

**Untersuchung ausgewählter Aspekte des für Rotalgen
ungewöhnlichen Mannitolstoffwechsels an der Makroalge
Caloglossa leprieurii (Montagne) J. Agardh und der Mikroalge
Rhodella violacea (Kornmann) Wehrmeyer**

Dissertation

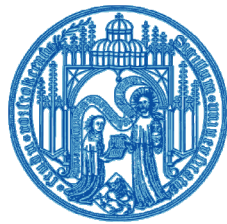
zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock



vorgelegt von

Kirsten van den Daele, geb. am 07.04.1977 in Hoyerswerda

aus Rostock

Rostock, April 2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0109-1

Gutachter: Prof. Dr. Ulf Karsten, Angewandte Ökologie, Universität Rostock
Prof. Dr. Hermann Bauwe, Pflanzenphysiologie, Universität Rostock

eingereicht am: 02.05.2008

erfolgreich verteidigt am: 15.09.2008

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit und die ihr zugrunde liegenden Versuche selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Diese Arbeit hat noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen.

Kirsten van den Daele

Rostock, April 2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	S. I
Abbildungsverzeichnis.....	S. IV
Tabellenverzeichnis.....	S. V
Abkürzungsverzeichnis.....	S. VI
 1. Einleitung.....	 S. 1
Aufgabenstellungen der Arbeit.....	S. 7
2. Material und Methoden.....	S. 8
2.1 Algenkultivierung und Probennahme von Frischmaterial.....	S. 8
2.2 Extraktion/Charakterisierung Enzyme des Mannitolmetabolismus.....	S. 9
2.2.1 Enzymextraktion.....	S. 9
2.2.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	S. 10
2.2.2.1 Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase (Mt1PDH) EC 1.1.1.17.....	S. 12
2.2.2.2 Mannitoldehydrogenase (MtDH) EC 1.1.1.67	S. 12
2.2.2.3 Hexokinase (HK) EC 2.7.1.1	S. 13
2.2.2.4 Mannitol-1-Phosphatase (Mt1Pase) EC 3.1.3.22	S. 13
2.3 Extraktion/Charakterisierung Mt1PDH aus <i>Caloglossa leprieurii</i>	S. 13
2.3.1 Enzymextraktion.....	S. 13
2.3.2 Enzymreinigung.....	S. 14
2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford (Bio-Rad Protein Assay Kit).....	S. 15
2.3.4 Denaturierende Proteinelektrophorese im SDS-Gel.....	S. 16
2.3.5 Native Elektrophorese im Polyacrylamidgel.....	S. 17
2.3.6 Native Elektrophorese im Stärkegel.....	S. 18
2.3.6.1 Pufferzusammensetzungen.....	S. 18
2.3.6.2 Methode.....	S. 19
2.3.6.3 Gelverdau nach der Elektrophorese.....	S. 21
2.3.7 MTT/PMS-Färbung.....	S. 21
2.3.8 Coomassie-Färbung.....	S. 22
2.3.9 Silberfärbung.....	S. 22
2.3.9.1 Lösungen.....	S. 22
2.3.9.2 Methode.....	S. 22
2.3.10 Western Blot.....	S. 23
2.3.11 Serologischer Nachweis der Mt1PDH.....	S. 23

2.3.12 NBT/BCIP-Färbung.....	S. 24
2.3.13 Ausfällung extrazellulärer Polysaccharide durch Metallsalze.....	S. 24
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	S. 24
2.4.1 Isolation von RNA aus <i>Caloglossa leprieurii</i>	S. 24
2.4.2 Auftrennung von RNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese.....	S. 25
2.4.3 cDNA-Synthese.....	S. 25
2.4.4 DNA-Amplifikation mittels PCR (<i>polymerase chain reaction</i>).....	S. 25
2.4.4.1 PCR-Ansätze.....	S. 25
2.4.4.2 Oligonucleotide.....	S. 26
2.4.5 Isolation von DNA aus <i>Caloglossa leprieurii</i>	S. 27
2.4.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese.....	S. 27
2.4.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	S. 27
2.4.8 DNA-Isolation aus <i>Escherichia coli</i>	S. 27
2.5 Ökophysiologische Charakterisierung von <i>Rhodella violacea</i>	S. 26
2.5.1 Bestimmung des Mannitolgehaltes verschiedener Kulturen.....	S. 28
2.5.1.1 Polyolextraktion.....	S. 28
2.5.1.2 HPLC zur Bestimmung des Mannitolgehaltes.....	S. 28
2.5.2 Bestimmung der Wachstumsraten μ	S. 28
3. Ergebnisse.....	S. 30
3.1 Isolation und Charakterisierung der Mt1PDH aus <i>C. leprieurii</i>	S. 30
3.1.1 Aufreinigung des Proteins.....	S. 30
3.1.1.1 Native Elektrophorese im Stärkegel und anschliessende Proteinelution.....	S. 30
3.1.1.2 Ausfällung von Polysacchariden durch Metallsalze.....	S. 32
3.1.1.3 Ausfällung von Polysacchariden durch Polyethylenglycol.....	S. 32
3.1.1.4 Proteinisolation mittels FPLC: Affinitätschromatographie.....	S. 33
3.1.1.5 Proteinisolation mittels FPLC: Ionenaustauschchromatographie.....	S. 33
3.1.1.6 Aufreinigungsprotokoll.....	S. 34
3.1.2 Biochemische Charakterisierung der Mt1PDH.....	S. 36
3.1.2.1 Allgemeine Kenngrößen.....	S. 36
3.1.2.2 Identifizierung der AS-Sequenz durch Edmann-Abbau.....	S. 39
3.1.2.3 Identifizierung der AS-Sequenz durch MALDI-TOF.....	S. 39
3.1.2.4 Antikörper – Kreuzreaktionstest.....	S. 40
3.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung der Mt1PDH.....	S. 40

