) verwendet.

Die Erstrangsynthese erfolgte zu den sechs ausgewählten Probenahmezeitpunkten (Kapitel 3.3, Tabelle 23) von allen neun Kulturen (3 Parallelen von 3 Kulturbedingungen). Zu

jedem der gewählten Zeitpunkte wurde außerdem von je einer Kultur pro Kulturbedingung eine Non Template Control (NTC) hergestellt. Bei dieser fehlte die reverse Transkriptase im Reaktionsansatz, so dass keine Erststrangsynthese erfolgte. Diese Proben dienten als Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen in der RNA. Erhielt man bei der PCR (halbquantitativ oder Real-Time) ein Produkt, musste dieses auf genomische DNA zurückzuführen sein.

Die in Tabelle 11 aufgeführten Komponenten wurden zusammengegeben und die reverse Transkription für 1 Stunde bei 42°C durchgeführt. Darauf folgte eine Inkubation von 10 Minuten bei 85°C, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren.

Tabelle 11: Reaktionsansatz der cDNA-Synthese

	cDNA	NTC
Template RNA	500 ng	500 ng
dNTP Mix	2 μL	2 μL
Buffer RT	2 μL	2 μL
Oligo-dT Primer anchored (500 ng/L)	1 μL	1 μL
RNAse Inhibitor	1 μL	1 μL
Omniskrip Reverse Transkriptase	1 μL	-
MA ($128,75 \cdot 10^{-3}$ ng/ μL)	3 μL	3 μL
NSP ($121,55 \cdot 10^{-7}$ ng/ μL)	3 μL	3 μL
RNAse-freies Wasser	ad 20 μL	ad 20 μL

Der Oligo-dT Primer anchored trägt am 3'-Ende des poly-dT ein A/G/C gefolgt von einem A/T/G/C. So wird die Bindung des Primers an der Grenze vom Poly-A-Tail zum codierenden Sequenz gegenüber einem Binden innerhalb des Poly-A-Tails begünstigt. Der Primer wurde von OPERON Biotechnologies (Deutschland) synthetisiert.

MA und NSP sind Gene aus dem Kohlweißling (*Pieris rapae*), die als interner RNA-Standard zugegeben werden, um ggf. Unterschiede in der Transkriptionseffizienz bei der Erststrangsynthese feststellen zu können. Die Effizienz kann z.B. durch Verunreinigungen, die hemmend auf die Enzymreaktion wirken, herabgesetzt werden.

Der 20 μL Reaktionsansatz wurde nach der Erststrangsynthese mit 180 μL Wasser molecular biology grade (Eppendorf, Deutschland) auf 200 μL verdünnt. Von diesen Verdünnungen, die bei gleichmäßiger Effektivität die gleiche Menge cDNA enthalten, fanden je 5 μL in der halbquantitativen und der Real-Time-PCR Einsatz.

2.3.5 Herstellung der Standards

Für die absolute Quantifizierung in der Real-Time-PCR ist es notwendig, eine Standardgerade aus einer Verdünnungsreihe der untersuchten Sequenz anzufertigen. Dazu wurde aus den Plasmiden, die als Beispielsequenz für die AFP-Gruppen ausgewählt worden waren (Kapitel 3.1.5), eine PCR mit M13 Primern, wie in Kapitel 2.1.4 (Sequenzierung) beschrieben, durchgeführt. Die eingesetzte Template-Menge betrug ca. 100 ng. Das PCR Produkt wurde mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt (Kapitel 2.1.4) und die Konzentration mit dem NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., USA) bestimmt. Von dem aufgereinigten Produkt wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich 10^{-3} bis 10^{-10} in H₂O molecular biology grade (Eppendorf, Deutschland) angefertigt.

2.3.6 Halbquantitative PCR

Die halbquantitative PCR wurde mit dem HotmasterMix (Eppendorf, Deutschland) in einem Mastercycler[®] ((Gradient), Eppendorf, Deutschland) durchgeführt.

Test der Primer

Primer für quantifizierende PCR müssen vor der Verwendung auf ihre Spezifität hin untersucht werden, um sicher gehen zu können, dass man ausschließlich das gewünschte Gen amplifiziert. Das wurde gewährleistet, indem die AFP-Primer mit den Standardprodukten anderer AFP-Gruppen getestet wurden.

Für die halbquantitative PCR erfolgte die Amplifikation der Primer mit unterschiedlichen Templates der Standard-Verdünnungsreihen in normalen PCR-Reaktionen. Die Templates umfassten sowohl den passenden Standard als auch „falsche“ Standards, die bei einer spezifischen Amplifikation kein Produkt ergaben. Der Reaktionsansatz betrug 20 μ L mit der in der Tabelle 12 aufgeführten Zusammensetzung.

Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 13 dargestellt, wobei die Annealingtemperatur und die Zyklenzahl variabel waren. Beide Parameter haben bedeutenden Einfluss auf die Spezifität der Primer und beeinflussen so die Möglichkeit, bei einer halbquantitativen PCR nach der Visualisierung Unterschiede in der Template Menge detektieren zu können. Sowohl die Annealing-Temperatur als auch die Zyklenzahl wurden während der Spezifitätstests optimiert.

Die Auswertung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese für 45 Minuten bei 70 V wie in Kapitel 2.1.1 (Kontrolle der PCR) beschrieben. Das Gel enthielt 1,2 % Agarose.

Amplifikation der cDNA

Die Amplifikation der cDNA geschah mit dem in Tabelle 14 gezeigten Temperaturprogramm, welches sich aus den Vorversuchen ergab. Die Annealing Temperatur der AFP-

Tabelle 12: Zusammensetzung der halbquantitativen PCR

HotMasterMix	8 μL
Primer forward (10 μM)	0,3 μL
Primer reverse (10 μM)	0,3 μL
Template	5 μL
H ₂ O molecular biology grade	6,4 μL

Tabelle 13: Temperaturprogramm für die Optimierung der halbquantitativen PCR

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
1	Anfängliche Denaturierung	94°C	2 min
2	Denaturierung	94°C	5 s
3	Annealing	zwischen 60–68°C	30 s
4	Elongation	68°C	1 min
Unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen der Schritte 2–4			
5	Finale Elongation	68°C	5 min
6	Kühlung	4°C	∞

Sequenzen betrug 64°C, die der ribosomalen Sequenz bei 60°C. Als Template dienten die cDNA bzw. NTC-Proben. Außerdem wurden zu jedem Ansatz eine Positivkontrolle mit dem Standardprodukt als Template und eine Negativkontrolle mit Wasser als Template durchgeführt.

Die Visualisierung erfolgte unter UV-Licht mit einem Photo-Imager (Vilber Lourmat, Frankreich) und dem Programm BioCapt Version 12.02 (LTF Labortechnik) nach einer 90-minütigen Gelelektrophorese auf einem 1,2 %igen Agarosegel mit 0,001 % Ethidiumbromid bei 100 V.

Tabelle 14: Temperaturprogramm für die halbquantitative PCR

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
1	Anfängliche Denaturierung	94°C	2 min
2	Denaturierung	94°C	5 s
3	Annealing	64°C bzw. 60°C	30 s
4	Elongation	68°C	1 min
30 Wiederholungen der Schritte 2–4			
5	Finale Elongation	68°C	5 min
6	Kühlung	4°C	∞

2.3.7 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde in einem ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) durchgeführt, unter Verwendung des SYBR[®]GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA). Dieser enthält neben Taq Polymerase und dNTPs außerdem die Farbstoffe SYBR[®]Green und ROX. ROX dient als Kalibrationsfarbstoff. SYBR[®]Green fluoresziert, wenn er mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Über die Intensität der Fluoreszenz kann die Menge aller doppelsträngigen Nukleinsäuren bestimmt werden. Deswegen stören Primerdimere in dieser Reaktion besonders stark und müssen unbedingt vermieden werden.

Es ist außerdem zu berücksichtigen, dass die RNA DNA-frei sein muss, um eine Amplifikation des gesuchten Gens aus genomischer DNA zu vermeiden.

Test der Primer

Der Primertest für die Real-Time-PCR erfolgte nach dem gleichen System wie für die halbquantitative PCR. Die Primer wurden sowohl mit dem passenden als auch mit „falschen“ Templates zur Amplifikation mit dem in Tabelle 15 aufgeführten Reaktionsansatz und dem Temperaturprogramm, dargestellt in Tabelle 16, eingesetzt.

Tabelle 15: Reaktionsansatz für die Real-Time-PCR

SYBR [®] GREEN PCR Master Mix	10 μ L
Primer forward (10 μ M)	0,3 μ L
Primer reverse (10 μ M)	0,3 μ L
Template cDNA	5 μ L
H ₂ O molecular biology grade	4,4 μ L

Tabelle 16: Temperaturprogramm der Real-Time-PCR

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
1	Anfängliche Denaturierung	95°C	10 min
2	Amplifikation	94°C	15 s
		62°C	1 min
40 Wiederholungen von Schritt 2			
3	Dissoziationskurve	95°C	15 s
		60°C	20 s
		95°C	95 s

Amplifikation der cDNA

In einem dem Primertest entsprechenden Reaktionsansatz kamen cDNA, NTC und die Verdünnungsreihe des Standard-PCR-Produkts in Triplikaten als Templates bei der Amplifikation mit dem Tabelle 16 entsprechenden Temperaturprogramm zum Einsatz.

Die Dissoziationskurve als letzter Schritt der Real-Time-PCR liefert Informationen über den Schmelzpunkt des gebildeten Produkts, und ermöglicht es so unspezifische Amplifikationen zu detektieren. Die Schmelztemperatur einer Nukleinsäure ist abhängig von ihrer Länge und Basenzusammensetzung. Ist die Schmelztemperatur von zwei PCR Produkten unterschiedlich, handelt es sich um unterschiedliche Sequenzen.

Die Berechnung der c_t -Werte erfolgte mit der geräteeigenen Software (Sequence Detection Software, Version 1.2.3). Der Schwellenwert wurde dabei auf 0,2 Delta Rn gesetzt, die Basislinie automatisch bestimmt.

Auswertung

Aus der Konzentration des Standard-PCR-Produkts wurde mit Hilfe des Molekulargewichts die Kopienzahl pro μL errechnet. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte über die Sequenz oder die Länge des Amplikons mit dem Programm Chang Bioscience Molecular Weight Calculator [[HTTP://WWW.CHANGBIOSCIENCE.COM](http://www.changbioscience.com), 18.07.2006]. Aus der Zuordnung der c_t -Werte zu den entsprechenden Kopienzahlen der Standard-Reihe ergab sich eine Standardgerade. Wich einer der drei Messwerte (der technischen Triplikate der Standards) mehr als 0,4 c_t von zwei nahe beieinander liegenden ab, wurde er zur Berechnung der Standardgerade nicht berücksichtigt. Für die Standardgeraden der zwei Anti-Freeze-Proteine AFP_2a und AFP_10 sowie des ribosomalen Proteins rib40 wurde die Real-Time-PCR selbst durchgeführt. Die Messwerte für die Standardgeraden von MA und Aktin lagen aus vorhergehenden Experimenten von KRELL ET AL. (2006 B) vor. Die Berechnung der Regressionsgeraden erfolgte mit dem Programm Origin (Origin Lab Corporation).

Nach den Berechnungen der Kopienzahlen der untersuchten Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe der Standardgerade wurden die Ergebnisse der biologischen Triplikate gemittelt und deren Standardabweichung bestimmt.

Unter Berücksichtigung der Effizienz der cDNA-Synthese über den internen Standard MA ergaben sich durch Normierung auf den Versuchsstart T0 Expressionsfaktoren. Dazu wurde zunächst die Kopienzahl eines Gens jeder Probe durch die zugehörige Kopienzahl von MA dividiert, die Werte der Triplikate gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Danach folgte die Division des Mittelwerts und der Standardabweichung des jeweiligen Probenzeitpunktes durch den Mittelwert zum Zeitpunkt T0. Für T0 ergibt sich dadurch immer der Wert 1, der allerdings eine Standardabweichung besitzt. Die Werte der nachfolgenden Zeitpunkte zeigen den Faktor der Regulation im Bezug zur Probe zum Zeitpunkt T0.

3 Ergebnisse

3.1 Isoformen von AFPs in *Fragilariopsis curta*

3.1.1 Primer zur Amplifikation aus genomischer DNA

Die Primer sollten zur Amplifikation aus genomischer DNA von *Fragilariopsis curta* genutzt werden.

Tabelle 17 zeigt die Sequenzen der neu entworfenen und der bereits vorliegenden Primer für die AFPs, sowie die Primer für das ribosomale Protein. Die Lage der Primer ist in einem im Anhang (CD) beigefügten multiplen Alignment der fünf für das Primerdesign verwendeten Sequenzen angegeben. Alle für diese Arbeit selber entworfenen Primer (Kapitel 2.1.1 und 2.1.6) wurden von OPERON Biotechnologies (Deutschland) synthetisiert.

Dabei gilt die nachfolgende Codierung für die Basen und die „Wobbles“. „Wobbles“ sind Positionen, an denen nicht eine Base eingebaut wird, sondern zwei oder drei bzw. alle vier verschiedenen, jeweils im Verhältnis 1:1 oder 1:1:1 bzw. 1:1:1:1. Sie ermöglichen es, den Primer weniger spezifisch zu machen und so eine größere Anzahl verschiedener Sequenzen mit dem selben Primer zu amplifizieren. Durch die Verwendung der „Wobbles“ konnten beim Design der neuen Primer Sequenzen entworfen werden, die sowohl AFPs aus *N_glacei* als auch aus *F_cylindrus_3* amplifizieren sollten. Zusätzlich wurden Primer designed, die nur auf eine der beiden Ausgangsequenzen angepasst waren, sie enthalten keine „Wobbles“. Im Namen enthalten diese Primer ein a für *F_cylindrus_3* oder b für *N_glacei* als Kennzeichnung.

Basencodierung	A: Adenin	Wobbels	Y: C/T
	C: Cytosin		M: C/Y
	G: Guanin		K: G/T
	T: Thymin		S: C/G
			W: A/T

Tabelle 17: Nukleotidsequenzen der Primer die zur Amplifikation der AFP-Sequenzen und der Sequenz des ribosomalen Proteins aus genomischer DNA von *F. curta* verwendet wurden. Kodierung der variablen Positionen („Wobbles“) wie folgt: M: A/C, K: G/T, S: C/G, W: A/T, Y: C/T

Name	Sequenz 5' → 3'
neu designte Primer für AFPs	
1a.f	ATC TCT TTT TAC TAT CTG TGG C
2.f	TGG MGA TTT CGC TGT CTT KKC
3.f	KAC CGG MGA CAT WGS SGT C
3b.f	TGA CCG GAG ACA TTG GGA C
4.f	GMG ACA TWG SSG TCW SKC C
4a.f	GGC AAC ATA GTC GTC TCG C
4b.f	GAG ACA TTG GGA CCA GTC C
1a.r	CCT CCA TAT GCG AAC CTG C
2a.r	CTC CCA GAA GAT ATT TTC AGC
2b.r	TTG GAT GGA AAT GTT CTC AGC
3a.r	TGG CTT GCT TAA CAT TCT TCG
bereits vorliegende Primer für AFPs	
F	CCG GCA TGC TCA GTG TTG CC
R	GTC CTC GAG GTC CCC GG
1.f	TTC GTT ATC CTC GCM AAG GC
11.f	AYC ACA ATC CAA ATC CAA ATC C
5b.r	CCG TCG CTG ATA AGA CAC G
Primer für ein ribosomales Protein	
rib40_1.fw	GAT TAG GTG TGA AGT GCT CC
rib40_1.rev	AGA TTG CCT TAA TGA AGT TAC C
rib40_2.fw	ATT AGG TGT GAA GTG CTC C
rib40_2.rev	GTG TTA CGG AGG GCA TAG

3.1.2 PCR

In Tabelle 18 sind die Primerkombinationen aufgeführt, mit denen eine Amplifikation möglicher AFPs aus der genomischen DNA von *F. curta* gelang. Ein Produkt der PCR wurde nur mit den Primern erhalten, die an die *F_cylindrus_3*-Sequenz angepasst worden waren. Sowohl die Primer mit Anpassung an die *N_glacii*-Sequenz als auch die Primer mit Wobbles ergaben keine Amplifikate.

Die Produkte wurden in der Klonierung eingesetzt, um nach der Plasmidpräparation die Einzelsequenzen der amplifizierten AFPs zu erhalten.

Tabelle 18: Primerkombinationen, mit denen eine Amplifikation aus genomischer DNA aus *F. curta* gelang. Angegeben ist außerdem die durch den Vergleich mit der DNA-Leiter abgeschätzte Größe des Amplikons.

Name	Primerkombination	Größe des Amplikons (geschätzt)[bp]
1	F + R	800
C1	1a_f + 1a_r	800
C2	1a_f + 2a_r	700
C3	1a_f + 3a_r	600
C17	4a_f + 1a_r	500
C18	4a_f + 2a_r	550
C19	4a_f + 3a_r	400
C21	1_f + 5b_r	700

3.1.3 Restriktionsverdau der Plasmide

Der Restriktionsverdau der Plasmide zeigte, dass 120 AFP-Klone von insgesamt 196 ein Insert der gewünschten Größe enthielten (Daten im Anhang auf der CD). Die Plasmide mit einem Insert der gewünschten Größe wurden zur Sequenzierung weiter verwendet.

3.1.4 Isoformen von AFPs

Nach dem Aussortieren qualitativ schlechter Sequenzen blieben 102 AFP-Sequenzen für die Zuordnung zu den Gruppen übrig. Die multiplen Alignments dieser Sequenzen ergaben, dass es sich um 40 Isoformen von AFPs handelte (Daten im Anhang auf der CD). Diese wurden unter Berücksichtigung einer maximalen Abweichung von 1 % in der Nukleotidsequenz 11 Clades zugeordnet, deren Verwandtschaftsgrad anhand der Ähnlichkeiten in den Sequenzen in Abbildung 7 dargestellt ist. Die Clades konnten auf Grundlage der phylogenetischen Analyse teilweise weiter zu Gruppen zusammengefasst werden, da die Sequenzunterschiede unter den Clades einer Gruppe sehr gering waren. Clade 4, 2 und

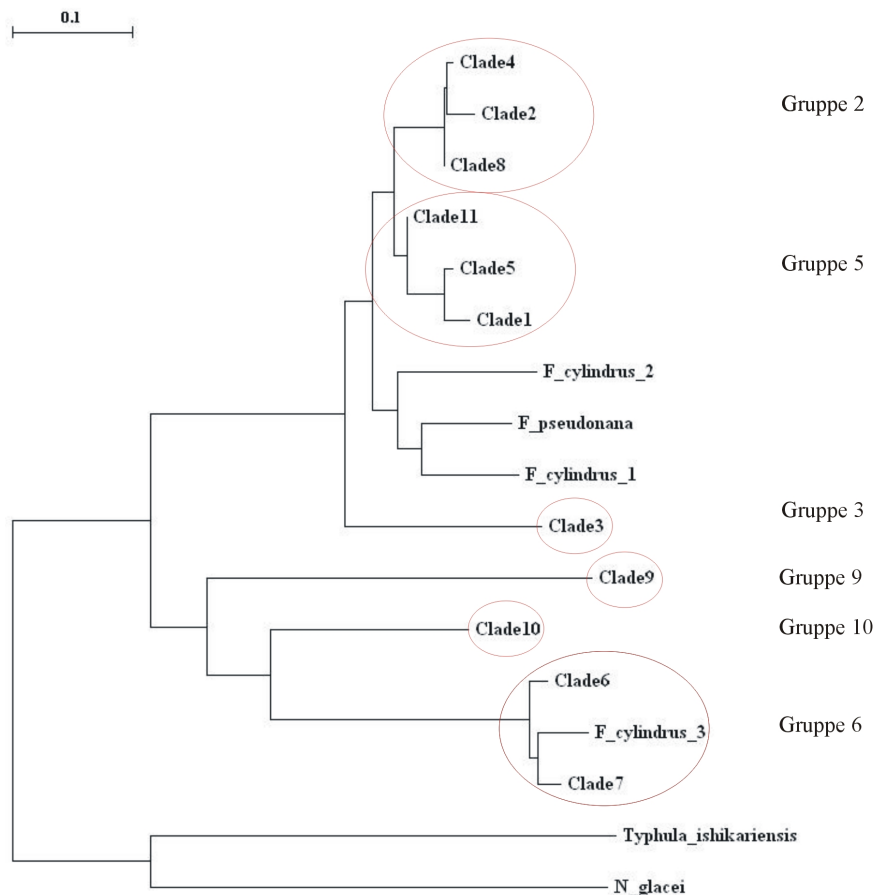


Abbildung 7: Verwandtschaftsgrad der Clades der AFP-Sequenzen aus *F. curta* auf Grund von Sequenzunterschieden, erstellt auf Aminosäurebasis in einem „Neighbour joining“ Baum. Mit einbezogen sind Sequenzen aus den Diatomeen *F. cylindrus*, *F. pseudonana* und *N. glacii* sowie eine AFP-Sequenz aus dem Pilz *Typhula ishikariensis*. Außerdem dargestellt ist die Zusammenfassung der Clades zu Gruppen, sowie deren Bezeichnung. Die Astlängen geben die phylogenetischen Unterschiede zwischen den Sequenzen an, 0,1 entspricht 10%

8, sowie 11, 5 und 1 bilden die Gruppen 2 bzw. 5. Sie sind den Sequenzen *F_cylindrus_1* und *F_cylindrus_2* sowie der Sequenz *F_pseudonana* ähnlich. Eine weitere Gruppe bilden Clade 6 und 7, zusammen mit der Sequenz *F_cylindrus_3*. Die Clades 3, 9 und 10 weisen größere Unterschiede zu anderen Clades auf und wurden keinen Gruppen zugeordnet. Sie werden im Folgenden mit Gruppe 3, 9 und 10 bezeichnet. Alle Clades zeigen größere Unterschiede zu den Sequenzen aus *N. glacii* und *T. ishikariensis* als zu den Sequenzen aus *F. cylindrus* und *F. pseudonana*. Für die Gruppen wurden Primer für die quantifizierende PCR entworfen. Die Namen der Gruppen, die im Verlauf der Arbeit benutzt werden, sind in Abbildung 7 rechts dargestellt.

3.1.5 Primer für die quantifizierende PCR

Auf Grundlage der Zuordnung der Sequenzen aus dem vorhergehenden Abschnitt wurden für die Real-Time-PCR Primer für alle Gruppen von AFPs entworfen. Das Design der Primer für die halbquantitative PCR erfolgte nur für die Gruppen 2, 3 und 5.

Die Primer für die halbquantitative PCR sind in Tabelle 19 aufgelistet. Tabelle 20 zeigt die Amplikonlänge, die sich aus der Amplifikation mit einem bestimmten Primerpaar ergibt, sowie die Zuordnung zur entsprechenden AFP-Gruppe und den dazugehörigen Klon, der als Sequenzgrundlage zum Primerdesign und der Bestimmung der Amplikonlänge diente.

Tabelle 21 stellt die Primer für die Real-Time-PCR dar. Neben den Primern für die AFP-Sequenzen sind außerdem die Primerpaare für das ribosomale Protein und Aktin aufgeführt. Außer den Sequenzen sind die Clades genannt, für die eine spezifische Amplifikation erhofft wurde, und der Klon, dessen Sequenz als Grundlage für das Design des Primers diente. Das Primerpaar für Aktin wurde von KRELL ET AL. (2006 B) übernommen.