3.2 Mannitolmetabolismus in <i>Rhodella violacea</i>	S. 43
3.2.1 Charakterisierung Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase (Mt1PDH) EC 1.1.1.17.....	S. 44
3.2.2 Charakterisierung Mannitol-1-Phosphatase (Mt1Pase) EC 3.1.3.22.....	S. 47
3.2.3 Charakterisierung Mannitoldehydrogenase (MtDH) EC 1.1.1.67.....	S. 47
3.2.4 Charakterisierung Hexokinase (HK) EC 2.7.1.1.....	S. 49
3.3 Ökophysiologische Charakterisierung von <i>Rhodella violacea</i>	S. 50
3.3.1 Wachstum bei verschiedenen Salinitätsstufen.....	S. 51
3.3.2 Wachstum bei verschiedenen Lichtstufen.....	S. 52
3.3.3 Mannitolgehalt bei verschiedenen Salinitätsstufen.....	S. 53
4. Diskussion.....	S. 55
4.1 Aufreinigung der Mt1PDH aus <i>Caloglossa leprieurii</i>	S. 55
4.1.1 Pufferzusätze.....	S. 55
4.1.2 Native Elektrophorese im Stärkegel.....	S. 56
4.1.3 Proteinbestimmung in den einzelnen Fraktionen.....	S. 57
4.1.4 Wässriges 2-Phasen-System (ATPS = Aqueous two-phase-system).....	S. 59
4.1.5 Proteinfällung.....	S. 60
4.1.6 Entsalzung und Aufkonzentrierung der Proteinlösung.....	S. 61
4.1.7 Chromatographische Reinigungsschritte.....	S. 63
4.1.8 Bewertung des entwickelten Reinigungsprotokolles.....	S. 66
4.2 Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der Mt1PDH aus <i>Caloglossa leprieurii</i>	S. 68
4.2.1 Ermittlung der Aminosäuresequenz.....	S. 68
4.2.2 Fischung der Gensequenz mit Hilfe von degenerierten Primern.....	S. 71
4.2.3 Kreuzreaktionstests mit Mt1PDH-Antikörpern aus <i>Eimeria tenella</i> ...	S. 72
4.2.4 Bewertung der Eignung von <i>C. leprieurii</i> als Modellorganismus für molekularbiologische Untersuchungen.....	S. 73
4.3 Biochemische Charakterisierung der Enzyme des Mannitolmetabolismus' in <i>Rhodella violacea</i>	S. 74
4.4 Ökophysiologische Charakterisierung von <i>Rhodella violacea</i>	S. 80
4.5 Beantwortung der Fragestellungen der Arbeit.....	S. 83
5. Zusammenfassung.....	S. 84
6. Literaturverzeichnis.....	S. 85
7. Anhang (verwendete Protein- und Gensequenzen, Lebenslauf).....	S. i