Tabelle 19: Primer für die halbquantitative PCR

Name	Sequenz 5' → 3'
5_f	GAC GTC TGA ACA GGT TGT CG
7_f	ATG TAC CTG CCC CAG ATC C
10_f	CCG AGA TCA CTG GAA AGG C
6_r	TTG TGA TGA TGT TGC TGC CG
8_r	TTT GTT GGC GCT GAT GTT GC
9_r	CCC CGG CGT GTT GTT TTT G

Tabelle 20: Länge der Amplikons bei Verwendung der verschiedenen Primerkombinationen für die halbquantitative PCR, sowie die zugehörige AFP-Gruppe und der Klon, der als Sequenzgrundlage zum Primerdesign und der Amplikonlänge diente.

Name	Primerkombination	Amplikonlänge [bp]	AFP-Gruppe	Klon
HQ_1	7_f + 9_r	667	5	Fcurta_1.9E
HQ_2	7_f + 8_r	679	5	Fcurta.8
HQ_3	10_f + 8_r	559	2	Fcurta_1.5A
HQ_4	10_f + 9_r	547	2	Fcurta.3
HQ_5	5_f + 6_r	568	3	Fcurta_1.11F

Tabelle 21: Sequenzen der Primer für die Real-Time-PCR sowie die Clades, für die der Primer spezifisch sein sollte und der Klon der als Sequenzgrundlage zum Design des Primers genutzt wurde.

Name	Sequenz 5' → 3'	Clade	Klon
gr_2a_fw gr_2a_rev gr_2b_fw gr_2b_rev	CCA ATG TAC CTG GTG GAG CTA TTA C CTC GGT AGA CGT CGA AAA CTC A TGG CCC CTT CGA CAA CTC CCC GGT GTC AAT GTT AAA CCA	AFP 2, 4, 8	Fcurta_1_4G
gr_3_fw gr_3_rev	CAC TAT TGA CGT TAG AAT CAC CGA T TGT CTT AAT GAT GAA GAC GGA GCT	AFP 3	Fcurta_1_11F
gr_5a_fw gr_5a_rev gr_5b_fw gr_5b_rev	TGC CCC AGA TCC AAA AGC TA TCG AAC TGT CCA TGA CCA AG TC GGT GGC CCA TTC GGT AAC TC CAC CCG GTG TCA ACG TTA AAC	AFP 1, 5, 11	Fcurta_8
gr_6_fw gr_6_rev	TGA TCA TTG ATA GTT CGG ACA CAT T GTG TAG TCC GAC GCT TTG ACT	AFP 6	Fcurta_2_1B
gr_9_fw gr_9_rev	GAC TAC GTT GGC TCT GCA TTG A ACA TCC GAC GGC ATC TTC A	AFP 9	Fcurta_2_6H
gr_10_fw gr_10_rev	TAT TCA AGC TGC GGC TAC CA GGC GAC TGA CCA GAA GAT GTT C	AFP 10	Fcurta_2_7D
rib40_fw rib40_rev	CCA CGT GGT ACC GGT CTT GT CAA TCA GTA ATA GCA GCC ATC GA	ribosomales Protein	Fcurta_Rib40_1_1
actin_fw actin_rev	ATG AAG ATA TCG CTG CCC TTG T CCA GCG AAA CCG GCT TT	Aktin	nicht bekannt

3.2 Kultivierung

3.2.1 Vorversuche

Die Vorversuche dienten dazu, einen Überblick über das Wachstumsverhalten von *F. curta* bei verschiedenen Kulturbedingungen zu erhalten. Die verschiedenen Kulturbedingungen werden im Material und Methoden-Teil in Kapitel 2.2.2 detailliert beschrieben.

Bei einem Salzgehalt (34 ‰) verlief das Wachstum bei 0°C mit 0,42 Teilungen pro Tag langsamer als bei +5°C mit 0,50 Teilungen pro Tag (Abbildung 8 A). Die Temperatur von +5°C wurde als Ausgangstemperatur für den Kulturversuch ausgewählt, um eine möglichst große Temperaturdifferenz zu -4°C zu erreichen.

Die Zellzahl bei Erhöhung des Salzgehalts stellte ebenfalls einen Einflussfaktor auf die Fähigkeit der Zellen sich wieder zu erholen dar. Die Kulturen c und d, die bei einer Zelldichte von 100.000 Z/mL mit Salz auf 70 ‰ gebracht worden waren, erholten sich über den ganzen Versuchsverlauf nicht (Abbildung in Anhang B). Die Quanten-Ausbeute lag nach 23 Tagen noch immer um den Wert 0,1 (Daten nicht aufgeführt). Dahingegen erholte sich zumindest die Quanten-Ausbeute der Kulturen e2 und f2 (Abbildung 9), die bei einer Zellzahl von 500.000 Z/mL mit Salz behandelt worden waren, innerhalb der 14 Tage leicht. Danach wurde der Versuch abgebrochen, da bei den mit Sole-Lösung auf 70 ‰ gebrachten Kulturen e1 und f1 eine deutliche Erholung in der Quanten-Ausbeute zu verzeichnen war (Abbildung 9).

Wachstum war innerhalb von zwei Wochen bei keiner der Kulturen mit einem Salzgehalt von 70 ‰ zu verzeichnen (Abbildung 8).

Die Kulturen bei 50 ‰ dienten als Test, ob dieser Salzgehalt schon eine sehr stark schädigende Wirkung auf die Kultur hat. Beide Kulturen erholten innerhalb von 3 Tagen auf eine fast optimale Quanten-Ausbeute von 0,5 (Abbildung 9). Ab diesem Zeitpunkt setzte auch das Wachstum mit einer Rate von 0,28 Teilungen pro Tag für die Kultur bei +5°C und 0,13 Teilungen pro Tag bei 0°C wieder ein (Abbildung in Anhang B).

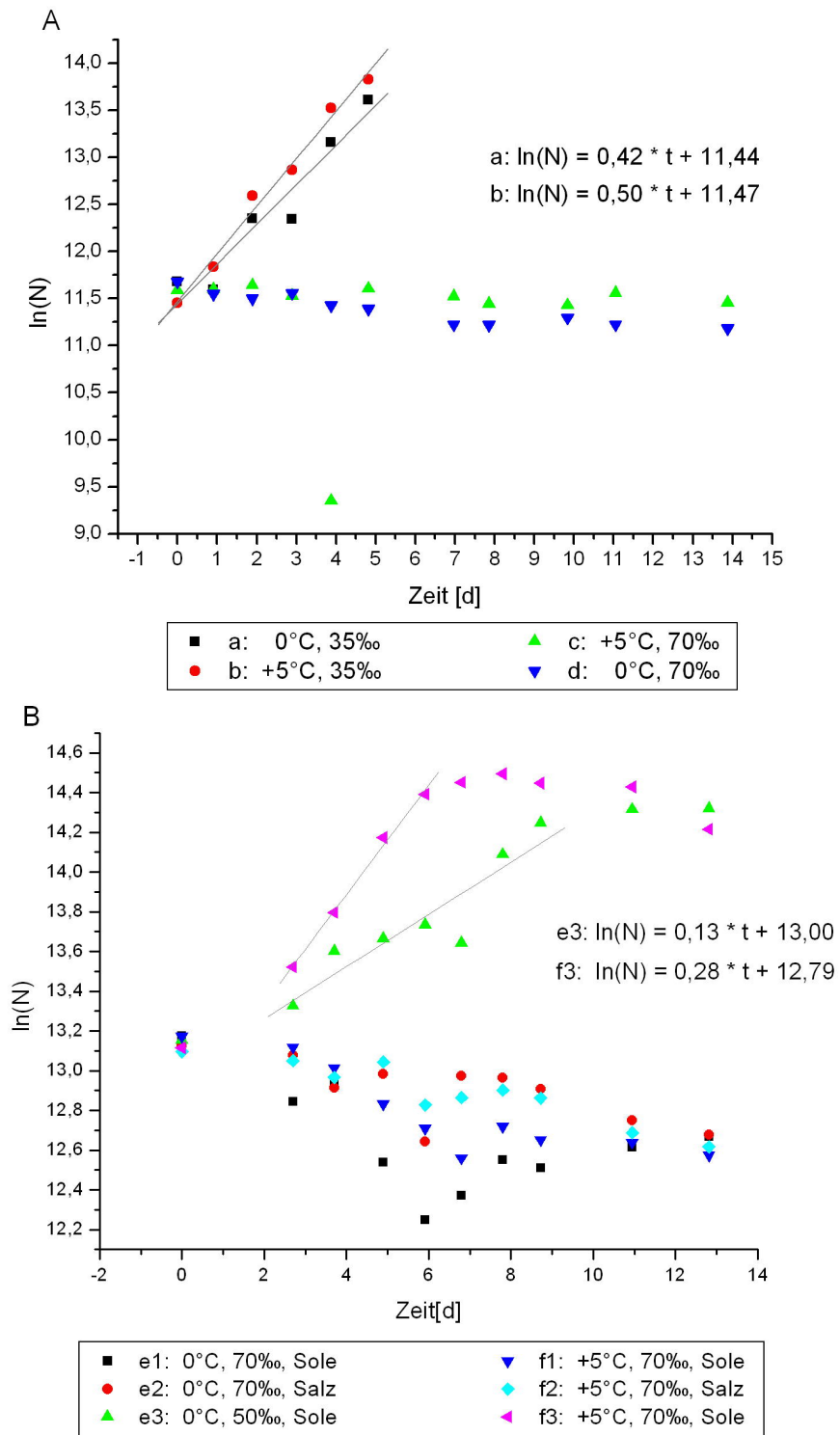


Abbildung 8: Wachstumsraten der Kulturen der Vorversuche unter verschiedenen Kulturbedingungen **A:** Kulturen a bis d, **B:** Kulturen e1 bis f3. Die Wachstumsraten der Kulturen a, b, e3 und f3 sind in den Diagrammen angegeben. Die Kulturen c, d, e1, e2, f1 und f2 zeigten kein Wachstum innerhalb von 2 Wochen, zu diesen Kulturen wurden keine Wachstumsraten berechnet.

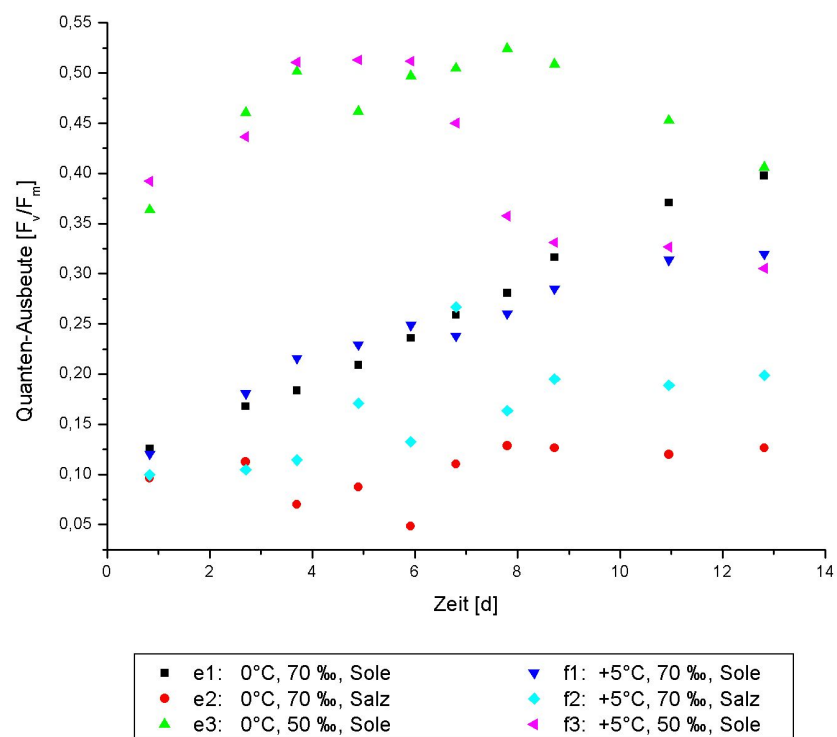


Abbildung 9: Ergebnisse der Bestimmung der Quanten-Ausbeute [F_v/F_m] der Kulturen e und f der Vorversuche, Kulturbedingungen siehe Legende.

3.2.2 Hauptversuch

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Vorversuchen ergaben sich für den Hauptversuch folgende Kulturbedingungen. Die Kontrollkulturen, die keinem Stress ausgesetzt waren, wurden bei $+5^{\circ}\text{C}$ und 34‰ kultiviert (Kulturbedingung 1). Kulturbedingung 2, mit einer Temperatur von $+5^{\circ}\text{C}$ und einem Salzgehalt von 70‰ ($\pm 2\text{‰}$), sollte den Einfluss des Salzgehalts ohne eine Temperaturänderung auf den physiologischen Zustand von *F. curta* und die Regulation der AFPs zeigen. Die letzte Kulturbedingung diente der Untersuchung der Reaktion auf Salz- und Kältestress. Diese Kulturen wurden auf 70‰ ($\pm 2\text{‰}$) aufgesalzen und auf -4°C abgekühlt (Kulturbedingung 3).

Temperatur und Salzgehalt

Bis zum Versuchsbeginn wurden alle Kulturen bei $+5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) und einem Salzgehalt von 34‰ kultiviert. Dann folgte die Erhöhung des Salzgehalts der Kulturen 2 und 3 innerhalb von 4 Stunden auf 70‰ ($\pm 2\text{‰}$) sowie gleichzeitig die Absenkung der Temperatur des Kulturschranks der Kulturen 3 auf -4°C . Die Einstellung der Temperatur in den Kulturen dauerte ca. 2 Tage bis auf einen Wert von $-3,5^{\circ}\text{C}$ (Abbildung 10), danach schwankte die Temperatur zwischen $-2,2^{\circ}\text{C}$ und $-4,0^{\circ}\text{C}$. In den Kulturen 1 und 2 lag die Temperatur zwischen $+4,2^{\circ}\text{C}$ und $+6,5^{\circ}\text{C}$.

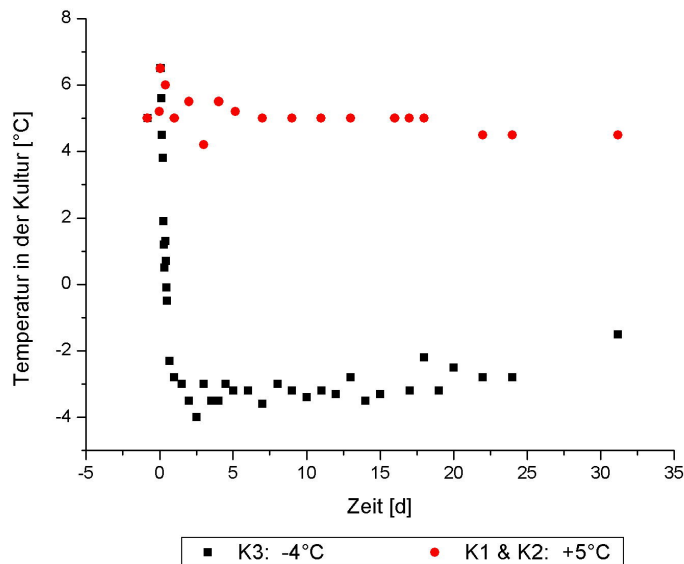


Abbildung 10: Temperaturverlauf in den Kulturen K1 und K2, die bei der Solltemperatur $+5^{\circ}\text{C}$ gehalten wurden und den Kulturen 3, die bei Versuchsstart von $+5^{\circ}\text{C}$ auf -4°C abgekühlt wurden.

Wachstumsverhalten

Das Wachstumsverhalten von *F. curta* unter den drei Kulturbedingungen ist in Abbildung 11 sowie Tabelle 22 dargestellt. Eine weitere Abbildung mit der Berechnung der Wachstumsraten der Kulturen 1 bis 3 ist in Anhang B zu finden. Die Kontrollkulturen (+5°C, 34‰) wuchsen exponentiell mit einer durchschnittlichen Wachstumsrate von 0,35 Teilungen pro Tag bis zu einer Zellzahl von ca. $2 \cdot 10^6$ Z/mL am Tag 6. Ab Tag 12 setzte die Absterbephase ein. Die Kulturen 2 und 3 (70‰) brachen bei Versuchsbeginn von einer Zellzahl von ca. 500.000 Z/mL auf ca. 200.000 Z/mL ein. Bei Kulturbedingung 3 (-4°C, 70‰) war nach einer Anpassungsphase von 7 Tagen wieder ein leichtes Wachstum mit einer Wachstumsrate von 0,05 Teilungen pro Tag zu verzeichnen. Ab Tag 22 stoppte das Wachstum. Die Kulturen 2 (+5°C, 70‰) zeigten bis zum Ende des Versuchs kein signifikantes Wachstum.

Die niedrige Wachstumsrate der Kontrollkulturen war auf ein verlangsamtes Wachstum von nur einer der drei Kulturen zurückzuführen (siehe Abbildung Anhang B). Kultur 1a und 1b wiesen eine Wachstumsrate von 0,37 bzw. 0,41 Teilungen pro Tag auf. Kultur 1c hingegen zeigte nur eine Wachstumsrate von 0,24 Teilungen pro Tag. Auf Grund der niedrigeren Zellzahlen der Kultur 1c ergeben sich auch die hohen Standardabweichungen unter Kulturbedingung 1 in Abbildung 11. Unter den Kulturbedingungen 2 und 3 war ein starkes Schwanken der Zellzahlen zu verzeichnen, wodurch sich die hohen Standardabweichungen ergeben.

Bei der Kontrolle der Kulturen unter dem Mikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss AG, Deutschland) wurde festgestellt, dass die Zellen nach der Salzzugabe in den Kulturen 2 und 3 großteils nicht mehr als Einzelzellen vorlagen, sondern unregelmäßige Klumpen bildeten (Abbildung im Anhang auf der CD). Diese Aggregat-Bildung wurde am Ende des Versuchs auch in den Kulturen 1 beobachtet.

Quanten-Ausbeute

Die Vitalität der Zellen wurde über die Quanten-Ausbeute bestimmt und ist in Abbildung 12 und Tabelle 22 für die drei Kulturbedingungen dargestellt. Nach dem Animpfen der Kulturen stieg die Quanten-Ausbeute aller Kulturen bis zum Versuchsstart (Tag 0) auf ca. 0,5 an. Die Kulturen 1 (+5°C, 34‰) blieben bis zu Tag 4 etwa auf diesem Niveau und fielen danach bis zu Tag 12 auf einen Wert von 0,4. Dort stagnierten sie für 10 Tage, bevor sie auf einen Wert von 0,36 am Ende des Versuchs abfielen.

Die Quanten-Ausbeute der Kulturen mit erhöhtem Salzgehalt sank bei Versuchsbeginn auf einen Wert von ca. 0,30 ab. Unter Kulturbedingung 3 (-4°C, 70‰) setzte sofort nach dem Absinken der Quanten-Ausbeute wieder eine Erholung ein, so dass die Quanten-Ausbeute nach 18 Tagen wieder einen Wert von 0,49 erreichte. Danach fiel die Quanten-Ausbeute der Kulturen 3 bis zum Ende des Versuchs auf 0,35 ab. Die Kulturen 2 (+5°C, 70‰) zeigten bis Tag 6 eine leichte Erholung der Quanten-Ausbeute bis auf einen Wert von 0,37 und darauf folgend ein Absinken auf einen Wert von 0,21 zum Versuchsende.

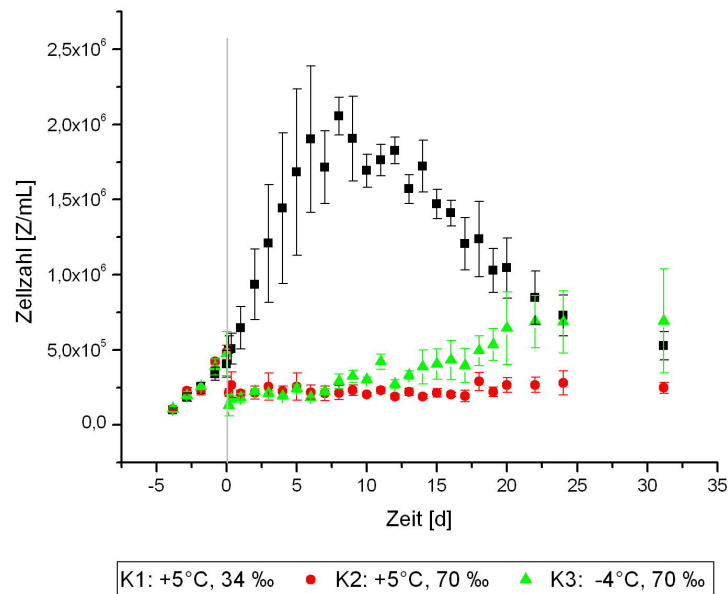


Abbildung 11: Zellzahlen der Kulturen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen in Z/mL. Die Werte sind aus den drei parallelen Kulturen gemittelt und die Standardabweichung ist angegeben. Der graue Strich bei Tag 0 markiert den Versuchsbeginn.

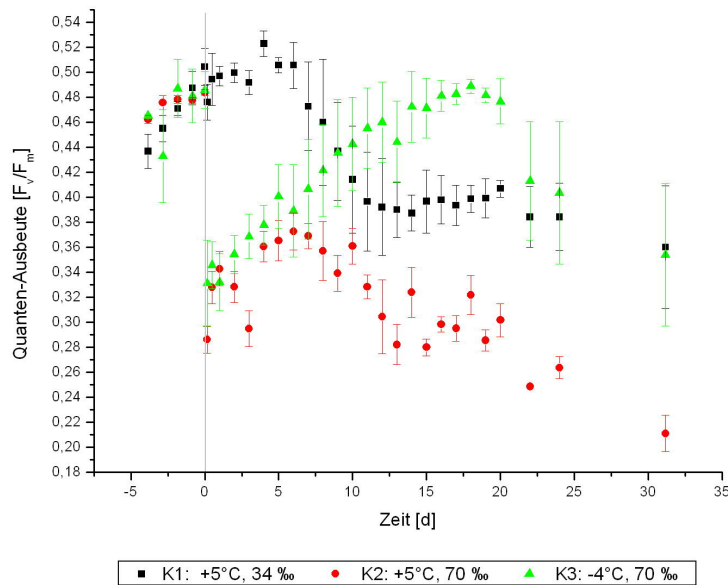


Abbildung 12: Ergebnisse der Messung der Quanten-Ausbeute. Die Werte sind aus den drei parallelen Kulturen gemittelt, und die Standardabweichung ist angegeben. Der graue Strich bei Tag 0 markiert den Versuchsbeginn.