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Probenahmeort Jawbone Reserve, Williamstown, Australien (A - <i>Avicennia</i> Gebüsch, B - Nahaufnahme Luftwurzeln, C - Binokularansicht <i>Caloglossa leprieurii</i>).....	S. 1
Abb. 1.2	Mannitol Metabolismus in <i>Caloglossa leprieurii</i>	S. 4
Abb. 1.3	<i>Rhodella violacea</i> , Stamm 3621, Sammlung Universität Rostock.....	S. 5
Abb. 1.4	<i>Dixoniella grisea</i> , Stamm 3620, Sammlung Universität Rostock.....	S. 5
Abb. 2.1	Kulturkolben mit <i>Caloglossa leprieurii</i>	S. 8
Abb. 2.2	Stony Creek Backwash, Williamstown, Australien.....	S. 9
Abb. 2.3	<i>Caloglossa</i> -Schicht am Probenahmeort.....	S. 9
Abb. 2.4	Linearisierung enzymkinetischer Daten nach Hanes.....	S. 11
Abb. 2.5	Versuchsaufbau native Elektrophorese im Stärkegel.....	S. 20
Abb. 2.6	A - Wachstumsfluorimeter mit Meßeinheit, B - Innenansicht Fluorimeter mit Halterung für Kleinfeldküvette und 4 Leuchtdioden, C - mediumgefüllte Kleinfeldküvette.....	S. 29
Abb. 3.1	Proteinspots Mt1PDH nach Elektrophorese im 11,5 % Stärkegel.....	S. 30
Abb. 3.2	SDS-Gel mit Probenelution nach Stärkegelelektrophorese.....	S. 31
Abb. 3.3	Proteinrohextrakt aus <i>Caloglossa leprieurii</i> nach Fällung mit 15 % PEG und 25 % Ammoniumsulfat, zentrifugiert.....	S. 32
Abb. 3.4	Chromatogramme der IEX mit verschiedenen Säulenmatrices.....	S. 34
Abb. 3.5	Fliess-Schema Aufreinigung der Mt1PDH.....	S. 35
Abb. 3.6	Silbergefärbtes Gel nach SDS-PAGE im 12 % Gel.....	S. 36
Abb. 3.7	PA-Gele nach nativer Elektrophorese mit gereinigter Mt1PDH A – Silberfärbung, B – Zymogramm.....	S. 37
Abb. 3.8	Ergebnis der 2D-PAGE der aufgereinigten Mt1PDH.....	S. 38
Abb. 3.9	Sequenzauswertung Mt1PDH nach Edmann-Abbau.....	S. 39
Abb. 3.10	Ergebnis des AS-Sequenzvergleiches d. Mt1PDH aus versch. Organismen..	S. 41
Abb. 3.11	Gelüberprüfung durch PCR erzeugter Fragmente im Agarosegel.....	S. 42
Abb. 3.12	spez. EA Mt1PDH bei verschiedenen pH-Werten, untersch. Puffer.....	S. 44
Abb. 3.13	Substratspezifität der Mt1PDH, oxidative Reaktion.....	S. 45
Abb. 3.14	Substratspezifität der Mt1PDH, reduzierende Reaktion.....	S. 45
Abb. 3.15	Substratspezifität Mt1PDH, oxidierend, mit NADP.....	S. 46
Abb. 3.16	Extrapolation nach Hanes zur Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte Mt1PDH A – oxidativer Reaktionsweg, B – reduktiver Reaktionsweg.....	S. 46
Abb. 3.17	Substratspezifität der Mt1Pase.....	S. 47
Abb. 3.18	Substratspezifität der MtDH, oxidative Reaktion.....	S. 48

Abb. 3.19	Substratspezifität der MtDH, reduzierende Reaktion.....	S. 48
Abb. 3.20	Extrapolation nach Hanes zur Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte MtDH A – oxidativer Reaktionsweg, B – reduktiver Reaktionsweg.....	S. 49
Abb. 3.21	Substratspezifität der Hexokinase.....	S. 49
Abb. 3.22	Extrapolation n. Hanes zur Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte HK.....	S. 50
Abb. 3.23	Vorkulturen von <i>Rhodella violacea</i> bei verschiedenen Salzstufen.....	S. 51
Abb. 3.24	Wachstumsraten von <i>Rhodella violacea</i> bei verschiedenen Salinitäten.....	S. 52
Abb. 3.25	Wachstumsraten von <i>Rhodella violacea</i> bei verschiedenen Lichtstufen.....	S. 53
Abb. 3.26	Mannitolgehalte salzadaptierter Kulturen verschiedener Salinitätsstufen.....	S. 54