Tabelle 22: Zusammenfassung der wichtigsten Daten der Zellzahlmessungen und der Bestimmung der Quanten-Ausbeute. T.: Teilungen

	Kulturen 1 (+5°C, 34 ‰)	Kulturen 2 (+5°C, 70 ‰)	Kulturen 3 (-4°C, 70 ‰)
Wachstum	bis Tag 3: $\mu = 0,35$ T. pro Tag	bei Aufsalzen: Einbruch keine Erholung	bei Aufsalzen: Einbruch Tag 7 bis Tag 22: $\mu = 0,05$ T. pro Tag
Quanten-Ausbeute	bis Tag 4: 0,49 bis Tag 12: Abfall auf 0,4 bis Tag 22: etwa 0,4 bis Versuchsende: Abfall auf 0,36	bei Aufsalzen: Einbruch von 0,48 auf 0,29 bis Tag 6: Erholung auf 0,37 bis Versuchsende: Abfall auf 0,21	bei Aufsalzen: Einbruch von 0,49 auf 0,33 bis Tag 18: Erholung auf 0,49 bis Versuchsende: Abfall auf 0,35

pH-Wert und Nährstoffe

Der pH-Wert, der bei Verschiebung in den basischen Bereich einen Mangel an CO₂ anzeigt, veränderte sich während der Versuchsdauer nicht. In den Kontrollkulturen (+5°C, 70 ‰) lag er bei 8,0. Die Kulturen mit dem auf 70 ‰ erhöhten Salzgehalt hatten einen konstanten pH-Wert von 8,5.

Der Verlauf der Konzentration der Nährstoffe Nitrat, Phosphat und Silikat sind in Abbildung 13 dargestellt. Zusätzlich wurden auch die Konzentrationen von Nitrit gemessen, die jedoch nicht abgebildet werden, da alle Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,4 $\mu\text{mol/L}$ lagen. Unter Berücksichtigung der Verdünnung, die für die Messung von den Proben angefertigt wurde, entspricht dies einem Wert von <20 $\mu\text{mol/L}$. Diese Werte wurden zur Darstellung auf Null gesetzt (Phosphat: T12 1a/b, T22 1b/c und T22 3b/c, Silikat: T12 1a/b/c, T22 1a/b/c sowie 2a und 3c). Außerdem wurde der Wert T22 1a zur Auswertung nicht berücksichtigt, da er mit Faktoren von 2,5 für Nitrat, 7 für Phosphat und 70 für Silikat zu stark von den Parallelen (T22 1b/c) abwich.

Nitrat (Abbildung 13A) und Phosphat (Abbildung 13B) zeigen im Verlauf der Konzentrationen die gleiche Tendenz. Bereits zu Versuchsbeginn sind sie geringer als in frischem F/2 Medium (Messwert bei -4 Tagen), da die Kulturen bis zu diesem Zeitpunkt bereits

4 Tage kultiviert worden waren. Zum Zeitpunkt T0 sind die Werte unter den verschiedenen Kulturbedingungen noch ähnlich, weil die Kulturbedingungen bis zum Versuchsstart gleich waren (+5°C, 34‰). Danach sinken die Nährstoffkonzentrationen bis zum Versuchsende ab. Der Abfall in den Kulturen 1 (+5°C, 34‰) ist am höchsten (Nitrat: von 900 µmol/L auf 370 µmol/L, Phosphat: von 40 µmol/L auf <20 µmol/L), danach folgt Kulturbedingung 3 (-4°C, 70‰). Bei Kulturbedingung 2 (+5°C, 70‰) sind die geringsten Veränderungen zu verzeichnen. Die Silikatkonzentration (Abbildung 13C) in den Kontrollkulturen fällt bereits innerhalb von 8 Tagen unter die Bestimmungsgrenze ab. Für die Kulturbedingung 3 ist kaum eine Änderung zu erkennen. Bei Kulturbedingung 2 steigt die Silikatkonzentration sogar leicht an.

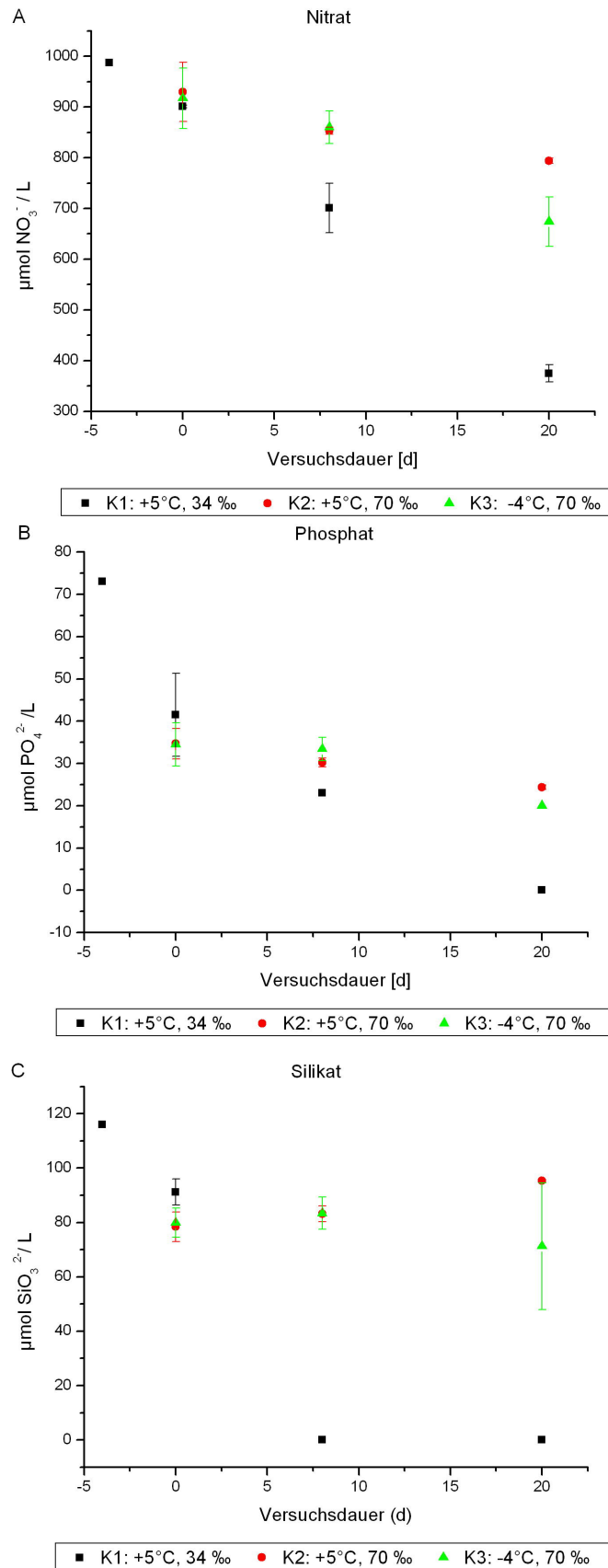


Abbildung 13: Dargestellt sind die Konzentrationen anorganischer Nährsalze zu den Zeitpunkten T0 (0 Tage), T12 (8 Tage) und T22 (20 Tage). Die Werte bei -4 (schwarze Rechtecke) zeigen die Konzentration des Nährstoffes in frischem F/2 Medium. Null-Werte lagen unter der Bestimmungsgrenze ($<20 \mu\text{mol/L}$). **A:** Nitrat, **B:** Phosphat, **C:** Silikat.

3.3 RNA-Extraktion und Expressionsanalyse

3.3.1 RNA-Extraktion

Tabelle 23 stellt die Auswahl der Proben, die in der Expressionsanalyse zum Einsatz kamen, dar. Die Auswahl erfolgte anhand der Ergebnisse des Zellwachstums und der Quanten-Ausbeute.

Tabelle 23: Aufzählung der Proben, aus denen die RNA isoliert wurde. Angegeben sind die Probenbezeichnung und die dazugehörige Versuchsdauer. Außerdem wird genannt, weshalb der Zeitpunkt zur RNA-Extraktion gewählt wurde.

Probenbezeichnung	Versuchsdauer [d]	Beschreibung
T0	0	unmittelbar vor Versuchbeginn, alle Kulturen sind noch unter Kontrollbedingungen (+5°C, 34 ‰)
T5	1	1 Tag nach Versuchbeginn
T7	2	Temperatureinstellung bei Kulturbedingung 3 (-4°C, 70 ‰) abgeschlossen
T13	7	Quanten-Ausbeute der Kulturen 3 (-4°C, 70 ‰) übersteigt die Quanten-Ausbeute der Kulturen 2 (+5°C, 70 ‰)
T19	14	Wiederaufnahme des Zellwachstums in Kulturen 3 (-4°C, 70 ‰)
T22	20	Versuchsende

Die Konzentrationen der extrahierten und aufgereinigten RNA lagen in einem Bereich zwischen etwa 80 und 1100 ng Gesamt-RNA pro μL . Im Folgenden wird die Gesamt-RNA nur als RNA bezeichnet, da für den weiteren Versuchsverlauf eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen RNA-Spezies nicht von Bedeutung ist. Die A260/A280-Werte, die bei einem Wert kleiner 2,0 eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenolen anzeigen, betrugen 2,02 bis 2,34. Der A260/A230-Wert lag in einem Bereich von 1,80 bis 2,63. Er gibt Verunreinigungen mit Kohlenhydraten, Peptiden, Phenolen oder Aromaten an. Für eine saubere RNA sollte der Wert über 1,8 liegen. Eine detaillierte Aufzählung der Ergebnisse aller Proben befindet sich im Anhang (CD).

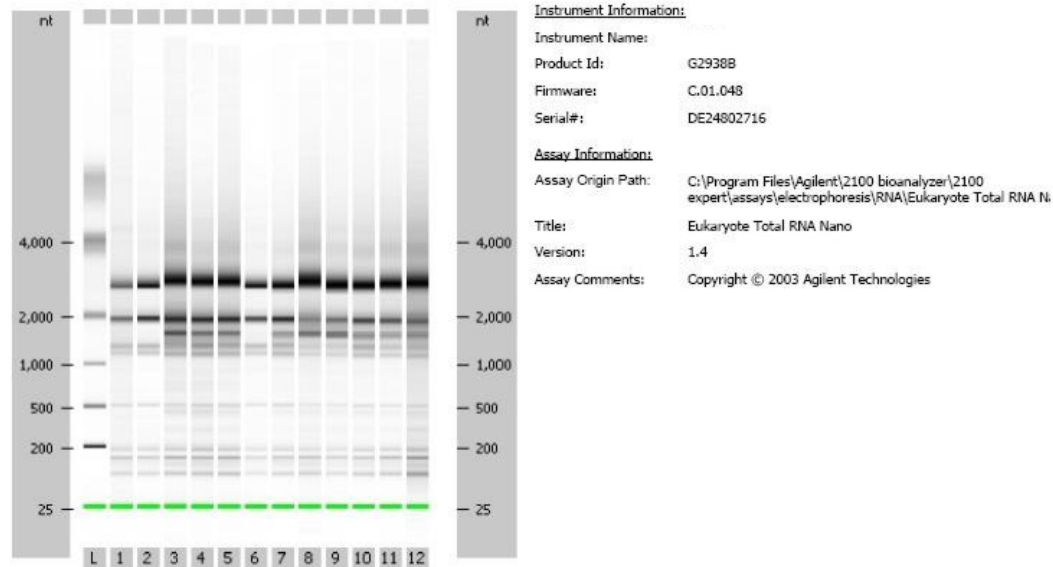
Die Analyse mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Deutschland) zeigte, dass die RNA nicht degradiert war. Exemplarisch sind die Ergebnisse einiger Proben in Abbildung 14 dargestellt. Der Peak bei 45 Sekunden zeigt die 28S-RNA, der bei 41 Sekunden die 18S-RNA. Knapp unter 40 Sekunden ist die plastidäre RNA zu finden. Im Bereich zwischen 25 und 30 Sekunden tritt die tRNA auf. Die 18S- und 28S-RNA gelten als Indikator für die Qualität aller RNA Spezies. Für eine RNA guter Qualität sollte der 28S-Peak etwas größer sein als der 18S-Peak. Besonders wichtig ist, dass im niedermolekularen Bereich keine RNA-Fragmente auftreten, da dies auf eine Degradation hinweist, die meistens auch in einer Verringerung der 18S- und 28S-Peaks sichtbar wird. mRNA, die für die Expressionanalyse interessante Spezies der RNA, ist in den Chromatogrammen nicht sichtbar.

2100 expert_EukaryoteTotal RNA

Page 1 of 29

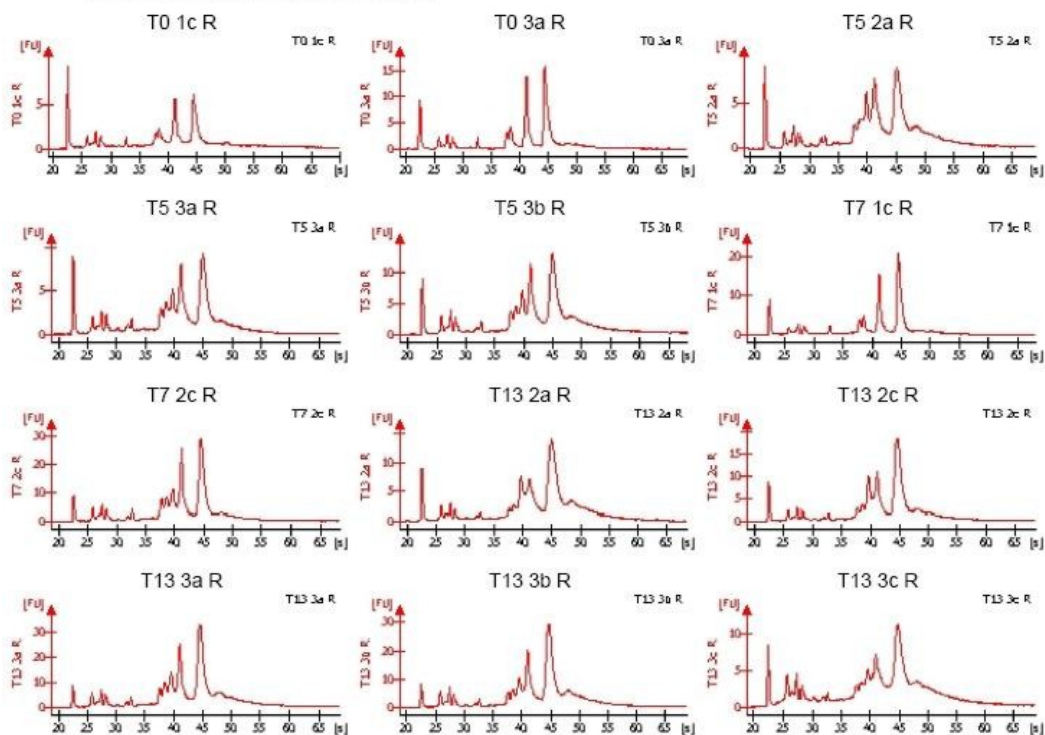
Assay Class: EukaryoteTotal RNA Nano Read: 6/12/2006 10:45:22 AM
 Data Path: D:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802716_2006-06-12_10-45-22.xad Modified: 6/12/2006 11:10:05 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

Instrument Name:
 Product Id: G29388
 Firmware: C.01.048
 Serial#: DE24802716
 Assay Information:
 Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\electrophoresis\RNA\Eukaryote Total RNA N
 Title: Eukaryote Total RNA Nano
 Version: 1.4
 Assay Comments: Copyright © 2003 Agilent Technologies



2100 expert

© Copyright 2003 Agilent Technologies, Inc.

Printed: 6/12/2006 11:17:23 AM

Abbildung 14: Protokoll der Qualitätskontrolle der isolierten RNA mittels Agilent Bioanalyzer. Oben befindet sich eine Darstellung als Gel, an der Seite ist die Fragmentgröße in bp angegeben. Unten sind die Ergebnisse als Chromatogramme dargestellt. Zur genaueren Erläuterung siehe Text.

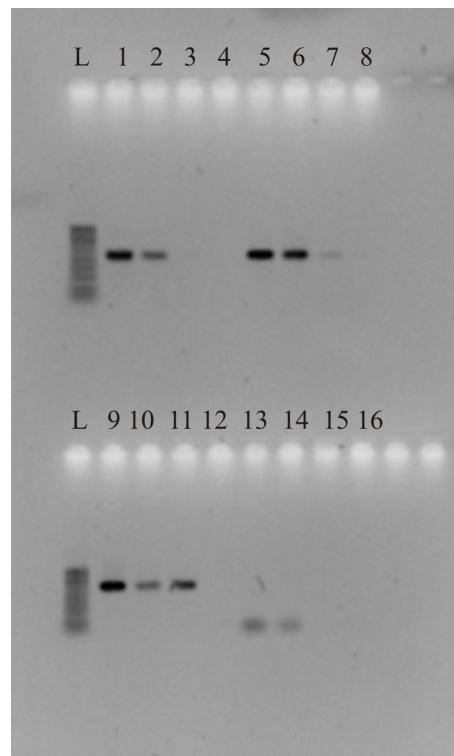
3.3.2 Halbquantitative PCR

Optimierung des Temperaturprogramms und Spezifitätstest der Primer

Bei der Amplifikation der cDNA mit den verschiedenen Primerkombinationen (Tabelle 20) trat bei HQ_1, HQ_3 und HQ_5 ein Produkt der gesuchten Größe auf. Die Primerkombinationen HQ_2 und HQ_4 zeigten keine Amplifikation (Daten im Anhang B).

Mit den Primerpaaren HQ_1, HQ_3 und HQ_5, sowie den ribosomalen Primern die auch in der Real-Time-PCR als Standard dienten, wurden der Spezifitätstest und die Optimierung des Temperaturprogramms durchgeführt. Die Ergebnisse und die Beschreibung der untersuchten Primer und Templates sind in Abbildung 15 dargestellt. Die Annealingtemperatur für die Primerpaare HQ_3 und HQ_5 betrug 64°C. Für das Primerpaar HQ_1 66°C und für die rib-Primer 62°C. Die Zyklenzahl wurde auf 30 festgelegt.

Wie erwartet, fand bei den PCRs der untersuchten Primerpaare und Templates 1 und 2, 5 und 6, 9 und 10 sowie 13 und 14 eine Amplifikation statt. Bei allen ist die Bande mit der Verdünnung des Standards von 10^{-8} schwächer als die Bande mit der Verdünnung 10^{-5} . Das Primerpaar HQ_1 zeigte allerdings eine unspezifische Amplifikation mit dem Standard der Gruppe 2, weshalb dieses für die weitere Verwendung ausgeschlossen wurde. Auch Primerpaar HQ_5 zeigte eine schwache unspezifische Amplifikation. Diese kann jedoch für die halbquantitative PCR vernachlässigt werden. Die Negativkontrolle mit Wasser war bei allen Proben negativ.



Bezeichnung	Primer- kombination	Zielgruppe	Template	
			Gruppe	Verdünnungsstufe
1	HQ_3	2	2	10^{-5}
2			2	10^{-8}
3			3	10^{-5}
4			Wasser	-
5	HQ_5	3	3	10^{-5}
6			3	10^{-8}
7			5	10^{-5}
8			Wasser	-
9	HQ_1	5	5	10^{-5}
10			5	10^{-8}
11			2	10^{-5}
12			Wasser	-
13	rib40	rib40	rib	10^{-5}
14			rib	10^{-8}
15			3	10^{-5}
16			Wasser	-

Abbildung 15: Optimierung des Temperaturprogramms der halbquantitativen PCR und Test der Primer auf Spezifität. Amplifiziert wurden jeweils zwei Standardprodukte der Zielsequenz in unterschiedlicher Konzentration, sowie ein Standardprodukt einer anderen Sequenz als Test auf die Spezifität. Außerdem wurde zu jedem Primerpaar eine Negativkontrolle mit Wasser durchgeführt. Beschriftungen: L: Ladder 100 bp bis 1 kb. Die Primer und Templatekombinationen von 1 bis 16 sind der Tabelle zu entnehmen.

3.3.3 Expression

Zunächst wurde für die drei ausgewählten Primerpaare die halbquantitative PCR mit allen Proben der Probenahmezeitpunkte T0 und T22 durchgeführt, um einen Überblick zu erhalten, ob eine Regulation stattfindet. Für das Primerpaar HQ_3 konnte eine Hochregulation unter allen drei Kulturbedingungen festgestellt werden. Das Primerpaar HQ_5 zeigte kaum eine Amplifikation, so dass nicht erkennbar war, ob eine Regulation auftrat. Für die weitere Analyse wurde es deshalb ausgeschlossen. Die Amplifikation mit den ribosomalen Primern zeigte entgegen den Erwartungen auch Unterschiede in der Stärke der Banden. Die Daten zu den vorläufigen Ergebnissen der halbquantitativen PCR befinden sich im Anhang (CD).

Das Primerpaar HQ_3, welches die AFP-Sequenzen aus Gruppe 2 (AFP_2) amplifiziert, sowie das Primerpaar rib40 wurde in der halbquantitativen PCR mit allen RNA-Proben verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

In den Kontrollkulturen (+5°C, 34‰) war nach 14 Tagen eine vermehrte Expression des AFP_2 zu erkennen, die bis zu Tag 22 wieder abnahm. Sowohl die Kulturen bei +5°C und 70‰ als auch die mit Salz und Kälte behandelten Kulturen zeigten schon nach einem Tag eine vermehrte Expression des AFP_2. Die Expression bei +5°C nahm zum Versuchsende wieder stark ab, wohingegen sie bei -4°C bis zum Ende deutlich erhöht war. Das ribosomale Protein wurde in der Kontrollkultur bis kurz vor Ende des Versuchs, an dem es leicht abfällt, gleichmäßig exprimiert. Die Kulturen 2 (+5°C, 70‰) zeigten eine gegenüber der Kontrollkultur verminderte Expression, die von Tag 7 bis 14 etwas stärker war als zu Beginn und gegen Ende der Kultivierung. Die Kulturen 3 (-4°C, 70‰) wiesen eine vergleichsweise konstante Expression des ribosomalen Proteins auf. Dabei lag die Stärke der Banden in der Größenordnung wie die der Kontrollkultur und nahm zum Ende der Untersuchung etwas ab.

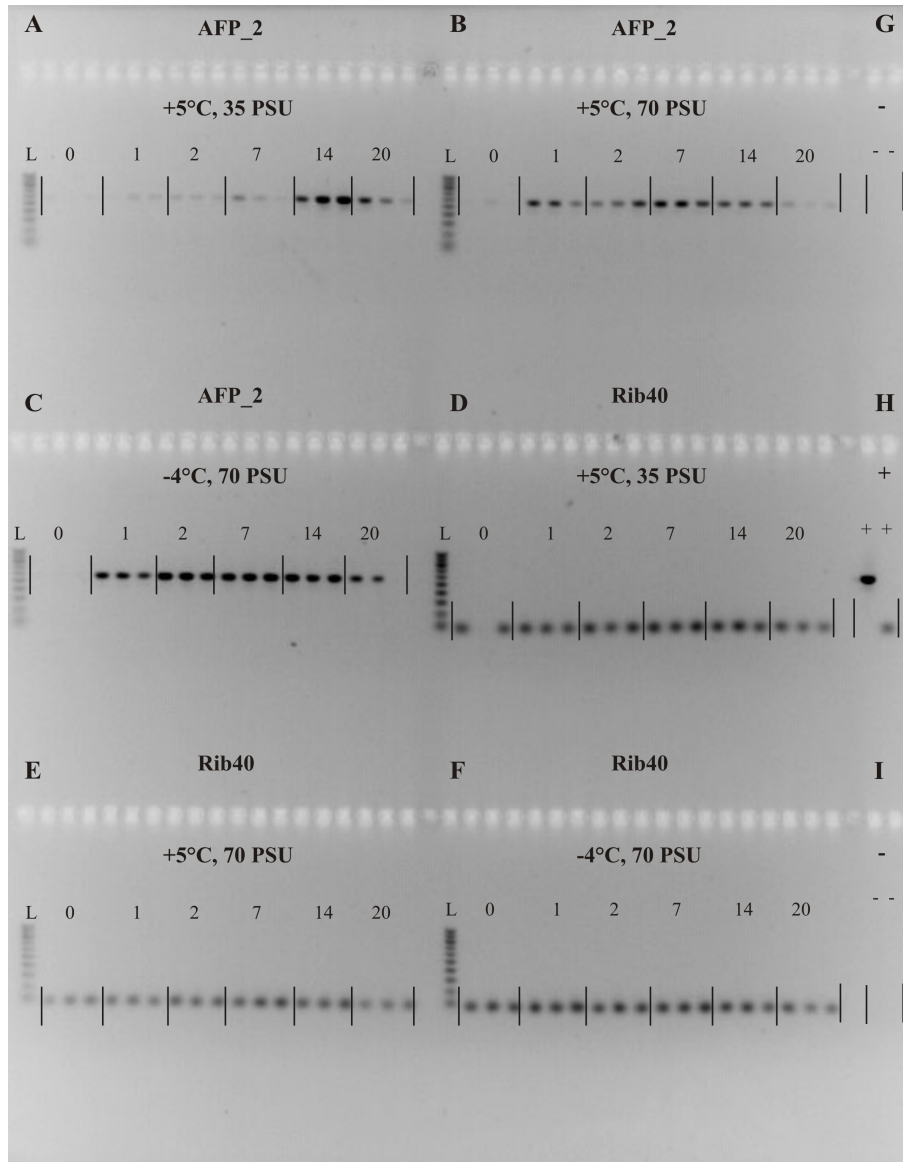


Abbildung 16: Ergebnisse der halbquantitativen PCR. A, B, C: Primer HQ_3 (AFP Gruppe 2); D, E, F: Primer rib40 (ribosomales Protein); beide Primerpaare jeweils mit den unterschiedlichen Kulturbedingungen. Die Zahlen geben die Versuchsdauer in Tagen (0 bis 20) an. Zu jedem Zeitpunkt wurden die biologischen Tripilikate untersucht. G: Negativkontrollen HQ_3, H: Positivkontrollen HQ_3 und rib40; I: Negativkontrollen rib40; L: Ladder 100 bp bis 1 kb

3.3.4 Real-Time-PCR

Primertest

Für die Untersuchung der Expression mittels Real-Time-PCR wurden die AFP-Primer gr_2a, gr_5b und gr_10 ausgewählt, da sie drei unterschiedliche Gruppen von AFPs repräsentieren. Bei der Durchführung des Spezifitätstest mit dem Standard-Template der entsprechenden und einer „falschen“ AFP-Gruppe, stellte sich heraus, dass es beim Primerpaar gr_5b zu einer unspezifischen Amplifikation kam. Der c_t -Unterschied zwischen dem „richtigen“ und dem „falschen“ Template betrug für das Primerpaar gr_5b nur 7 c_t , wohingegen er für die anderen beiden Primerpaare mindestens 15 c_t betrug. Die Daten dazu befinden sich im Anhang (CD).

Expression

Das ribosomale Protein wurde, wie in Abbildung 17 dargestellt, exprimiert. In den Kontrollkulturen stieg die Expression bis zum zweiten Versuchstag von $6,6 \cdot 10^4$ auf $8,0 \cdot 10^4$ Kopien pro ng RNA. Bei der relativen Auswertung ergab sich ein Faktor 2. Danach fiel die Expression bis zum Versuchsende auf eine Kopienzahl von $2,0 \cdot 10^4$ Kopien pro ng RNA ab. In der relativen Auswertung entsprach das einem Faktor von etwa 1/2. Nach dem Salzschock sank die Expression von rib40 in den Kulturen 2 und 3 von $3,9 \cdot 10^4$ auf $0,46 \cdot 10^4$ (+5°C, 70 %) bzw. $0,89 \cdot 10^4$ (-4°C, 70 %) Kopien pro ng RNA. Die dazu in der relativen Auswertung errechneten Faktoren waren 1/12 bzw. 1/3. Danach folgte eine Erholung unter beiden Kulturbedingungen bis zu Tag 2. Die Expression von rib40 in den Kulturen 2 sank zwischen Tag 2 und Tag 20 von einem Wert von $1,0 \cdot 10^4$ auf $0,18 \cdot 10^4$ Kopien pro ng RNA. Zum Versuchsende entsprach das einem Faktor von 1/45 im Vergleich zu T0, berechnet unter Berücksichtigung des internen Standards MA. Die Kulturen 3 zeigten den gleichen Verlauf der Expression mit höheren Kopienzahlen. Für Tag 2 wurden $2,6 \cdot 10^4$ Kopien pro ng RNA ermittelt, die bis Tag 20 auf $1,5 \cdot 10^4$ Kopien pro ng RNA abnahmen. Das entsprach in der relativen Auswertung einem Faktor von etwa 1/3 im Vergleich zum Ausgangswert.

Aktin hatte eine dem ribosomalen Protein sehr ähnliche Expressionskinetik (Abbildung 18). Die Kontrollkulturen zeigten einen Anstieg der Kopienzahl von $4,6 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA zu Versuchsbeginn auf $6,2 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA am Tag 2. Danach fiel die Kopienzahl bis zum Versuchsende bis auf $2,5 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA ab. In der relativen Auswertung ergab sich ein Faktor von 2,3 für den Anstieg und von etwa 2/3 für den Abfall, bezogen auf T0. Die Aktin-Kopienzahlen der Kulturen 2 fielen von etwa $4,3 \cdot 10^6$ auf $0,82 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA (Tag 1), gefolgt von einer Erholung auf $1,3 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA (Tag 7) und einem erneuten Abfall auf $0,56 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA bis zu Tag 14. In der relativen Auswertung ergaben sich daraus Faktoren von 1/8 für Tag 1, 1/5 für Tag 7 und 1/16 für Tag 14. Die Kulturen unter Kälte- und Salzstress wiesen zu

Versuchsbeginn eine Kopienzahl von $5,2 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA auf. Sie fiel auf $1,6 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA am Tag 1 ab, stieg wieder auf $2,9 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA und fiel erneut auf $2,0 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA. Als Ergebnis der relativen Auswertung erhielt man einen Faktor von 1/2 für Tag 1, etwa 3/4 für Tag 7 und wieder 1/2 für Tag 14.

Abbildung 19 zeigt die Expression von AFP_2, amplifiziert mit den Primern gr_2a. In allen Kulturen lag AFP_2 zu Beginn unter Kontrollbedingungen ($+5^\circ\text{C}$, 34‰) in etwa 300-facher Kopienzahl pro ng RNA vor. Die Kontrollkulturen ($+5^\circ\text{C}$, 34‰) verblieben zunächst auf diesem Niveau und stiegen zum Ende hin bis auf eine Kopienzahl von ca. $3,5 \cdot 10^3$ Kopien pro ng RNA. Unter Berücksichtigung des internen Standards MA ergab sich ein Faktor von 15. Die Kulturen 2 ($+5^\circ\text{C}$, 70‰) stiegen bis zu Tag 7 auf einen Wert von $1,3 \cdot 10^3$ Kopien pro ng RNA. In der relativen Auswertung entsprach das einem Faktor 2,6. Zum Versuchsende ergab die absolute Auswertung wieder eine Kopienzahl von 300, wohingegen die relative Auswertung eine Herabregulation um den Faktor 1/2 zeigte. Die kälte- und salzgestressten Kulturen zeigten ab dem ersten Tag eine deutliche Erhöhung der Kopienzahl, die bis zum zweiten Tag auf $9,2 \cdot 10^3$ Kopien pro ng RNA anstieg. In der relativen Auswertung ergab sich hier ein Faktor 44. Danach sank die Expression wieder auf etwa $5,8 \cdot 10^3$ Kopien pro ng RNA ab, entsprechend einem Faktor von etwa 30 im Vergleich zu T0 in der relativen Auswertung. Dieses Niveau wurde bis zum Versuchsende gehalten.

Die Expression von AFP_10 ist in Diagramm 20 dargestellt. Die Kontrollkultur zeigte bis zu Tag 2 eine Herabregulation von $1,1 \cdot 10^5$ auf $0,25 \cdot 10^5$ Kopien pro ng RNA. In der relativen Auswertung entsprach das einem Faktor von etwa 1/3 im Vergleich zu T0. Danach stieg die Kopienzahl bis zum Versuchsende auf $13 \cdot 10^5$ Kopien pro ng RNA. Unter der Berücksichtigung von MA ergab sich eine Zunahme um den Faktor 15 im Vergleich zum Ausgangswert. Unter Kulturbedingung 2 nahm die Kopienzahl von AFP_10 von etwa $2,0 \cdot 10^5$ Kopien pro ng RNA zu Versuchsbeginn auf $0,12 \cdot 10^5$ Kopien pro ng RNA am Versuchsende ab. In der relativen Auswertung ergab sich eine Herabregulation um den Faktor 1/60. Unter der Kulturbedingung 3 war bis zu Tag 14 eine Herabregulation von $1,3 \cdot 10^5$ um den Faktor 1/2 auf $0,65 \cdot 10^5$ zu verzeichnen. Zum letzten Probenahmezeitpunkt war wieder ein ähnlicher Wert wie zum Versuchsstart zu verzeichnen.

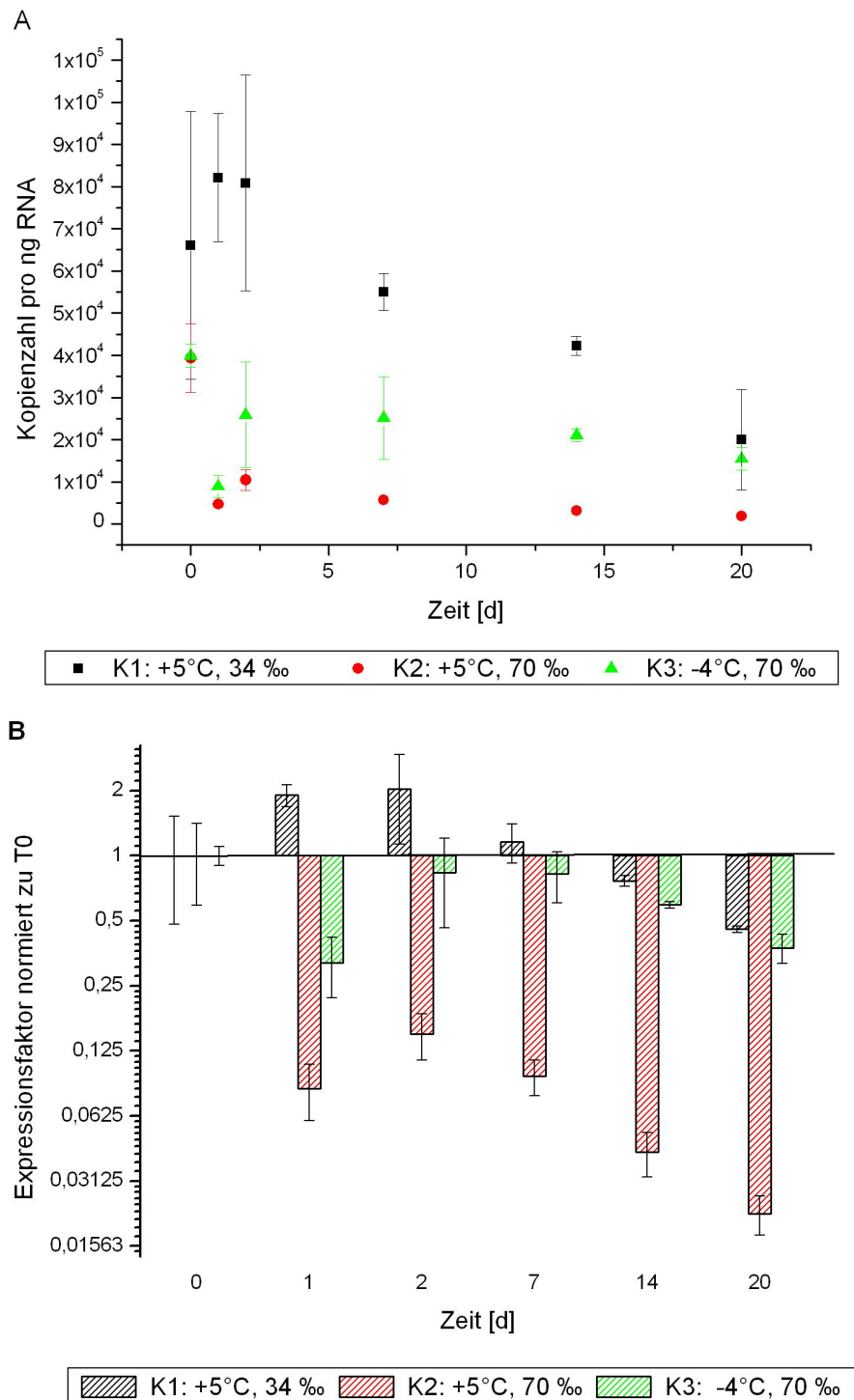


Abbildung 17: Expression von rib40. **A:** Absolute Quantifizierung: Aufgetragen ist die Kopienzahl des Gens pro ng isolierter Gesamt-RNA gegen die Versuchsdauer. Der interne Standard MA wird nicht berücksichtigt. **B:** Relative Quantifizierung: Dargestellt sind die Expressionsfaktoren zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs. Die Expressionsfaktoren errechnen sich aus einer Normierung der Einzeldaten mit dem internen Standard MA und einer Normierung der Mittelwerte auf den Ausgangszustand der Kulturen (T0). T0 zeigt nur die Standardabweichung, da der Wert durch die Normierung 1 beträgt.

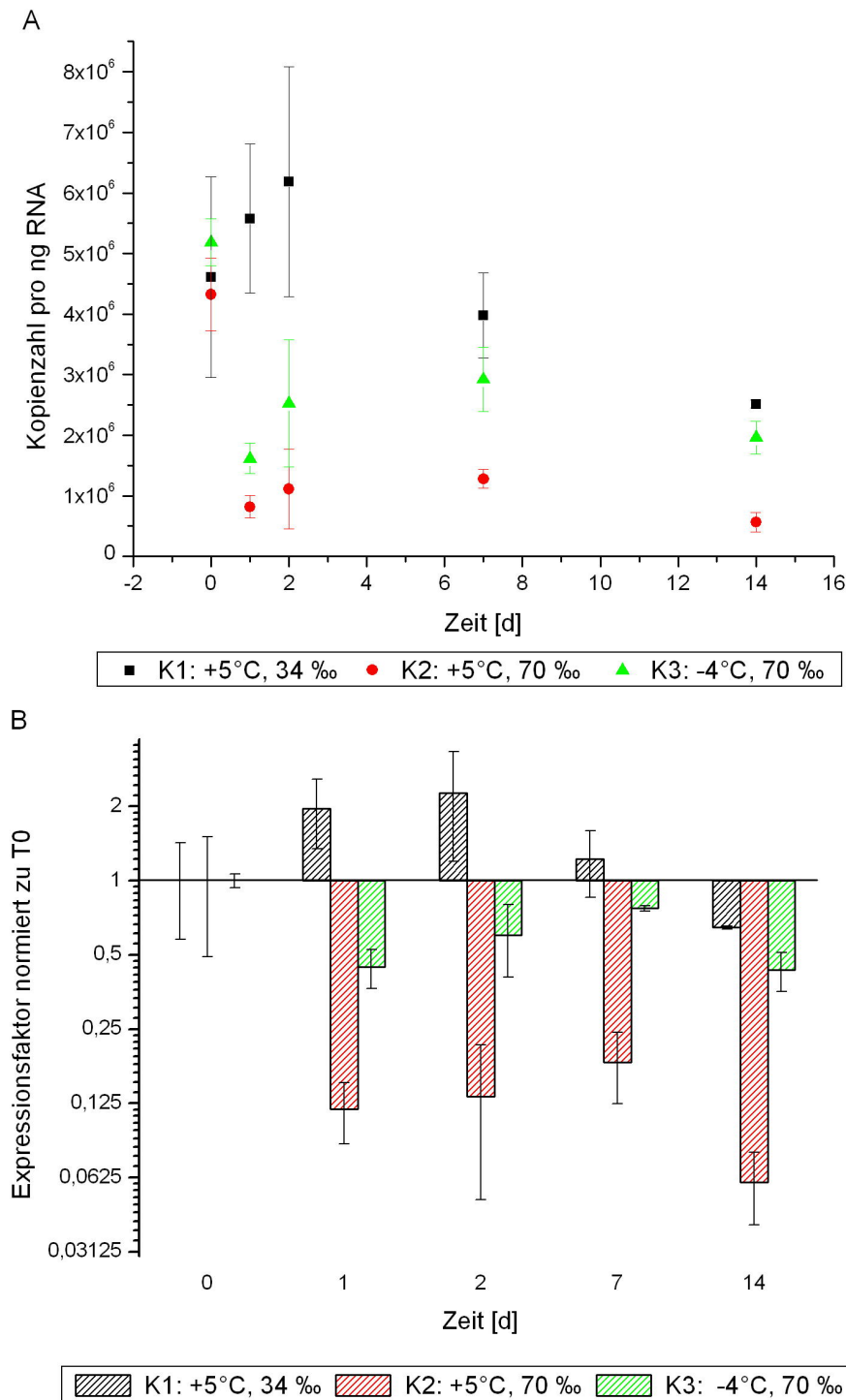


Abbildung 18: Expression von Aktin. **A:** Aufgetragen ist die Kopienzahl des Gens pro ng isolierter Gesamt-RNA gegen die Versuchsdauer. Der interne Standard MA wird nicht berücksichtigt. **B:** Relative Quantifizierung: Dargestellt sind die Expressionsfaktoren zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs. Die Expressionsfaktoren errechnen sich aus einer Normierung der Einzeldaten mit dem internen Standard MA und einer Normierung der Mittelwerte auf den Ausgangszustand der Kulturen (T0). T0 zeigt nur die Standardabweichung, da der Wert durch die Normierung 1 beträgt.

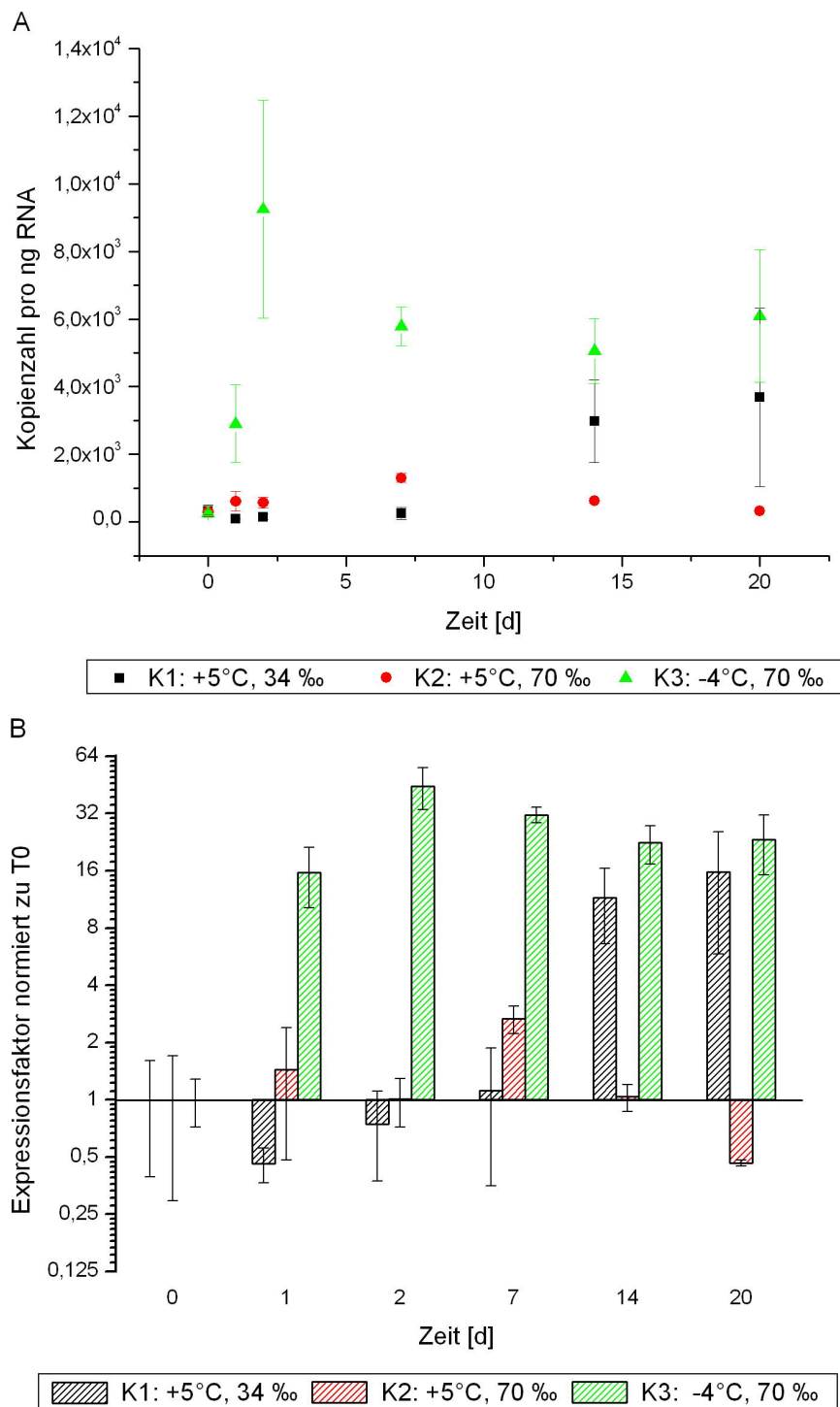


Abbildung 19: Expression von AFP₂, amplifiziert mit Primerpaar gr_{2a}. **A:** Absolute Quantifizierung. Aufgetragen ist die Kopienzahl des Gens pro ng isolierter Gesamt-RNA gegen die Versuchsdauer. Der interne Standard MA wird nicht berücksichtigt. **B:** Relative Quantifizierung; Dargestellt sind die Expressionsfaktoren im Laufe des Versuchs. Die Expressionsfaktoren errechnen sich aus einer Normierung der Einzeldaten mit dem internen Standard MA und einer Normierung der Mittelwerte auf den Ausgangszustand der Kulturen (T₀). T₀ zeigt nur die Standardabweichung, da der Wert durch die Normierung 1 beträgt.

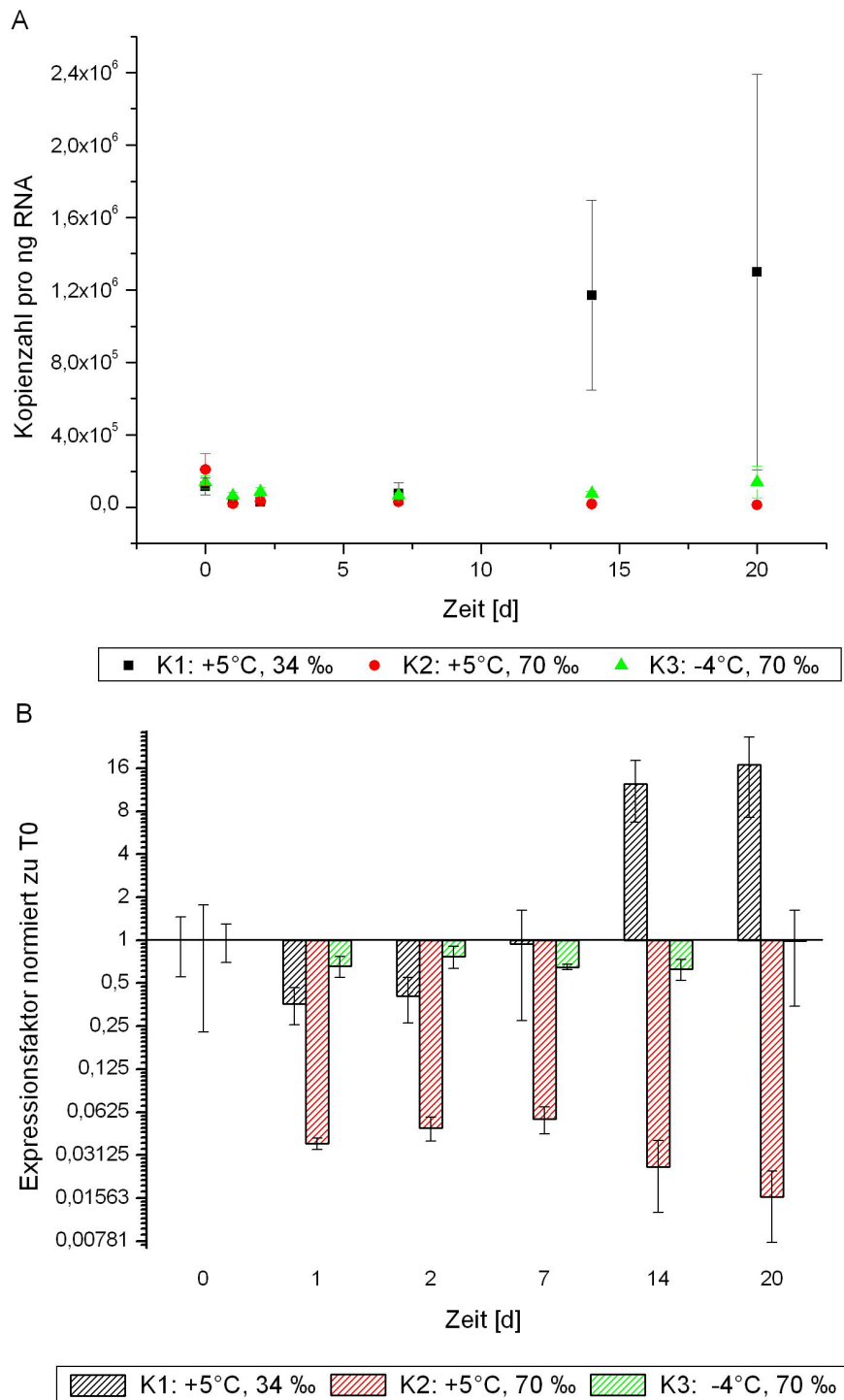


Abbildung 20: Expression von AFP₁₀. **A:** Absolute Quantifizierung. Aufgetragen ist die Kopienzahl des Gens pro ng isolierter Gesamt-RNA gegen die Versuchsdauer. Der interne Standard MA wird nicht berücksichtigt. **B:** Relative Quantifizierung: Dargestellt sind die Expressionsfaktoren zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs. Die Expressionsfaktoren errechnen sich aus einer Normierung der Einzeldaten mit dem internen Standard MA und einer Normierung der Mittelwerte auf den Ausgangszustand der Kulturen (T₀). T₀ zeigt nur die Standardabweichung, da der Wert durch die Normierung 1 beträgt.

4 Diskussion

4.1 AFPs in *Fragilariopsis curta*

Es wurden insgesamt 196 Klone untersucht, die aus der genomischen DNA von *F. curta* amplifizierte AFP-Sequenzen tragen sollten. Eine Restriktionsanalyse ergab, dass 120 Klone Inserts der gewünschten Größe enthielten, welche zur Sequenzierung genutzt wurden. Die geringe Anzahl der Inserts tragenden Plasmide war vermutlich darauf zurückzuführen, dass eines der PCR-Produkte vor der Klonierung nicht aufgereinigt worden war. Dadurch kam es zur Aufnahme vieler kurzer Fragmente in die Vektoren, die für die Sequenzierung wertlos waren. Weitere 18 Sequenzen eigneten sich auf Grund schlechter Qualität nach der Sequenzierung nicht zur weiteren Analyse. Die verbleibenden 102 Sequenzen umfassten 40 Isoformen von AFPs und konnten 11 Clades zugeordnet werden (Abbildung 7). Innerhalb der Clades wichen die Sequenzen in maximal 1% der Nukleotide voneinander ab. Inserts oder Deletionen waren innerhalb eines Clades nicht erlaubt.

Wie zu erwarten, wurden bei der Amplifikation aus der genomischen DNA mit Primerpaar 1 vorwiegend Sequenzen gewonnen, die große Ähnlichkeit mit den Sequenzen *F_cylindrus_1*, *F_cylindrus_2* und *F_pseudonana* haben (Abbildung 2 und Tabellen 17 und 18), da dieses Primerpaar auf Grundlage dieser drei Sequenzen entworfen worden war. Die 26 mit Primerpaar 1 amplifizierten Sequenzen sind in den Clades 1, 2, 3, 4 und 5 zu finden (Abbildung 7). In Clade 1 sowie Clade 8 und 11, die auch in der Ähnlichkeit den drei oben genannten Sequenzen zugeordnet wurden, finden sich 8 Sequenzen, die aus der Amplifikation mit den neu entwickelten Primern gewonnen worden waren. Für die restlichen 68 Sequenzen, die mit den neu entwickelten und auf die Sequenz *F_cylindrus_3* angepassten Primern amplifiziert worden waren, erfolgte die Zuordnung zu den Clades 6, 7, 9 und 1. Sie weisen große Ähnlichkeiten mit der Sequenz *F_cylindrus_3* auf. Wie zu erwarten, ist die Ähnlichkeit aller Sequenzen aus *F. curta* zu den Sequenzen *N_glacei* und *T_ishikariensis* gering.

F. curta trägt in ihrem Genom also eine Vielzahl an Sequenzen, die den bisher aus anderen Diatomeen bekannten AFP Sequenzen ähneln [JANECH ET AL., 2006, KRELL ET AL., 2006A]. Diese Isoformen können sowohl aktive Gene mit unterschiedlicher Funktion oder Wirkungsweise sein als auch durch Mutationen funktionslos gewordene Gene. Exemplarisch wurde von drei ausgewählten Sequenzen mit Hilfe der quantifizierenden PCR die Regulation und damit Aktivität unter Salz- und Kältestress untersucht. Welche dieser Isoformen tatsächlich in Verbindung mit Kälte aktiv sind, ist eine interessante Frage, die zu bearbeiten jedoch den Rahmen dieser Arbeit überstiegen hätte.

4.2 Versuchbedingungen

Für alle Kulturen wurde eine Belichtung von $25 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gewählt. Das geschah auf der Grundlage vorhergehender Versuche zur Photosynthese im Alfred-Wegener-Institut Bremerhaven, bei denen bei höheren Lichtintensitäten bereits Photoinhibitionseffekte festgestellt worden waren (nicht veröffentlichte Daten).

Der Kälteschock erfolgte als Abkühlung von $+5^\circ\text{C}$ auf -4°C , um eine möglichst hohe Temperaturdifferenz zu erreichen. Bei $+5^\circ\text{C}$ und einem Salzgehalt von 34 ‰ zeigte *F. curta* in Vorversuchen (Daten nicht aufgeführt) Wachstumsraten von bis zu 0,53 Teilungen pro Tag und Quanten-Ausbeuten von bis zu 0,52. In der Literatur sind für *F. curta* für die Kultivierung bei $+2^\circ\text{C}$ und $50 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Quanten-Ausbeuten von maximal 0,7 beschrieben [MCMINN, 2005]. Die bei $+5^\circ\text{C}$ und $25 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ erreichten Werte von etwa 0,5 wurden als ausreichend für die Verwendung als Kontrollkultur angesehen, da eine Absenkung der Temperatur der Kontrollkulturen eine geringere Temperaturdifferenz für den Kälteschock zur Folge gehabt hätte, und höhere Photonflussraten zu Photoinhibitionseffekten hätten führen können.

Eine Temperatur von -4°C entspricht der durchschnittlichen Minimaltemperatur in der Mitte der Eissäule im antarktischen Winter [BARTSCH, 1989]. Bei dieser Temperatur hat die flüssige Sole in den Solekanälen einen Salzgehalt von etwa 70 ‰. In den Vorversuchen wurde festgestellt, dass *F. curta* nach einer sukzessiven Zugabe des Salzes in Form einer hochkonzentrierten Sole in der Lage ist, sich innerhalb von 2 Wochen wieder zu erholen (Anstieg der Quanten-Ausbeute von 0,1 auf 0,4). Das entspricht vorhergehenden Untersuchungen von BARTSCH (1989) mit *F. cylindrus*, die ergaben, dass eine langsame Erhöhung des Salzgehalts, wie um 5 ‰ pro Tag für die Diatomeen besser zu vertragen ist als eine plötzliche Änderung. Die langsame Änderung entspricht den Prozessen des natürlichen Lebensraums der Diatomee, da eine Erhöhung des Salzgehalts in den Solekanälen des Meereises mit einer langsam sinkenden Temperatur einhergeht.

Bei den vorhergehenden Arbeiten mit *F. cylindrus* wurde die Vermutung angestellt, dass nicht die Kälte, sondern der Salzgehalt den regulierenden Faktor für die Expression der AFPs darstellen könnte [KRELL ET AL., 2006 A]. Die AFP-Sequenzen traten nämlich in der Salz-Stress cDNA-Bank auf, nicht jedoch in einer zuvor erstellten Kälte-Stress cDNA-Bank [MOCK ET AL., 2005]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb zusätzlich eine Kulturbedingung gewählt, bei der, ohne die Temperatur abzusenken, nur eine Erhöhung des Salzgehalts erfolgte. Eine Untersuchung des Einflusses der Temperatur ohne eine Erhöhung des Salzgehalts war nicht möglich, da die Kulturen bei -4°C und 34 ‰ gefrieren.

Die Kontrollkulturen wurden folglich bei $+5^\circ\text{C}$ und 34 ‰ kultiviert. Die zweite Kulturbedingung war $+5^\circ\text{C}$ und 70 ‰, um den Einfluss von Salz auf die Regulation der AFPs erfassen zu können. Die dritten Kulturen wurden unter „natürlichen“ Bedingungen mit einer Temperatur von -4°C und einem Salzgehalt von 70 ‰ kultiviert.

4.3 Physiologische Anpassung

Um die Anpassung von *F. curta* an die Stressbedingungen zu untersuchen, wurden während des Versuchs sowohl die Zellzahl als auch die Quanten-Ausbeute als Parameter für die Vitalität bestimmt. Außerdem gaben diese Daten Auskunft über die Wachstumsphase, in der sich die Kultur befand. Ergänzende Messungen des pH-Werts und der anorganischen Nährstoffe Phosphat, Silikat, Nitrat und Nitrit sollten Auskunft über eine ggf. eintretende Nährstofflimitation geben.

Die Kontrollkulturen (+5°C, 34‰) wuchsen bis zu Tag 6 mit einer Wachstumsrate von 0,35 Teilungen pro Tag. Dass dieser Wert niedriger lag als in den Vorkulturen unter gleichen Bedingungen, könnte an der Kulturgröße liegen. Die 5 L Kulturflaschen beschatteten sich im Kulturschrank gegenseitig, sodass es nicht möglich war, eine einheitliche Belichtung für alle Kulturen einzustellen. Weiterhin könnten die Scherkräfte durch Rühren und Begasen zu einer Verminderung der Wachstumsrate beigetragen haben. Diese Faktoren hatten allerdings keinen Einfluss auf die Photosyntheseleistung der Zellen, die bei dem in den Vorversuchen bestätigten Wert von 0,5 lag. Da die Photosynthese nicht beeinträchtigt war, ist zu vermuten, dass das verringerte Zellwachstum nicht auf die Belichtung, welche die Photosynthese beeinflusst, sondern auf ein Zerschlagen der Zellen durch die Begasung und das Rühren zurück zu führen ist. Ab Tag 4 war in den Kontrollkulturen ein Abfall der Quanten-Ausbeute zu verzeichnen. Kurz danach (Tag 6) stagnierte auch das Zellwachstum. Sowohl Zellzahl als auch die Quanten-Ausbeute sanken von diesem Zeitpunkt an bis zum Ende des Versuchs stetig ab. Die für Tag 8 bestimmten Phosphat- und Nitratgehalte hatten im Vergleich zum Versuchsbeginn schon stark abgenommen, die Silikatkonzentration lag bereits unter der Bestimmungsgrenze von 20 µmol/L. Da Silikat für den Einbau in die Silikatschalen der Diatomeen unverzichtbar ist, ist ohne Silikat kein Wachstum mehr möglich. Die Zellen waren also silikatlimitiert.

Direkt nach der Erhöhung des Salzgehalts der Kulturen 2 (+5°C) und 3 (-4°C) auf 70‰ fielen sowohl die Zellzahlen als auch die Quanten-Ausbeuten ab. Der Grund dafür war eine starke Schädigung der Zellen durch das Salz bis hin zum Absterben, wie schon für *F. cylindrus* beschrieben wurde [KRELL ET AL., 2006 B]. Unter beiden Kulturbedingungen stieg die Quanten-Ausbeute zunächst parallel wieder an. Nach 7 Tagen setzten sich die Kulturen 3 (-4°C, 70‰) von den Kulturen 2 (+5°C, 70‰) ab, da sich die Quanten-Ausbeuten der Kulturen 3 weiter verbesserte. Ab diesem Zeitpunkt war auch wieder ein Zellwachstum unter Kulturbedingung 3 (-4°C, 70‰) zu verzeichnen.

Der in dieser Arbeit beobachtete Zeitraum der Adaptation an veränderte Salzgehalte war etwa doppelt so lang wie der von GRANT UND HORNER (1976) und VARGO ET AL. (1986) beschriebenen Anpassung für verschiedene Diatomeen-Arten. Die Wachstumsrate von 0,05 Teilungen pro Tag entspricht etwa dem unter den gleichen Bedingungen (-4°C, 70‰) für *F. cylindrus* erhaltenen Wert von 0,06 Teilungen pro Tag [KRELL ET AL., 2006 B]. Nach 18 Tagen sanken auch in den Kulturen 3 die Quanten-Ausbeuten wieder.

Ab Tag 22 stoppte das Wachstum dieser Kulturen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Kulturen 3 (-4°C , 70 ‰) Nitrat- und Phosphatkonzentrationen erreicht, die denen entsprachen, bei denen auch das Wachstum der Kontrollkulturen stagnierte. In den Kulturen 2 ($+5^{\circ}\text{C}$, 70 ‰) war von Tag 7 an bis zum Versuchsende ein Abfall der Quanten-Ausbeute zu verzeichnen, während die Zellzahl konstant blieb. Die Zellen waren stark geschädigt, könnten aber, wie bei BARTSCH (1989) für *F. cylindrus* beschrieben, in der Lage sein eine Phase mit hohem Salzgehalt zu überdauern, um bei niedrigeren Salzgehalten das Wachstum wieder aufzunehmen. Die Nährstoffkonzentrationen nahmen vom Versuchstart bis zum Versuchsende kaum ab, woraus man auf einen geringen Stoffwechsel schließen kann. Für Nitrit wurden über den gesamten Versuchsverlauf in keiner der Kulturen Konzentrationen über der Bestimmungsgrenze von $20\ \mu\text{mol/L}$ detektiert.

Eine Beeinflussung des Wachstums durch einen Mangel an CO_2 kann ausgeschlossen werden, da sich der pH-Wert im Laufe des Versuchs nicht veränderte. Er blieb für die Kontrollkultur ($+5^{\circ}\text{C}$, 34 ‰) konstant bei 7,5 bzw. 8,0. Für die anderen beiden Kulturen betrug er konstant 8,5. Beides liegt nahe an dem für Meerwasser üblichen Wert von 8,2 [GLEITZ ET AL., 1995]. Das Absinken des pH-Werts nach der Zugabe des Salzes ist vermutlich auf das im „Instant Ocean“ enthaltene Bicarbonat zurückzuführen (Zusammensetzung des Salzes siehe Anhang).

Das Schwanken der Zellzahlen in den Kulturen mit erhöhtem Salzgehalt (Abbildung 11) folgte vermutlich aus der unter dem Mikroskop beobachteten Aggregation der Zellen. Durch die Aggregate ergeben sich bei der Bestimmung der Zellzahl mit dem MultisizerTM 3 COULTER COUNTER® größere Fehler. Diese könnten dadurch verstärkt worden sein, dass die Proben an einem Tag beim Transport etwas mehr geschüttelt worden waren als an einem anderen und dadurch unterschiedlich viele große Aggregate zu kleineren zerfielen. Die Bildung der Aggregate war vermutlich auf eine verstärkte Bildung von Extrazellulären Polymerischen Substanzen (EPS) zurückzuführen. Diese werden von verschiedenen Diatomeen-Arten z.B. bei Salzstress oder Nährstofflimitation [CORZO ET AL., 2000, ABDULLAHI ET AL., 2006] ausgeschieden. Trotz des durch den Stress gehemmten Wachstums werden weiterhin Assimilate gebildet, die in Form von EPS ausgeschieden werden, da die Zelle sie anderweitig nicht verwerten kann [STAATS ET AL., 2000].

Die Vitalität und das Wachstum von *F. curta* wird also durch die Erhöhung des Salzgehalts auf das doppelte des Salzgehalts des Oberflächenwassers des Weddell-Meeres stark beeinträchtigt. Bei der Erholung scheint die Temperatur eine bedeutende Rolle zu spielen. Bei der „unnatürlichen“ Bedingung von 70 ‰ bei $+5^{\circ}\text{C}$ nahmen die Kulturen das Wachstum innerhalb von 30 Tagen nicht wieder auf. Das Wachstum der Kulturen bei -4°C setzte hingegen nach einer einwöchigen Adaptations- und Regenerationsphase wieder ein. Diese Bedingungen entsprechen der Situation im Meereis, bei der eine Erhöhung der Salzgehalts der Sole in einem Solekanal auf 70 ‰ durch eine absinkende Temperatur auf etwa -4°C bedingt ist.

4.4 Expressionsanalyse

Die Extraktion der RNA wurde optimiert, da sich die in vorherigen Versuchen für *F. cylindrus* verwendete Methode (eigene unveröffentlichte Daten) mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Deutschland) als ungeeignet herausstellte. Bei der Isolation aus *F. curta* waren die Ausbeuten gering und die RNA zeigte Degradation. Zurückgeführt wurde das auf den polaren Lysispuffer, der nicht schnell genug in die Zellen gelangte, um dort die RNAsen zu inaktivieren. Daher wurde die RNA-Extraktion mit TRIreagent (Sigma, Deutschland) durchgeführt. TRIreagent enthält Phenol, ist unpolar und kann deswegen leicht in die Zelle eindringen. Es wurde eine Aufreinigung inklusive DNase-Verdau angeschlossen.

Durch Unterschiede in den Qualitäten und Konzentrationen der RNA können die Effizienzen der Erststrangsynthese und der Real-Time-PCR unterschiedlich sein [BRUNNER ET AL., 2004] und zu Fehlern führen, wenn sie nicht durch Normierung auf einen internen Standard ausgeglichen werden. Als interner Standard wurde MA, eine künstliche RNA aus dem Kohlweißling, verwendet. Üblich ist bei der relativen Auswertung eine Normierung auf ein Haushaltsgen [BUSTIN, 2000] anstelle der Normierung auf eine künstlich zugegebene RNA. Da die RNA des Haushaltsgens genau so behandelt wird wie die des untersuchten Gens, werden dadurch weitere Unterschiede in Reinheit und Qualität zwischen den Proben erfasst, die während der Extraktion zustande kommen können [PFAFFL, 2004]. In dieser Arbeit wurden ein ribosomales Protein und Aktin als Haushaltsgene ausgewählt. Da für diese beiden Gene jedoch auch eine Regulation festgestellt wurde, erfolgte die relative Auswertung über MA.

Für die Real-Time-PCR wurde neben der relativen Auswertung noch eine absolute Auswertung durchgeführt. Diese Art der Auswertung verdeutlicht den Verlauf der Regulation und die Expressionshöhe.

Ein weiteres Problem stellte die Spezifität der Primer für die Zielsequenz dar. Schon die Auswahl geeigneter Bereiche für das Primerdesign war sehr schwierig, da in den kurzen Bereichen von ca. 20 Nukleotiden nur sehr wenige Abweichungen auftraten und diese selten eine Unterscheidung einer Gruppe zu allen anderen Gruppen ermöglichten. Beim Test der Primer auf Spezifität musste außerdem 1 von je 3 für die halbquantitative und Real-Time-PCR ausgewählten Primerpaaren wegen mangelnder Spezifität aussortiert werden. In der Real-Time-PCR trat bei der Expressionsanalyse des AFP₁₀ eine unspezifische Amplifikation auf. Diese wurde bei der Schmelzpunktanalyse sichtbar, da sich für verschiedene Proben, die mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert worden waren, unterschiedliche Schmelztemperaturen ergaben (Daten im Anhang auf der CD).

4.4.1 Regulation der Haushaltsgene

Sowohl für das ribosomale Protein als auch für Aktin wurde eine Regulation im Laufe des Versuchs festgestellt. Die bei der absoluten Auswertung auftretenden teilweise sehr hohen Standardabweichungen, sind in erster Linie auf Unterschiede in der Effizienz der Erststrangsynthese oder Pipettierfehler zurückzuführen. Schließen kann man das daraus, dass sie in der relativen Auswertung durch die Normierung auf MA, welche dazu dient genau diese Fehler auszugleichen, geringer ausfallen.

Die Regulation der beiden Haushaltsgene korreliert sehr gut mit den Ergebnissen der Zellzahlbestimmung und der Quanten-Ausbeute (Abbildungen 11, 12, 17 und 18). Vor der Absenkung der Temperatur und der Erhöhung des Salzgehalts war die Expression des ribosomalen Proteins und Aktins in allen Kulturen etwa gleich. In den Kontrollkulturen (+5°C, 34 ‰) war mit steigender Quanten-Ausbeute und Zellzahl für Tag 1 und 2 eine etwa doppelte Expression des ribosomalen Proteins und Aktins zu verzeichnen. Mit dem Abfall der Quanten-Ausbeute und der Zellzahl wurde die Kopienzahl dieser beiden bis auf ca. die Hälfte des Ausgangswerts herunterreguliert.

Für die Kulturen bei +5°C und 70 ‰ zeigte sich gleichzeitig mit dem Salz-Schock und dem Abfall der Quanten-Ausbeute und der Zellzahl ein starker Abfall der Expression des ribosomalen Proteins und Aktins auf ca. 1/12 bzw. 1/8 des Ausgangswerts. Danach kam es zu einer leichten Erholung, bis die Expression des ribosomalen Proteins schließlich auf unter 1/32 am Versuchsende und für Aktin auf ca. 1/16 am Tag 14 abfiel. Den gleichen Verlauf zeigte auch die Quanten-Ausbeute. Ein Zellwachstum konnte bei den Kulturen 2 nicht festgestellt werden. Der Expressionslevel lag mit $1 \cdot 10^4$ Kopien pro ng RNA für das ribosomale Protein weit unter dem der Kontrollkultur mit $8 \cdot 10^4$ Kopien pro ng RNA in den ersten Versuchstagen. Für Aktin finden sich weniger als $1 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA in den Kulturen 2 im Vergleich zu $6 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA in den Kontrollkulturen bei gutem physiologischen Zustand.

Der Verlauf der Regulation der Haushaltsgene der Kulturen mit erhöhtem Salzgehalt und verringerter Temperatur (-4°C, 70 ‰) ähnelt dem zuvor beschriebenen, ist jedoch weniger ausgeprägt. Zu Versuchsbeginn wurde die Expression nur bis auf einen Faktor von 1/3 bzw. 1/2 des Anfangswertes gesenkt. Das entsprach dem Abfall der Quanten-Ausbeute und der Zellzahl, der allerdings genau so stark war wie bei den Kulturen 2. Sowohl das ribosomale Protein als auch Aktin erholten sich bis Tag 7 so weit, dass sie in der Expressionsstärke fast wieder den Ausgangswert erreichten. Obwohl das Ansteigen der Quanten-Ausbeute und der Zellzahl bis Tag 20 anhielt, war ab Tag 14 bei der Expression der Haushaltsgene schon wieder ein Abfall bis auf die Hälfte des Ausgangswerts zum Versuchsende zu verzeichnen. Die maximale Expression lag für das ribosomale Protein bei $2 \cdot 10^4$ Kopien pro ng RNA, was etwa 1/4 der Expressionsstärke der Kontrollkultur entspricht. Für Aktin betrug sie mit $3 \cdot 10^6$ Kopien pro ng RNA etwa die Hälfte des Maximalwertes der Kontrollkultur.

Die halbquantitative PCR zeigte ebenso keine konstante Expression des ribosomalen Proteins. Der Verlauf der Regulation stellte sich allerdings anders dar als in der Real-Time-PCR. Alle Kulturen zeigten am Tag 0 und Tag 22 eine geringere Expression als an den dazwischen liegenden Tagen. Die Expression zum Zeitpunkt 0 war auch nicht bei allen Kulturen gleich stark. Diese Ergebnisse sind mit Vorsicht zu betrachten, da die halbquantitative PCR schwierig zu optimieren ist (Kapitel 2.3.3).

Die Regulation der Haushaltsgene ist folglich stark vom physiologischen Zustand der Zellen abhängig. Mit sinkender Quanten-Ausbeute sinken auch die Expressionsraten von Aktin und des ribosomalen Proteins.

Eine Regulation von Haushaltsgenen wurde für Prokaryoten sowie bei medizinischen Forschungen an menschlichem oder Versuchstiergewebe vielfach dokumentiert. Für die Pappel (*Populus*) wurde eine Regulation üblicher Haushaltsgene wie z.B. Aktin, Tubulin oder Cyclophilin unter unterschiedlichen Kulturbedingungen (Jahreszeiten) von BRUNNER ET AL. (2003) beschrieben. Wird eine Regulation von Haushaltsgenen festgestellt, werden sie als Referenz für die Expressionsanalyse nutzlos. Die Ergebnisse wurden in dieser Arbeit deswegen auf die künstliche RNA MA normiert.

4.4.2 Regulation ausgewählter AFPs

Die für die Expressionsanalyse ausgewählten Sequenzen der Anti-Freeze-Proteine zeigten unterschiedliche Veränderungen unter den verschiedenen Kulturbedingungen.

Bei AFP_2 trat die stärkste Regulation unter erhöhtem Salzgehalt in Verbindung mit der abgesenkten Temperatur (-4°C , 70 %) auf. Am Tag 1 konnte schon die 16-fache Expression im Vergleich zu T0 verzeichnet werden, die bis auf einen Faktor von 44 anstieg. Darauf folgte ein leichter Abfall, sodass sich bis zum Versuchsende die 30-fache Expression im Vergleich zum Ausgangswert einstellte. Die Kulturen mit erhöhtem Salzgehalt und Kontrolltemperatur ($+5^{\circ}\text{C}$, 70 %) zeigten hingegen kaum eine Regulation von AFP_2. Nach der Salzzugabe war ein Anstieg der Kopienzahl auf das Doppelte des Ausgangswerts bis Tag 7 zu verzeichnen. Danach sank die Expression bis zum letzten Versuchstag auf die Hälfte ab. Die Ergebnisse der halbquantitativen PCR bestätigten die Ergebnisse der Real-Time-PCR für die kälte- und salzgestressten Kulturen. Für die salzgestressten Kulturen zeigte die halbquantitative PCR eine Erhöhung der Expression von Tag 1 bis Tag 14, welche in der Real-Time PCR nicht festgestellt wurde.

Die Regulation von AFP_2 wurde also stark durch Kälte und die Erhöhung des Salzgehalts beeinflusst, wohingegen die alleinige Erhöhung des Salzgehalts keinen eindeutigen Regulationseffekt zeigte. Das widerspricht der von KRELL ET AL. (2006 A) angestellten Vermutung, dass die Regulation von AFPs hauptsächlich über den Salzgehalt geschieht. In einer cDNA-Bank aus mit Salz gestressten *F. cylindrus* Kulturen wurden Sequenzen für AFPs gefunden, die in einer zuvor erstellten Kälte-Stress cDNA-Bank [MOCK ET AL., 2005] nicht aufgetreten waren. Begründet könnte das darin sein, dass

die Kälte-Stress Bank bei $-1,8^{\circ}\text{C}$ angefertigt wurde. Diese Temperatur liegt im gleichen Bereich wie die Temperatur des Oberflächenwassers des Weddell-Meer (0 bis -2°C) [OLBERS ET AL., 1992] und stellt damit für die Eisdiatomeen keinen starken Stress dar. Im Vergleich zu den Haushaltsgenen und AFP_10 zeigte sich jedoch, dass die Expression von AFP_2 in den Kulturen 2 ($+5^{\circ}\text{C}$, 70‰) wesentlich weniger beeinflusst wurde, als die Expression der anderen Gene. Alle anderen Gene zeigten eine Herabregulation um einen Faktor 1/8 bis zu 1/64, wohingegen bei AFP_2 ein leichter Anstieg auf einen Faktor von 2 zu verzeichnen war. Obwohl also durch den Salzschock der Stoffwechsel stark beeinträchtigt wurde, wurde AFP_2 weiterhin etwa auf dem Ausgangsniveau exprimiert. AFP_2 scheint bei eingeschränkter Stoffwechselleistung ein bevorzugt exprimiertes Gen unter den gegebenen Bedingungen zu sein.

Außerdem ließ sich für AFP_2 eine Abhängigkeit der Expression von anderen Stressfaktoren nachweisen. Die Kontrollkultur zeigte zum Ende des Versuchs sowohl in der halbquantitativen als auch in der Real-Time-PCR eindeutig eine Hochregulation des Gens um einen Faktor bis zu etwa 16. Zu diesem Zeitpunkt waren der Zustand der Kulturen und die Versorgung mit Nährstoffen schlecht.

Für AFP_10 ließ sich keine kälteabhängige Regulation feststellen. Die kälte- und salzgestressten Kulturen (-4°C , 70‰) zeigten über den gesamten Versuchsverlauf keine Veränderung der Regulation um mehr als die Hälfte. Die Expression in den Kulturen bei $+5^{\circ}\text{C}$ und 70‰ war hingegen mit Faktoren bis zu 1/64 sehr stark beeinträchtigt, es wurde ähnlich reguliert wie das ribosomale Protein und Aktin. Die Kontrollkulturen zeigten in den ersten zwei Tagen eine auf 1/4 des Ausgangswerts verminderte Expression, die bis zu Tag 20 aber auf das 16-fache des Ausgangswerts anstieg. Hieraus kann gefolgert werden, dass die Regulation von AFP_10 über andere Stressfaktoren als über Kälte oder Salz geschieht. Die verminderte Expression in den ersten beiden Tagen könnte auf den guten physiologischen Zustand der Kulturen zurückzuführen sein. In der Wachstumsphase werden möglicherweise vermehrt Gene exprimiert, die für essentielle Zellkomponenten wie z.B. Ribosomen oder Zellstrukturkomponenten kodieren.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse für AFP_2 bestätigen, dass Meereisorganismen Mechanismen zur schnellen Anpassung an veränderte physikalische und chemische Bedingungen besitzen [MOCK UND THOMAS, 2005]. Salzgehalt und Temperatur der Sole in den Kanälen des Meereises sind dabei Faktoren, die von der Zelle bei der Veränderung der Außentemperatur und damit der Bildung des Eises oder auch des Schmelzens des Eises detektiert werden können. Sie verändern sich zunächst schneller als z.B. die Nährstoffsituation oder der pH-Wert, die erst durch die Stoffwechselaktivität im Laufe der Zeit verändert werden. Der Salzgehalt ist außerdem ein interessanter Regulationsfaktor, da das Gefrieren des Wassers und der damit einhergehende erhöhte Salzgehalt Wasser binden und so einen Wassermangel hervorrufen.

4.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass die polare Diatomee *F. curta* eine Vielzahl an Genen für AFPs besitzt und diese außerdem regulierbar sind. Die Fähigkeit zur Regulation stellt eine Anpassung an die sich schnell verändernden physikalischen und chemischen Parameter während der Bildung und der Schmelze des Meereises dar.

Um die Untersuchungen zur Regulation und Funktion der AFPs vertiefen zu können, sollte die Expression der einzelnen Clades differenzierter untersucht und so die aktiven Gene der AFPs herausgefiltert werden. Hierzu bedarf es einer weiteren Optimierung der Real-Time-PCR. Außerdem sollten weitere Untersuchungen zu den Regulationsmechanismen durchgeführt werden, aus denen hervorgeht, ob Kälte, wie in diesem Experiment, oder ob Salz, wie es sich bei KRELL ET AL. (2006 A) andeutete, der hauptsächlich regulierende Faktor für die Gene der AFPs ist. Dafür könnten weitere Experimente mit niedrigeren Salzkonzentrationen durchgeführt werden, um die starke Gesamtschädigung der Zellen, die in diesem Experiment auftraten, zu vermeiden. In diesem Zusammenhang wäre auch eine Untersuchung interessant, warum die auf -4°C abgekühlten Kulturen die Erhöhung des Salzgehalts wesentlich besser verkrafteten als die bei $+5^{\circ}\text{C}$ gehaltenen.

Zur Wirkungsweise der AFPs auf die Eisbildung und ggf. schützende Mechanismen für Zellkomponenten werden bereits Untersuchungen durchgeführt. Im Gegensatz zu AFPs aus Pflanzen oder Tieren könnten AFPs aus Meereis-Diatomeen bei den Versuchen der Anwendung zur Trockenresistenz geeigneter sein. Da bei den Meereis-Diatomeen eine verringerte Temperatur auch mit einem stark erhöhten Salzgehalt einhergeht, erhöht sich der Trockenstress auf die Zellen. Zukünftige Untersuchungen sollten diesen Aspekt ebenfalls einschließen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Diversität und Expression von Anti-Freeze-Proteinen aus Meereis-Diatomeen am Beispiel des Modellorganismus *Fragilariopsis curta* untersucht.

Mit Hilfe universeller AFP-Primer, die auf der Grundlage bekannter AFP-Sequenzen aus den Diatomeen *Fragilariopsis cylindrus*, *Fragilariopsis pseudonana* und *Navicula glaciei* entworfen worden waren, konnten insgesamt 40 Isoformen von AFP-Sequenzen aus genomischer DNA von *F. curta* amplifiziert werden. Diese Sequenzen wurden zu 11 Clades zusammengefasst. Die AFP-Sequenzen aus *F. curta* wiesen größere Ähnlichkeiten zu den Sequenzen aus den *Fragilariopsis* Arten auf als zu denen aus *N. glaciei*.

Bei der Kultivierung von *F. curta* unter erhöhtem Salzgehalt (70‰) und optimalen Temperaturverhältnissen (+5°C) sowie erhöhtem Salzgehalt und gleichzeitig verringerter Temperatur (-4°C) stellte sich eine größere Toleranz der Diatomee gegenüber dem erhöhten Salzgehalt bei gleichzeitiger Abkühlung heraus als gegenüber einer Erhöhung des Salzgehalts bei einer Temperatur von +5°C.

In dem dritten Teil der Arbeit wurde beispielhaft die Expression zweier Gruppen von AFPs unter Kälte und erhöhtem Salzgehalt mit Hilfe der Real-Time-PCR untersucht. Die Regulation dieser beiden Gene für Anti-Freeze-Proteine war unterschiedlich. Für eines der beiden konnte eine starke Erhöhung der Expression bei Temperaturen von -4°C und einem Salzgehalt von 70‰ festgestellt werden. Unter erhöhtem Salzgehalt bei +5°C zeigte *F. curta* diese starke Reaktion nicht, allerdings wurde die Expression dieses Gens weniger inhibiert als die Expression der parallel untersuchten Haushaltsgene. Für das zweite untersuchte AFP zeigten sich kaum Änderungen in der Expression unter dem Einfluss von Kälte und erhöhtem Salzgehalt. Beide AFP-Gene wurden während der Absterbephase auch in der Kontrollkultur (+5°C, 34‰) vermehrt exprimiert.

Abbildungsverzeichnis

1	PCR Schema	4
2	Phylogenetischer Baum der Ausgangs-AFP-Sequenzen	5
3	Schema der Klonierung	9
4	Vektorkarte des Kloniervektors pCR [®] 2.1-TOPO [®]	10
5	Prinzip der TA Ligation	11
6	Sequenzinformation des Kloniervektors pCR [®] 2.1-TOPO [®]	14
7	Verwandschaftsgrad der AFP-Sequenzen aus <i>F. curta</i>	36
8	Wachstumsraten der Kulturen der Vorversuche	40
9	Quanten-Ausbeute der Kulturen e und f der Vorversuche	41
10	Temperaturverlauf in den Kulturen	42
11	Zellzahlen der Kulturen	44
12	Ergebnisse der Messung der Quanten-Ausbeute	44
13	Konzentrationen anorganischer Nährsalze	47
14	Protokoll des Agilent Bioanalyzer	50
15	Optimierung der halbquantitativen PCR	52
16	Ergebnisse der halbquantitativen PCR	54
17	Expression von rib40	57
18	Expression von Aktin	58
19	Expression von AFP_2	59
20	Expression von AFP_10	60
21	Wachstumsraten der Kulturen 1 und 3	85
22	Wachstumsraten der einzelnen Kulturen unter Kulturbedingung 1	85

Tabellenverzeichnis

1	Reaktionsansatz für die PCR aus genomischer DNA	6
2	PCR Programm für genom. DNA außer Primerpaar 1	7
3	PCR Programm für genom. DNA für Primerpaar 1	7
4	Temperaturprogramm für die M13 PCR	14
5	Reaktionsansatz für die Sequenzier-PCR	15
6	Temperaturprogramm für die Sequenzier-PCR	16
7	Kulturbedingungen für die Vorversuche	19
8	Kulturbedingungen für den Hauptversuch	20
9	Probenahmen für die Vorversuche	21
10	Probenahmen für den Hauptversuch	22
11	Reaktionsansatz der cDNA-Synthese	28
12	Zusammensetzung der halbquantitativen PCR	30
13	Temperaturprogramm für die Optimierung der halbquantitativen PCR . .	30
14	Temperaturprogramm für die halbquantitative PCR	30
15	Reaktionsansatz für die Real-Time-PCR	31
16	Temperaturprogramm der Real-Time-PCR	31
17	Primer zur Amplifikation aus genomischer DNA	34
18	Primerkombinationen zur Amplifikation aus genomischer DNA aus <i>F. curta</i>	35
19	Primer für die halbquantitative PCR	37
20	Länge der Amplikons der halbquantitativen PCR	37
21	Primer für die Real-Time-PCR	38
22	Zusammenfassung der Daten zu Wachstum und Quanten-Ausbeute	45
23	Für die Extraktion verwendete Probenzeitpunkte	48

Literatur

- [ABDULLAHI ET AL., 2006] Abdullahi AS, Underwood GJC, Gretz MR (2006) Extracellular matrix assembly in diatoms (*Bacillariophyceae*) v. environmental effects on polysaccharide synthesis in the model diatom, *Phaeodactylum tricornutum*, *Journal of Phycology* **42**: 363–378
- [ATKINSON UND BINGMAN, 1997] Atkinson MJ, Bingman C (1997) Elemental composition of commercial sea salts, *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences* **VIII**: 39–43
- [BARRET, 2001] Barret J (2001) Thermal hysteresis proteins, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **33**: 105–117
- [BARTSCH, 1989] Bartsch A (1989) Die Eisalgenflora des Weddellmeeres (Antarktis): Artenzusammensetzung und Biomasse sowie Ökophysiologie ausgewählter Arten, *Berichte zur Polar- und Meeresforschung* **63**: 31–35, 67–69, 86, 88
- [BOHLHAR-NORDENKAMPF ET AL., 1989] Bolhar-Nordenkampf HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Schreiber U, Lechner EG (1989) Chlorophyll Fluorescence as a Probe of the Photosynthetic Competence of Leaves in the Field: A Review of Current Instrumentation, *Functional Ecology* **3**: 497–514
- [BRUNNER ET AL., 2004] Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH (2004) Validating internal controls for quantitative plan gene expression studies, *BMC Plant Biology* **4**: 14–20
- [BUSTIN, 2000] Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of Molecular Endocrinology* **25**: 169–193
- [BUTLER UND KITAJIMA, 1975] Butler WL, Kitajima M (1975) Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts, *Biochimica et Biophysica Acta* **376**: 116–125
- [CORZO ET AL., 2000] Corzo A, Morillo JA, Rodríguez S (2000) Production of transparent exopolymer particles (TEP) in cultures of *Chaetoceros calcitrans* under nitrogen limitation, *Aquatic Microbial Ecology* **23**: 63–72
- [DEVRIES UND WOHLSCHLAG, 1969] DeVries AL, Wohlschlag DE (1969) Freezing resistance in some Antarctic fishes, *Science* **163**: 1073–1075
- [DU ET AL., 2003] Du N, Xiang Y, Hew CL (2003) Ice nucleation inhibition - mechanism of antifreeze by antifreeze proteins, *The Journal Of Biological Chemistry* **278**: 36000–36004

- [DUMAN UND OLSEN, 1993] Duman JG, Olsen M (1993) Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi and phylogenetically diverse plants, *Cryobiology* **30**: 322–328
- [EICKEN, 1992] Eicken H (1992) The role of sea ice in structuring Antarctic ecosystems, *Polar Biology* **12**: 3–13
- [FREEMAN ET AL., 1999] Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (1999) Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential, *BioTechniques* **26**: 112–125
- [GARRISON ET AL., 1983] Garrison DL, Close AR, Gordon LI (1983) A physical mechanism for establishing algal populations in frazil ice, *Nature* **306**: 363–365
- [GLEITZ ET AL., 1995] Gleitz M, Rutgers v.d. Loeff M, Thomas DN, Dieckmann GS, Millero FJ (1995) Comparison of summer and winter inorganic carbon, oxygen and nutrient concentrations in Antarctic sea ice brine, *Marine Chemistry* **51**: 81–91
- [GOUNOT UND RUSSEL, 1999] Gounot AM, Russel NJ (1999) Physiology of cold-adapted microorganisms, In: *Cold-Adapted Organisms* (Hrsg.: Margesin R, Schinner FF) S. 33–55 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- [GRASSHOFF ET AL., 1983] Grasshoff K, Ehrhard M, Kremling K, (1983) *Methods of seawater analysis* 2. Ausgabe, Verlag Chemie, Weinheim
- [GRANT UND HORNER, 1976] Grant WS, Horner RA (1976) Growth responses to salinity variation in four Arctic ice diatoms, *Journal of Phycology* **12**: 180–185
- [HIGGINS UND SHARP, 1989] Higgins DG, Sharp PM (1989) Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer, *CABIOS* **5**: 151–153
- [HOSHINO ET AL., 1999] Hoshino T, Odaira M, Yoshida M, Tsuda S (1999) Physiological and biochemical significance of antifreeze substances in plants, *Journal of Plant Research* **112**: 255–261
- [JANECH ET AL., 2006] Janech M, Krell A, Mock T, Kang JS, Raymond JA (2006) Ice-binding proteins from sea ice diatoms (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology* **24**: 410–416
- [KATHO ET AL., 2005] Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment, *Nucleic Acids Research* **33**: 511–518
- [KAUTSKY UND HIRSCH, 1931] Kautsky H, Hirsch A (1931) Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation, *Naturwissenschaften* **19**: 964
- [KIRST UND WIENCKE, 1995] Kirst GO, Wiencke C (1995) Ecophysiology of polar algae, *Journal of Phycology* **31**: 181–199

- [KNIGHT ET AL., 1991] Knight CA, Cheng CC, DeVries AL (1991) Adsorption of α -helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes *Biophysical Journal* **59**: 409–418
- [VAN KOOTEN UND SNEL, 1990] van Kooten O, Snel JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress Physiology, *Photosynthesis Research* **25**: 147–150
- [KRAUSE UND WEIS, 1991] Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis - The Basics, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 313–319
- [KRELL ET AL., 2006 A] Krell A, Mock T, Glöckner G, Beszteri B, Valentin K (2006A) Generation and analysis of a salt stress induced cDNA library of the psychrophilic diatom, *Fragilariopsis cylindrus*, and the finding of a new class of ice-binding proteins (zur Veröffentlichung eingereicht)
- [KRELL ET AL., 2006 B] Krell A, Funck D, Plettner I, John U, Dieckmann G (2006 B) Regulation of proline metabolism under salt stress in the sea ice diatom *Fragilariopsis cylindrus*, *Plant, Cell and Environment* (zur Veröffentlichung eingereicht)
- [KREMBS ET AL., 2002] Krembs C, Eicken H, Junge K, Deming JW (2002) High concentrations of exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: implications for the polar ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms, *Deep sea research Part I-Oceanographic Research Papers* **49**: 2163–2181
- [LIZOTTE, 2001] Lizotte MP (2001) The Contributions of Sea Ice Algae to Antarctic marine primary production, *American Zoologist* **41**: 57–73
- [MANN UND MARCHANT, 1989] Mann DG, Marchant HJ (1989) The origin of the diatom and its life cycle. In: The chromophyte algae: problems and perspectives (Ed. by Green JC, Leadbeater BSC, Diver WL) S. 307–323, *Clarendon Press*, Oxford, UK
- [MCMINN, 2005] McMinn A, Pankowski A, Delfatti T (2005) Effect of hyperoxia on the growth and photosynthesis of polar sea ice microalgae, *Journal of Phycology* **41**: 732–741
- [MOCK ET AL., 2005] Mock T, Krell A, Glöckner G, Kolukisaoglu Ü, Valentin K (2005) Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus*, *Journal of Phycology* **42**: 78–85.
- [MOCK UND THOMAS, 2005] Mock T, Thomas DN (2005) Recent advances in sea-ice microbiology, *Environmental Microbiology* **7**: 605–619

- [MÜLLER, 2001] Müller H-J (2001) PCR – Polymerase-Kettenreaktion S. 1–8, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- [MÜHLHARD, 2003] Mühlhard C (2003) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics 4. Auflage S. 73–105 Elsevier GmbH, München
- [OLBERS ET AL., 1992] Olbers D, Gourtetski V, SeiB G, Schröter J (1992) Hydrographic Atlas of the Southern Ocean, Online-Version: <http://awibremmerhaven.de/Atlas/SO/Deckblatt.htm>, 18.11.2006
- [PARKINSON UND GLOERSEN, 1993] Parkinson CL, Gloersen P (1993) Global sea ice coverage, In: *Atlas of Satellite Observations Related to Global Change* (Hrsg.: Gurney RJ, Foster JL, Parkinson CL) S. 371-383 Cambridge University Press, Cambridge
- [PFAFFL, 2004] Pfaffl MW (2004) Real-time PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung, *BIOspektrum* **1/04** 10. Jahrgang
- [RAYMOND ET AL., 1994] Raymond JA, Sullivan CW, DeVries AL (1994) Release of an ice-active substance by Antarctic sea ice diatoms, *Polar Biology* **14**: 71–75
- [RAYMOND UND KNIGHT, 2003] Raymond, JA, Knight CA (2003) Ice binding, recrystallisation inhibition, and cryoprotective properties of ice-active substances associated with Antarctic sea ice diatoms, *Cryobiology* **46**: 174–181
- [SANGER ET AL., 1977] Sanger F, Nickeln S, Coulson AR (1977) DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **74**: 5463-5467
- [SCHOLANDER UND MAGGERT, 1971] Scholander PF, Maggert JE (1971) Supercooling and ice propagation in blood from Arctic fishes, *Cryobiology* **8**: 371–374
- [SCHREIBER ET AL., 1986] Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer, *Photosynthesis Research* **10**: 51–62
- [SCOTT UND MARCHANT, 2005] Scott FJ, Marchant J (Hrsg.) (2005) Antarctic Marine Protists, S. 71-72, Australian Biological Resources Study, Cambridge
- [SCOTT ET AL., 1994] Scott P, McMinn A, Hosie G (1994) Physical parameters influencing diatom community structure in eastern Antarctic sea ice, *Polar Biology* **14**: 507–517
- [STAATS ET AL., 2000] Staats N, Stal LJ, Winder B, Mur LR (2000) Oxigenic photosynthesis as driving process in exopolysaccharide production of benthic diatoms, *Marine Ecology Progress Series* **193**: 261–269

- [STOECKER ET AL. 1998] Stoecker DK, Gustafson DE, Black MMD, Bair CT (1998) Population dynamics of microalgae in the upper land-fast sea ice at a snow-free location, *Journal of Phycology* **34**: 60–69
- [THEEDE ET AL., 1976] Theede H, Schneppenheim R, Bèress L (1976) Frostschutz-Glykoproteine bei *Mytilus edulis*?, *Marine Biology* **36**: 183–189
- [THOMAS UND DIECKMANN, 2002] Thomas D, Dieckmann GS (2002) Antarctic Sea Ice – a Habitat for Extremophiles, *Science* **295**: 641–644
- [VARGO ET AL., 1986] Vargo GA, Fanning K, Heil C, Bell L (1986) Growth rates and the salinity response of an Antarctic ice microflora community, *Polar Biology* **5**: 241–247
- [VON WILLERT ET AL., 1995] von Willert DJ, Matyssek R, Herppich W (1995) Experimentelle Pflanzenökologie: Grundlagen und Anwendungen S. 207–233 Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [NANODROP USER´S MANUAL, 2005] NanoDrop, ND-100 Spectrophotometer, V3.2 User´s Manual, NanoDrop Technologies, Inc., 2005
- [REAGENT KIT GUIDE RNA 600 NANO ASSAY, 2003] Reagent Kit Guide RNA 600 Nano Assay, Agilent Technologies, Inc., Edition 11/2003
- [TOPO TA CLONING[®] MANUAL, 2004] TOPO TA Cloning[®] Version R, Invitrogen Life Technologies, 8. April 2004
- [HTTP://WWW.BECKMANCOULTER.COM, 06.02.2006] http://www.beckmancoulter.com/products/instrument/partChar/pc_multisizer3.asp, 06.02.2006
- [HTTP://WWW.CHANGBIOSCIENCE.COM, 18.07.2006] <http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html>, 18.07.2006
- [HTTP://WWW.CHEM.AGILENT.COM, 31.07.2006] <http://www.chem.agilent.com/temp/radD29EB/00048551.pdf>, 31.07.2006
- [HTTP://DORAKMT.TRIPOD.COM, 31.07.2006] <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>, 31.07.2006

A Puffer- und Medien

LB-Medium

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl
ad 1 L	MilliQ-Wasser
pH 7,0	ggf. mit HCl und NaOH einstellen

Die Feststoffe wurden eingewogen und in Wasser gelöst. Nach der Einstellung des pH-Wertes wurde das Volumen entsprechend mit Wasser aufgefüllt.

Herstellung des Salzwassermediums nach Guillard 1975

Zusammensetzung der Stocklösungen:

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

1)	NaNO_3	75 g/L
2)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	6,24 g/L
3)	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	15 g/L
4)	Metall-Mix-Stocklösungen	
a)	$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,15 g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,10 g
	$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,12 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,00 g
b)	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	5 g
c)	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,065 g
d)	Na_2EDTA (Titriplex III)	5 g
	(gelöst in 100 mL bidest. Wasser)	

Zusammensetzung Metall-Mix

- 10 mL der Stocklösung a)
- 10 mL der Stocklösung b)
- 10 mL der Stocklösung c)
- 10 mL der Stocklösung d)

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

Die Stocklösungen 1–4 wurden autoklaviert.

5) Vitaminlösung

Stocklösungen:

- | | |
|----------------|-----------------------------|
| a) Biotin | 1 mg / 10 mL bidest. Wasser |
| b) Vitamin B12 | 1 mg / 10 mL bidest. Wasser |

Zusammensetzung der Vitaminmischung:

- 1 mL der Stocklösung a)
- 1 mL der Stocklösung b)
- 20 mg Thiamin-HCL

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

Zusammensetzung des F/2-Mediums:

Zu 1000 mL antarktischem Seewasser wurden folgende Komponenten zugegeben:

- 1 mL NaNO_3 -Stocklösung
- 1 mL Na_2HPO_4 -Stocklösung
- 1 mL Na_2SiO_3 -Stocklösung
- 1 mL Metall-Mischung
- 1 mL Vitamin-Mischung

Nach jeder Zugabe wurde gründlich gemischt, damit es nicht zu Ausfällungen der Salze kam. Nach Zugabe aller Komponenten betrug der pH ca. 8.

Das Medium wurde durch Satobran Kapsulen (Sartorius, Deutschland) auf $0,2\ \mu\text{m}$ sterilfiltriert.

TAE-Puffer

1x TAE-Puffer wurde durch Verdünnen des 50x TAE-Puffers (Eppendorf, Deutschland) mit deionisiertem Wasser hergestellt. Das Pufferkonzentrat beinhaltet 2 M Tris-Acetat und 0,05 M EDTA bei pH 8,5.

TE-Puffer

TE-Puffer wurde durch Verdünnen von Tris- und EDTA-Pufferkonzentraten (1 M Tris pH 8,0 (Ambion, Inc., USA), 0,5 M EDTA pH 8,0 (Ambion, Inc., USA) mit Reinstwasser hergestellt. Die Endkonzentrationen betragen 10 mM Tris und 1 mM EDTA.

Instant Ocean und Sea Salts im Vergleich mit Meerwasser

Angaben in mg/L bei 35 ‰

	Herstellerangabe InstantOcean	Herstellerangabe Sea Salts	Zusammensetzung Seewasser ¹
Cl	19.251	19.290	19.499
Na	10.757	10.780	10.805
SO ₄	2.659	2.660	2.690
Mg	1.317	1.320	1.288
Ca	398	400	413
K	402	420	399
CO ₃	192	200	12
HCO ₃	zusammen mit CO ₃		106
Br	2,30	56	k. A.
Sr	8,60	8,8	7,89
BO ₃	32,40	5,6	k. A.
F	<0,05	1	k. A.
Li	0,18	0,3	0,14
Si	k. A.	k. A.	0,14
Ru	Spuren	k. A.	k. A.
I, IO ₃	0,22	0,24	k. A.
Ba	Spuren (<0,05)	k. A.	5,49E ⁻⁰³
Mo	Spuren (<0,01)	k. A.	9,59E ⁻⁰³
V	Spuren (<0,04)	k. A.	2,04E ⁻⁰³
Al	Spuren (<0,04)	k. A.	5,39E ⁻⁰⁵
Zn	Spuren (<0,02)	k. A.	6,54E ⁻⁰⁵
Cu	Spuren (<0,03) (74% CuCO ₃)	k. A.	6,35E ⁻⁰⁵
Fe	Spuren (<0,03)	k. A.	5,58E ⁻⁰⁶
Ni	Spuren (<0,04)	k. A.	k. A.
Cr	Spuren (<0,006)	k. A.	1,56E ⁻⁰⁴
Mn	Spuren (<0,01)	k. A.	2,20E ⁻⁰⁵
Co	Spuren (<0,05)	k. A.	2,95E ⁻⁰⁶
Ag	k. A.	k. A.	1,08E ⁻⁰⁶
Pb	Spuren (<0,005)	k. A.	1,24E ⁻⁰⁵
Cd	Spuren (<0,02)	k. A.	1,12E ⁻⁰⁵
As	Spuren (<0,0002)	k. A.	k. A.
Sn	Spuren	k. A.	k. A.
Sb	Spuren	k. A.	k. A.
Se	Spuren	k. A.	k. A.
Hg	keins	k. A.	k. A.
PO ₄	keins	k. A.	18,99
NO ₃	keins	k. A.	12,40
Daneben <0,5 Spurenelemente			

Zusammensetzung Instant Ocean und Sea Salts im Vergleich mit Meerwasser

¹[ATKINSON UND BINGMAN., 1997]

B Ergebnisse

Alignment der Ausgangs-AFP-Sequenzen auf Aminosäurebasis

CLUSTAL X (1.83) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

Page 1 of 2

```

F_cylindrus_3  --XTLXNNHF-HQSKSQIYKSKMMNLNLFLL--SVAVMVSAIKGAS---INVQPVKIGNAAGDFAILAKTGISIVPKSTVITGNIAVSPITSAAITGFSLI 92
F_cylindrus_1  ELTKPSTTILPPQSKSK-SKSKMMNLNLFLLI--SAAAMVSVASASTALPPPPAVNLG-TAEDFVILAKAGVTNVPQGAITGDI GVSPIAASAMTGFDLV 96
F_pseudonana  --NPNPQQPPFPQSKSK-SKSKTMMNLFLL--SVAAMI SVASAS---SPTAVNLR-TAGDFVILAKAGITNVPQGVITGDI GVSPIAASAMTGFDLI 89
F_cylindrus_2  NKQKFOOLLPQSKSK-SKSKMMNLNLFLLI--SAAAMVSVASANN---PSPAVDLG-TAEDFVILAKAGITNVPQGVITGDI GVSPIAASAMTGFNLI 93
N_glacel       GQKQFNNSI--NSISFFHYHYSIFFTMMFLAKIVTLLVALVASV--AAEQSAVDLQ-TAGDFAVLSKAGVSTTGFTTEVTGDI GTSPIASTALGCFALI 96
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100

```



```

F_cylindrus_3  IDSSFTFATSTQVGVKVASDYTD--GSNLIIVAVGENKAAAYNDAAGRDIT-----AINGIDNMLGGGIGGTTLSGVVTFD VDVLTINGLDLPF--SG 182
F_cylindrus_1  MDSSNEFSTSTEITCKAWAPDVMSPGKLTAVSDMLTAYNDAAARPVTGGPFGNLSGETVYTNL GAGHIGGLTLTRGVVYVDINVTISGKVTPE--HG 194
F_pseudonana  MDSSNEFSTSEQVVGSVAPNIMGPTGKLTAVSDMLTAYNDAAARPVTGGPFGNLSGETVYTNL GAGHIGGLTLTRGVVYVDINVTISGKVTPE--KG 187
F_cylindrus_2  MDSSNEFSTSTEASGSFVAPDVMSPGKLTAVSDMLTAYNDAAARPVTGGPFGNLSGETVYTNL GAGHIGGLTLTRGVVYVDISVGTGSDVTFDGDG 193
N_glacel       KDSSNFFSTSLVTKIIFAADYTAFTPSKMTAISDSWTAFTDAAGR-----SDPDLFLGAGTEGETLVAGLTKWGTIDVSTSSLV-F--DG 182
ruler .....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200

```



```

F_cylindrus_3  NATDVFIIQTSKNVKQAGTSTVILSGGAKAENIFWQVAQEVVVAAGSHMEGVILCOQTG----- 240
F_cylindrus_1  GADDVFIKTSKSVLQAAQTEVVTGGAAQKIFWSVAQEVNVA GAHMEGILLVKTAVKFI GSSFVGRVLSATAVTLOSRAITAPASSAPTRRGPRG 294
F_pseudonana  GADDVFIKTSKSVLQAAQTEVILQNGAKAENIFWSVAQEVNVA GAHMEGILLVKTAVKFI GSTFVGRVLSATAVTLOSRAITAPASSAPTRRGLRG 287
F_cylindrus_2  NEDSVFIKTSKSVLQAAQTEVILQNGAKAENIFWSVAQEVNVA GAHMEGILLVKTAVKFI GSSSFEGRVLSATAVTLOEATHQQTAS--SARRGLRG 291
N_glacel       SATDVMILQVAQDFIVGMGAQMILTGTAKAENIFIQVSGAVNICHTAHVEGNILSATAIALQIGSSLNKALSQATATLDSVTVIVS----- 268
ruler .....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300

```



CLUSTAL X (1.83) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

Page 2 of 2

```

F_cylindrus_3      ----- 240
F_cylindrus_1     LQVA      298
F_pseudonana      LQVA      291
F_cylindrus_2     -QVA      294
N_glacéi          ----- 268
ruler            .....

```

Alignment der Aminosäuresequenzen der Ausgangs-AFPs

Alignment der AFP-Sequenzen für den Neighbour-joining-Baum auf Aminosäurebasis

CLUSTAL X (1.83) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

Page 1 of 2

```

Clade1 -----ASASTY---YNVVDLGT-EDFVILAKAGVTNPAPDPKAITGNIGVSPIAASAMTGFDL 57
Clade5 -----GMLSVASASTY---YNVVDLGT-EDFVILAKAGVTNPAPDPKAITGNIGVSPIAASAMTGFDL 62
Clade11 -----FVILAKAGVTNPAPDPKAITGNIGVSPIAASAMTGFDL 39
Clade2 -----MHARAAASVMD-ICRIRPSGMLSVASASTY---YNVVDLGT-EDFVILAKAGVTNPVPG--GAITGDI
Clade8 -----KPAL-----FVILAKAGVTNPVPG--GAITGDI 40
Clade4 -----GMLSVASASTY---YNVVDLGT-EDFVILAKAGVTNPVPG--GAITGDI 59
F_cylindrus_2 NKQKQQQLLPSQSKSKSKKMMNLN-LFLISAAAMVSVASANNP--SPPAVDLGT-EDFVILAKAGVTNPVPG--G
F_cylindrus_1 ELTKPSTTILPPOSKSKSKKMMNLN-LFLISAAAMVSVASASTALPSPPAVNLGT-EDFVILAKAGVTNPVPG--G
F_pseudonana --NPNPQQPPPSQSKSKSKKMMNLN-LFLLSVAAMISVASAS----SPTAVNLRTA-GDPVILAKAGITNPVPG--G
Clade3 -----MHARAAASVMD-ICRIRPSGMLSVASAS----SPTAVNLRTA-GDPVILAKAGITNPVPG--G
Clade6 -----LFLLSVAVMNVNVIKASII--NVQPVLELGNAAAGDPAILAKTGISTVPK--PVTGNIAVSPITSAITG
Clade7 -----LFLLSVAVMNVNVIKASII--NVQPVLELGNAAAGDPAILAKTGISTVPK--PVTGNIAVSPITSAITG
F_cylindrus_3 --XTLXNNHPSQSKSQIYKSKMMNLN-LFLLSVAVMVAIKGASII--NVQPVKLGNAAGDPAILAKTGISTVPK--S
Clade10 -----GNIVVSPITSAITGFTL 18
Clade9 -----GNIVVSPITSAITGFTL 18
N_glacel GQNCFFNNSINSITFFVHYYSIFPTMFLAKTITLLVALVASSV-AAEQSAVDLGT-GDPAVLSKAGVSTTGP--TE
Typhula_ishikariensis -----MESASSLLAVIALAVSSVSAAGPSAVPLGTA-GNYVILASTGVSTVPO--SVITGAVGVSPTAAASLTG
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100

```



```

.....*** * ..**
Clade1 VMDSSNEFSTSSQVT--GNLYAPDYMSPTGKTLTAVSDMLTAYNDAARPVVGGPF--GNSLSGETYTNLGA
Clade5 VMDSSNEFSTSSQVT--GNLYAPDYMSPTGKTLTAVSDMLTAYNDAARPVVGGPF--GNSLSGETYTNLGA
Clade11 VMDSSNEFSTSSQVT--GNLYAPDYMSPTGKTLTAVSDMLTAYNDAARPVVGGPF--GNSLSGETYTNLGA
Clade2 VMDSSNEFSTSTEIT--GKAFAPDYMSPTGKTLTAVSDMLTAYNDAARPVVGGPF--DNSLSGETYTNLGA
Clade8 VMDSSNEFSTSTEIT--GKAFAPDYMSPTGKTLTAVSDMLTAYNDAARPVVGGPF--DNSLSGETYTNLGA
Clade4 VMDSSNEFSTSTEIT--GKAFAPDYMSPTGKTLTAVSDMLTAYNDAARPVVGGPF--DNSLSGETYTNLGA
F_cylindrus_2 IMDSSNEFSTSTEAS--GSFYAPDYMSPTGKTLTAVSDMLTAYNDAARPVVGGPF--DNSLSGETYTNLGA
F_cylindrus_1 VMDSSNEFSTSTEIT--GKAYAPDYMSPTGKTLTAVSDMLTAYNDAARPVVGGPF--GNSLSGETYTNLGA
F_pseudonana IMDSSNEFSTSEQVV--GSVYAPNYMSPGKTLTAVSDMLTAYNDAARPVVGGPF--GNSLSGETYTNLGA
Clade3 IMDSSNEFSTSEQVV--GSVYAPNYMSPGKTLTAVSDMLTAYNDAARPVVGGPF--GNSLSGETYTNLGA
Clade6 IIDSSDTFATSTQVV--GKVKASDYTD--GSNLIITAVGQMKDAYNDAAGRDIT-----ANNGIDN
Clade7 IIDSSDTFATSTQVV--GKVKASDYTD--GSNLIITAVGQMKDAYNDAAGRDIT-----ANNGIDN
F_cylindrus_3 IIDSSDTFATSTQVV--GKVKASDYTD--GSNLIITAVGQMKDAYNDAAGRDIT-----ANNGIDN
Clade10 IIDSSNMFSTSTQVT--GNVYAPDYTG--GSDLIITVISQMETAYDDAASRDT-----ANVADSN
Clade9 IMDSSGHFSTSTQVT--GSVYAPDYV--GSALTPVNDMMGAYEDAVGCATS-----DDDATTNLGAGN
N_glacel IKDSSNIFSTSSLVT--GKIYAADYIAPTPSKMTTASDMSTAFDTAAGR-----SDPDFLEL
Typhula_ishikariensis ILSGTGTFSTSSQVT--GOLTGADYGTTPPSILTTAIGDMGTAYINAAAT-----SGPDFLEIYTGALG
ruler .....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200

```



CLUSTAL X (1.83) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

Page 2 of 2

```

      .  .:*::  .  .: *  .  .:***:
Clade1 DAQNNP DAVPIIK TSKNVLQAAGKSVILAGGAAKNI FWSVAQEVNVGAGAHMKGILLVATAVKFITGSSFFVGRVLSATAVTLQAAITISAPKTT----- 248
Clade5 DAQNNP DAVPIIK TSKNVLQAAGKSVILAGGAAKNI FWSVAQEVNVGAGAHMKGILLVATAVKFITGSSFFVGRVLSATAVTLQSAITIDPPTSATGAPT 259
Clade11 DAKDDP DAVPIIK TSKNVLQAANTNVILAGGAAKNI FWSVAQEVKVGAGAHMEGILLVATAVKFITGSSFFVGRVLSAT----- 215
Clade2 DAKDDP DAVPIIK TSKNVLQAANTNVILAGGAAKNI FWSVAQEVKVGAGAHMEGILLVATAVKFITGSSFFVGRVLSATAVTLQSAITIDPPTSATGAPT 274
Clade8 DAKDDP DAVPIIK TSKNVLQAANTNVILAGGAAKNI FWSVAQEVKVGAGAHMEGILLVATAVKFITGSSFFVGRVLSAT----- 216
Clade4 DAKDDP DAVPIIK TSKNVLQAANTNVILAGGAAKNI FWSVAQEVKVGAGAHMEGILLVATAVKFITGSSFFVGRVLSATAVTLQAAITISAPKTT----- 250
F_cylindrus_2 DGDGND SVPIIK TSKSVLQAAGTEVILQNGAKAENIFWSVAQEVNVGAGAHMKGILLVKTAVKFITGSSFFVGRVLSATAVTLQEAITHQOPTASSA---- 285
F_cylindrus_1 H--GGADDVPIIK TSKSVLQAANTEVVLTGGAAKNI FWSVAQEVNVGAGAHMEGILLVKTAVKFITGSSFFVGRVLSATAVTLQSAAITAPATSAP---T 287
F_pseudonana K--GGADDVPIIK TSKSVLQAAGTQVKLTGGAAKNI FWSVAQEVNVGAGAHMEGILLVKTAVKFITGSSFFVGRVLSATAVTLQSAAITAPASSAP---T 280
Clade3 DGKNDP SSVPIIK TSKNILQAANTDVLITNGAKAENIFWSVAQEVNIGAGAHMKGILLVATAVKFITGSSFFVGRVLSATAVTLQAAITIDPPTAATS---- 271
Clade6 DGEGNS DAVPIIQ TSKNVKQAGSTSVILSGGAKAENIFWQVAQEVVVAAGSHME----- 210
Clade7 D--GGE DAVPIIQ TSKNVKQAGSTSVILSGGAKAENIFWE----- 194
F_cylindrus_3 S--GNATDVPIIQ TSKNVKQAGSTSVILSGGAKAENIFWQVAQEVVVAAGSHMEGVILQGTG----- 240
Clade10 S--GSA TDVPIIQ TSKNVIQAAANTNVILAGGAKAENIFWSVAGTVNVVAGSHME----- 152
Clade9 T--GDENSVPPIIQ TIGNVLQTAANNMIL-DGVLAKNILWLVAQSVTVNAGSHME----- 154
N_glac1 D--GSA TDVWILQVAKDFIVNGAQMILGTAKAENIFIQVSGAVNIGTTAHVEGNILSATAIALQTSGLNGKALSQTAITLDSVITIVSIGRIGLGNFK 278
Typhula_ishikariensis S--GTS TDTWIFQIDGTLDVATGKQITLVGGAQAKNI IIVVWVAGAVNIEVGAKEGILAKTAVTFKTSGLNGRILAQTAVALQSAIVEK----- 243
ruler .....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300

```



```

Clade1 -RRGPRGQGRILGISILAAARACI 272
Clade5 NRRGPRG----- 266
Clade11 ----- 215
Clade2 N----- 275
Clade8 ----- 216
Clade4 -RRGPRG----- 256
F_cylindrus_2 -RRGLRGQVA----- 294
F_cylindrus_1 TRRGPRGLQVA----- 298
F_pseudonana TRRGRLRGLQVA----- 291
Clade3 -SPTR----- 276
Clade6 ----- 210
Clade7 ----- 194
F_cylindrus_3 ----- 240
Clade10 ----- 152
Clade9 ----- 154
N_glac1 DSSFRVDLLNPRETEHESL----- 298
Typhula_ishikariensis ----- 243
ruler .....310.....320.....

```

Alignment der Aminosäuresequenzen der AFPs auf deren Grundlage der Neighbour joining - Baum erstellt wurde

Wachstumsraten der Kulturen aus dem Hauptversuch

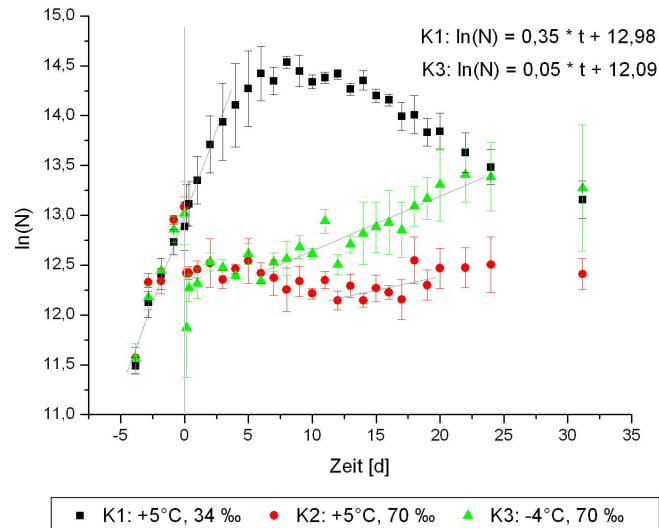


Abbildung 21: Wachstumsraten der Kulturen 1 und 3. Von Kultur 2 wurde keine Wachstumsrate bestimmt. Die Werte sind aus den drei parallelen Kulturen gemittelt und die Standardabweichung ist angegeben. Der graue Strich bei Tag 0 markiert den Versuchsbeginn. N: Zellzahl in Z/mL

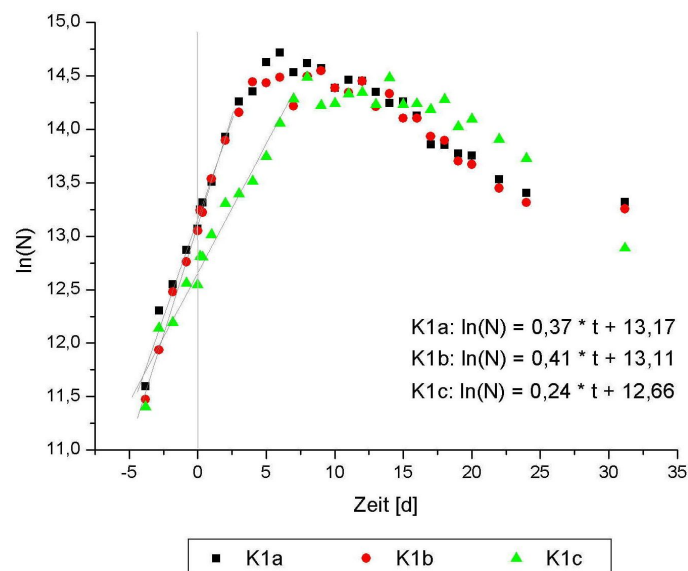
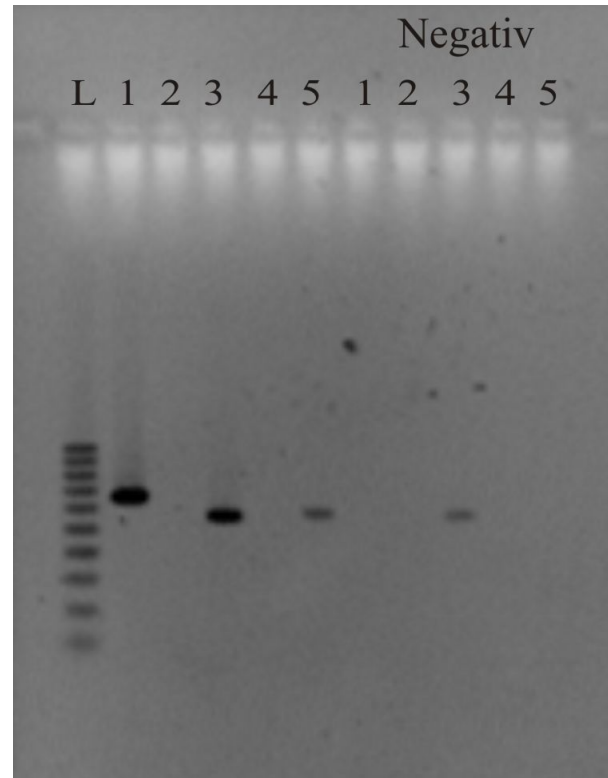


Abbildung 22: Wachstumsraten der einzelnen Kulturen unter Kulturbedingung 1. Der graue Strich bei Tag 0 markiert den Versuchsbeginn.

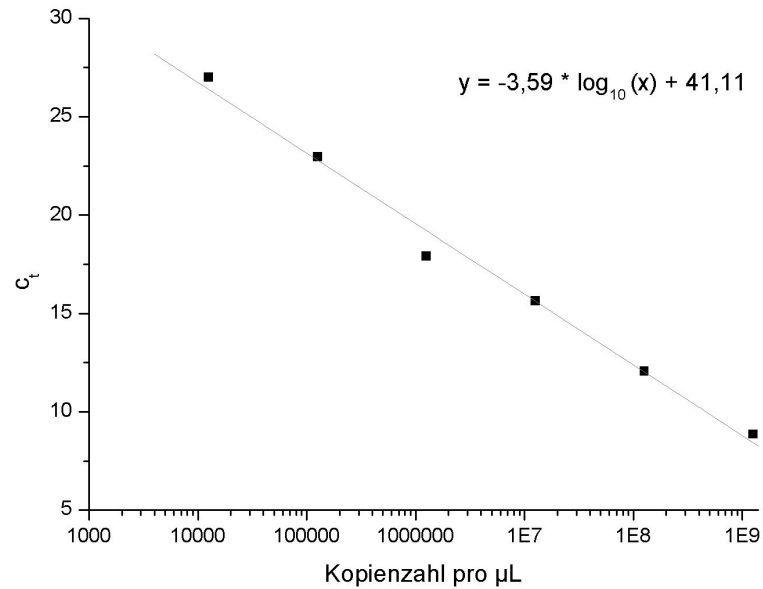
Primertest für die halbquantitative PCR



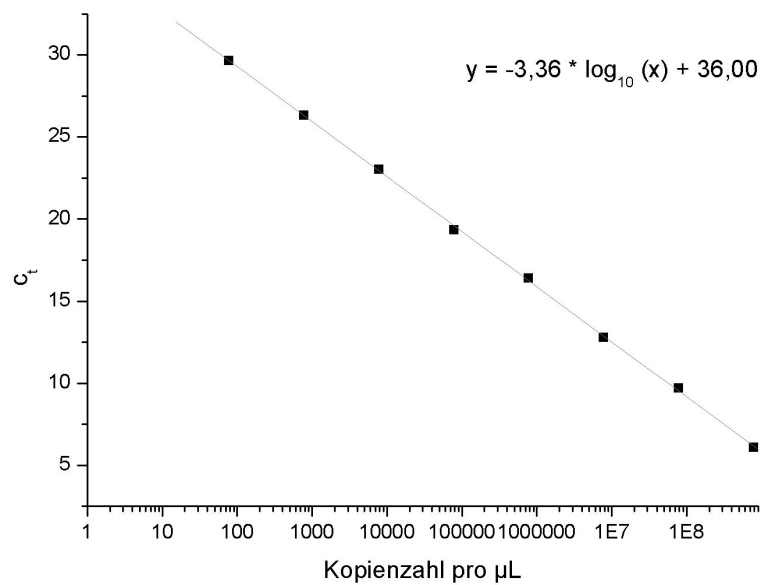
Slot auf dem Gel	Primerkombination (vgl. Tabelle 20)	Template
L	100bp Leiter	
1	HQ_1	5
2	HQ_2	5
3	HQ_3	2
4	HQ_4	2
5	HQ_5	3
Negativ 1	HQ_1	Wasser
Negativ 2	HQ_2	Wasser
Negativ 3	HQ_3	Wasser
Negativ 4	HQ_4	Wasser
Negativ 5	HQ_5	Wasser

Primertest für die halbquantitative PCR

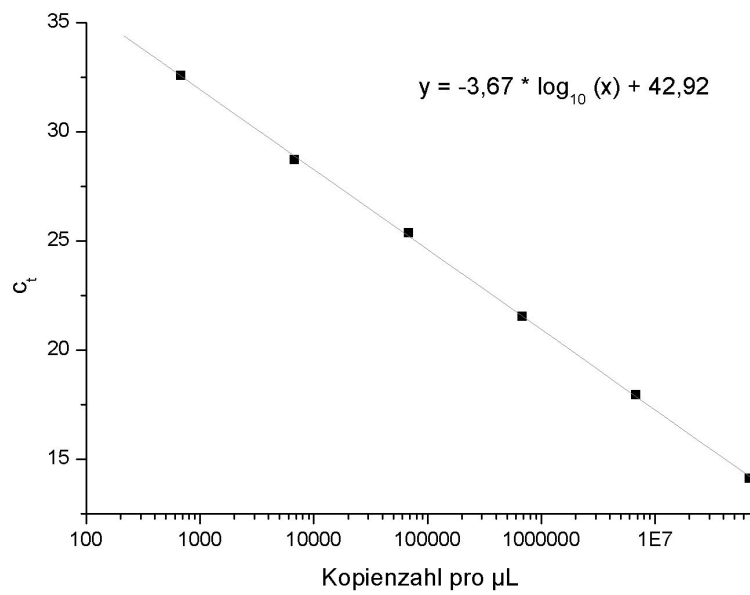
Standardgeraden für die Real-Time-PCR



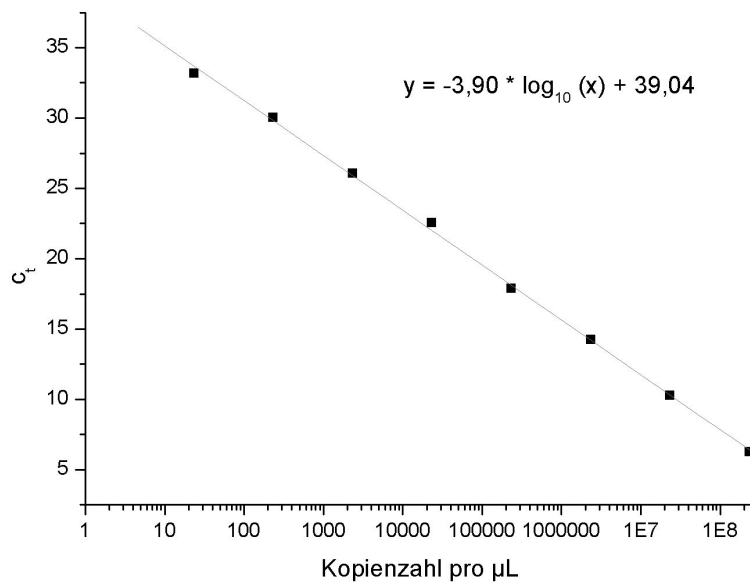
Standardgerade für die Real-Time-PCR MA



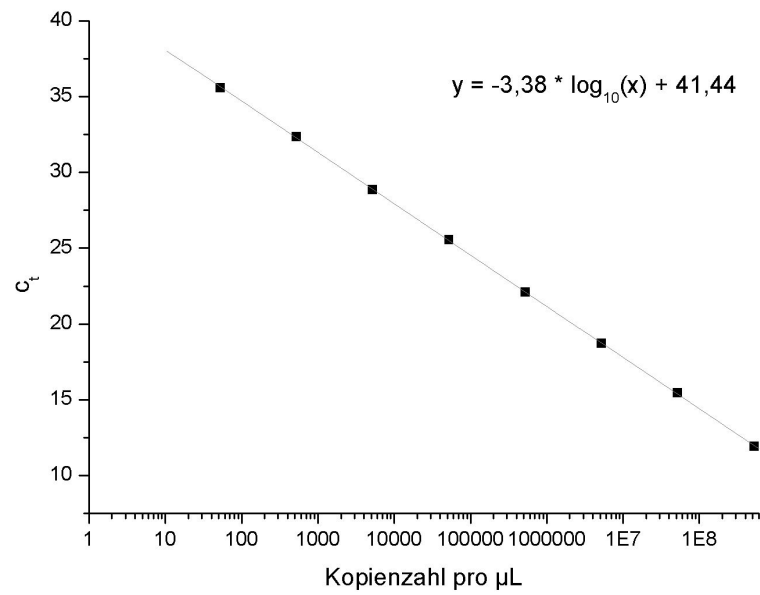
Standardgerade für die Real-Time-PCR rib40



Standardgerade für die Real-Time-PCR Aktin



Standardgerade für die Real-Time-PCR AFP_2a



Standardgerade für die Real-Time-PCR AFP_10

C Geräte und Materialien

Allgemein

- Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Deutschland
- Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Deutschland
- Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland

- Pipetten: 10, 20, 100, 200 und 1000 μ l, Eppendorf, Deutschland
- Mehrkanalpipetten 10, 100, 200, 1000 und 1200 μ L, Eppendorf, Deutschland
- Pipettenspitzen: epT.I.P.S. PCR clean, diverse Größen, Eppendorf, Deutschland

- Pinzetten
- Skalpelle
- Thermometer

- Reaktionsgefäße: 0,2, 0,5, 1,5 und 2,0 mL, PCR Clean Eppendorf, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen, 15 und 30 mL, Orange Scientific, Belgien
- 96 V Mikrotiterplatten, Biozym, Deutschland
- Deepwell Platten, 96 well, 2,2 mL, Omnilab, Deutschland
- PCR-Film, Eppendorf, Deutschland
- Norm Ject, 20 und 50 mL Spritzen, steril, Henke Sass Wolf GmbH, Deutschland
- Sterilfilter: Minisart, Porenweite 0,20 μ m, Sartorius, Deutschland

- Water Molecular Biology Grade, Eppendorf, Deutschland
- Ethanol, p.a., $\geq 99,8\%$, Carl Roth, Deutschland
- Isopropanol, p.a. $\geq 99,7\%$, Carl Roth, Deutschland
- Flüssiger Stickstoff

- Primer für die PCR und die Real-Time PCR, OPERON Biotechnologies, Deutschland

PCR

- Mastercycler[®] (Gradient), Eppendorf, Deutschland
- HotmasterMix, Eppendorf, Deutschland
- ReadyMix[™], TaqPCR Reaction Mix With MgCl₂, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- TE-Puffer: 1 M Tris pH 8,0, Ambion, Inc., USA
0,5 M EDTA, pH 8,0, Ambion, Inc., USA

Agarose-Gelelektrophorese

- Elektrophorese-Kammer: MiniSub[®] Cell, Sub-Cell[®] GT, Sub-Cell[®] Modell 96, Bio-Rad, Deutschland
- Elektrophorese-Kammer, MWG-Biotech, Deutschland
- Spannungsgeber: Power Pack Basic, Bio-Rad, Deutschland
- Mini Electrophoresis Power Supply E143, Consort, Belgien
- Photo-Imager: Vilber Lourmat, Frankreich, EDV-Programm BioCapt
- Dark Reader, Clare Chemical Research, USA
- Agarose LE, Ambion, Inc., USA
- 50x TAE-Puffer (2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA, pH 8)
- Loading buffer, Applied Biosystems, USA
- PCR 100bp Low Ladder, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- DNA Ladder, 1kB (0,5–10 kB), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- SYBR[®] Green Nucleic Acid Gel Stain, Molecular Probes[™], invitrogen detection technologies, Invitrogen[™] life technologies, Invitrogen GmbH, Deutschland
- Ethidium-Bromid, aqueous solution, for molecular biology, 10 mg/mL, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

PCR-Produkt-Aufreinigung

- Laboport Vakuumpumpe, KNF, Deutschland
- MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen, Deutschland
- MinElute PCR Purification Kit, Qiagen, Deutschland
- MinElute 96 UF PCR Purification Kit, Qiagen, Deutschland

- Ethanol
- Isopropanol

Plasmidpräparation

- QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Deutschland
- R.E.A.L.[®] Prep96 Plasmid Kit, Qiagen, Deutschland
- Isopropanol
- Ethanol (96%, 70%)

Sequenzierung

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

- DyeEx 2.0 Spin Kit, Qiagen, Deutschland
- DyeEx 96 Kit, Qiagen, Deutschland
- FG, TCII Reaction Plate, 96 well barcode, Applied Biosystems, USA

- ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, USA
- ABI PRISM[®] Big Dye[®] Terminator v1.1 / 3.1 Sequencing Buffer (5x), Applied Biosystems, USA

Klonierung

- Unimax 1010-Schüttler mit Heizmodul Inkubator 1000, Heidolph Instruments, Deutschland
- Topo TA Clonig[®] Kit (containing pCR[®]2.1-TOPO[®]), Invitrogen GmbH, Deutschland
- One Shot[®] TOP10 Chemically Competent E. coli, Invitrogen GmbH, Deutschland
- Kunststoff Petri-Schalen
- Hefeextrakt, Omnilab, Deutschland
- Trypton, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- Natriumchlorid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- Agar select, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- Kanamycin solution from Streptomyces kanamyceticus, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Deutschland
- X-Gal, Promega GmbH, Deutschland
- AirPore Tape Sheets, Qiagen, Deutschland
- Sterile Zahnstocher

Kulturen

- Lichtthermostat, RUMED, Rubarth Apparate GmbH, Deutschland
- Pumpen: EcoAir, JBL GmbH & Co.KG, Deutschland
Optima, Holm, Deutschland
- LI-COR Radiation Sensor, Typ LI-1000, LI-COR[®] Biosciences, USA
- Axiovert 200, Carl Zeiss AG, Deutschland

- Sterilfilter für Medienfiltration: Satobran Kapsulen, Sartorius, Deutschland
- Erlenmeyerkolben, 0,5 bis 2 L
- 5 L Schott Flaschen mit weitem Hals (ca. 10 cm Innen-Durchmesser)
- Silikonstopfen
- Silikonschläuche Innendurchmesser 3 mm, Außendurchmesser 5 mm
- Glasröhrchen
- diverse Schlauchverbinder
- Schlauchklemmen
- Magnetrührer und hantelförmige Magnetrührstäbchen
- Luftfilter: Midisart 2000, Porenweite 0,20 μm , Sartorius, Deutschland
- Instant Ocean[®], Aquarium Systems, Frankreich
- Sea Salts, Sigma, Deutschland

Probenahme

- Vakuumpumpe: Emerson
- 3-fach Filtrationsgestell und 30 mL Filteraufsätze (Sartorius, Deutschland)
- Norm Ject, 20 und 50 mL Spritzen, steril, Henke Sass Wolf GmbH, Deutschland
- Multisizer[™] 3 COULTER COUNTER[®] , Beckman Coulter[™], Beckman Coulter GmbH, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen, 15 mL, Orange Scientific, Belgien
- Isopore Membrane Filters, Filtertype 1,2 μm RTTP, Millipore, Deutschland
- 2,0 mL Apex-Microtube Conical NS, neoLab, Deutschland
- Flüssiger Stickstoff
- 0,2 μm filtriertes Seewasser

Zellzahlbestimmung

- MultisizerTM 3 COULTER COUNTER[®], Beckman CoulterTM, Beckman Coulter GmbH, Deutschland
- Coulter[®] Isoton[®] II Diluent, Beckman CoulterTM, Beckman Coulter GmbH, Deutschland
- 20 mL Probengefäße, Beckman CoulterTM, Beckman Coulter GmbH, Deutschland

Bestimmung der Quanten-Ausbeute

- XE-PAM-Fluorometer, Heiner Walz GmbH, Deutschland
- Control Unit FL-100, Photon System Instruments, Tschechien
- Power Supply PS-2/30

- Schwarz lackierte Szintillations-Glasgefäße, 20 mL

pH-Messung und Nährstoffanalyse

- pH-Fix 4,5–10,0, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland
- Evolution III Autoanalyser, Alliance Instruments, Österreich

RNA-Extraktion

- Biofuge Fresco, Heraeus, Deutschland

- RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Deutschland
- RNeasy MinElute Cleanup Kit, Qiagen, Deutschland
- RNase-Free DNase Set, Qiagen, Deutschland

- Glas beads (212–300 μm / 425–600 μm), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- Phase-Lock-Tubes, Eppendorf, Deutschland

- TRI[®]reagent, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- Chloroform, p.a. stabilisiert mit Ethanol, MERCK KgaA, Deutschland
- Isopropanol
- Ethanol (96%, 80%, 70%)
- β -Mercapto-Ethanol, für Molekularbiologie, MERCK KgaA, Deutschland

- Flüssiger Stickstoff

RNA-Qualitätskontrolle

- NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Inc., USA
- Agilent 2100 Bioanalyser und RNA Nano Chip, Agilent Technologies, Deutschland
- RNA 6000 Ladder, Ambion, Inc., USA

cDNA-Synthese

- Omnikript[®] RT Kit, Qiagen Deutschland

Real-Time-PCR

- ABI RISM[®] 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, USA
- SYBR[®]GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA
- 96-well optical reaction plate, Applied Biosystems, USA
- Optical adhesive cover starter Kit, Applied Biosystems, USA

Computerprogramme

- Chang Bioscience Molecular Weight Calculator
(<http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html>)
- Chromas Lite 2.01, Technelysium Pty Ltd
- ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)

- Clustal X 1.83
- Mafft
- Origin[®] 7G SR2, Origin Lab Corporation
- Primer Express 2.0.0, Applied Biosystems, USA
- SeqMan 5.07, DNASTAR Inc.
- Treecon 1.3 b, Yves van de Peer, Copyright 1994–2001
- Treeview 1.6.6, Copyright Roderic D.M. Page, 2001

- Bioanalyzer: Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer, 2100 Expert, Version 3.01.03 SI 136, Copyright 2003 Agilent Technologies
- Mikroskop: Axio Vision 4.4, Copyright 2002–2005, Carl Zeiss Vision GmbH
- NanoDrop: NanoDrop 3.1.0 oder NanoDrop ND-1000 3.2.1, Coleman Technologies Inc for NanoDrop Technologies, Copyright 1998 National Instruments Corporation
- PAM Fluorometer: Flwin, Fluorometer Version 2.4
- Photoimager: BioCapt Version 12.02, LTF Labortechnik
- Real-Time-PCR: Sequence Detection Software, Version 1.2.3, 7000 System Software, RQ Study Application, Copyright 2001–2004 Applied Biosystems, USA
- Sequenzierer: Sequencing Analysis Software v5.2 Patch 2, Copyright 2005 ABI