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Schema der Zusammensetzung der BSA Eichstandards.....	S. 16
Tab. 2.2	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für 12 % SDS-Gele.....	S. 17
Tab. 2.3	Gelzusammensetzungen im nativen Polyacrylamidgel.....	S. 18
Tab. 4.1	Reinigungserfolg der einzelnen Schritte der erarbeiteten Protokolle.....	S. 66
Tab. 4.2	spezifische Enzymaktivität der Mt1PDH in versch. Organismen.....	S. 67
Tab. 4.3	Substrat- und Nucleotidspezifitäten der Enzyme des Mannitolzyklus’ aus <i>Rhodella violacea</i> , <i>D. grisea</i> und <i>C. lepriurii</i>	S. 76
Tab. 4.4	Enzymkinetische Kenngrößen der Enzyme des Mannitolzyklus’ aus <i>Rhodella violacea</i> , <i>D. grisea</i> und <i>C. lepriurii</i>	S. 77
Tab. 4.5	Vergleich der Mt1Pase aus <i>C. lepriurii</i> und <i>C. continua</i>	S. 78
Tab. 4.6	Vergleich der Wachstumsraten von <i>R. violacea</i> und <i>D. grisea</i>	S. 80

Abkürzungsverzeichnis

[S]	Substratkonzentration
2D-PAGE	2-Dimensionale Polyacryl-Amid-Gelelektrophorese
A. dest.	<i>Aqua destillatum</i>
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATPS	<i>Aqueous-Two-Phase-System</i> (wässriges Zweiphasensystem)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
C	Celcius
cDNA	<i>complementary DNA</i>
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EA	Enzymaktivität
EC	<i>Enzyme Class</i> (Enzymklasse)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
evtl.	eventuell
FAB-MS/MS	<i>Fast Atom Bombardment</i> -Tandem-Massenspektroskopie
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$) bzw. Gramm
h	Stunde
HK	Hexokinase
HPLC	<i>High Performance</i> bzw. <i>Pressure Liquid Chromatography</i>
IEX	Ionenaustauschchromatographie
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Konstante
Lsg.	Lösung
m ²	Quadratmeter
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight</i>
MEN	MOPS-EDTA-Natriumacetat Puffer
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
Mt	Mannitol

Mt1P	Mannitol-1-Phosphat
Mt1Pase	Mannitol-1-Phosphat-Phosphatase
Mt1PDH	Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase
MtDH	Mannitoldehydrogenase
MTT	C,N-diphenyl-N'-4,5-dimethyl thiazol-2-yl Tetrazolium Bromid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernresonanzspektroskopie
P	Phosphat
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PFD	Photonenflussdichte
PITC	Phenylisothiocyanat
PMS	Phenazin Methosulphat
PNPP	p-Nitrophenyl Phosphat
PSU	<i>Practical Salinity Units</i>
PVDF	Polyvinylidentifluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase chain reaction</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
sec.	Sekunde
spez.	spezifisch
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA Puffer
TBS	<i>TRIS Buffered Saline</i>
TEMED	N,N,N',N' – Tetramethylethylendiamin
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v_{\max}	halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit
z. B.	zum Beispiel
μ	Wachstumsrate

1. Einleitung

Die ersten Rotalgen traten bereits vor ca. 1,3 bis 1,4 Milliarden Jahren auf (Hori and Osawa, 1987); damit gehören die Rhodophyta zu den erdgeschichtlich ältesten Organismen (Schopf, 1970). Sie haben im Laufe der Zeit nahezu alle Lebensräume der Erde erobert und besiedeln heute auch zum Teil sehr extreme Habitate. So ist beispielsweise die am tiefsten vorkommende, photosynthetisch aktive Makroalge, welche je beschrieben wurde, eine bisher unbenannte, krustenbildende, koralline Rotalge (Littler et al., 1985). Andere Vertreter siedeln in arktischen/antarktischen Gewässern, wo sie einer mehrere Monate andauernden Dunkelheit ausgesetzt sind (Luder et al., 2002) oder in den Tropen im Eulittoral auf den Pneumatophoren von Mangrovenbäumen (siehe Abb. 1.1), wodurch sie unter anderem stark schwankenden Salinitäten und der Gefahr der Austrocknung ausgesetzt sind (Karsten et al., 1995). Gerade für diesen Lebensraum sind die Rhodophyta von enormer ökologischer Bedeutung, da alle in Mangroven dominanten Makroalgen zu den Rotalgen, vornehmlich den Gattungen *Bostrychia*, *Stictosiphonia*, *Catenella* und *Caloglossa* (King and Puttock, 1994) gehören. Sie liegen dort in einer „Bostrychietum“ (nach dem Hauptbestandteil) genannten Assoziation vor (Post, 1964). Aber auch in anderen Habitaten sind Rotalgen ökologisch sehr bedeutsam, z.B. durch ihren Anteil an der Primärproduktion (Martin et al., 2006) oder als Riffbildner (Littler, 1973; Keats et al., 1997).

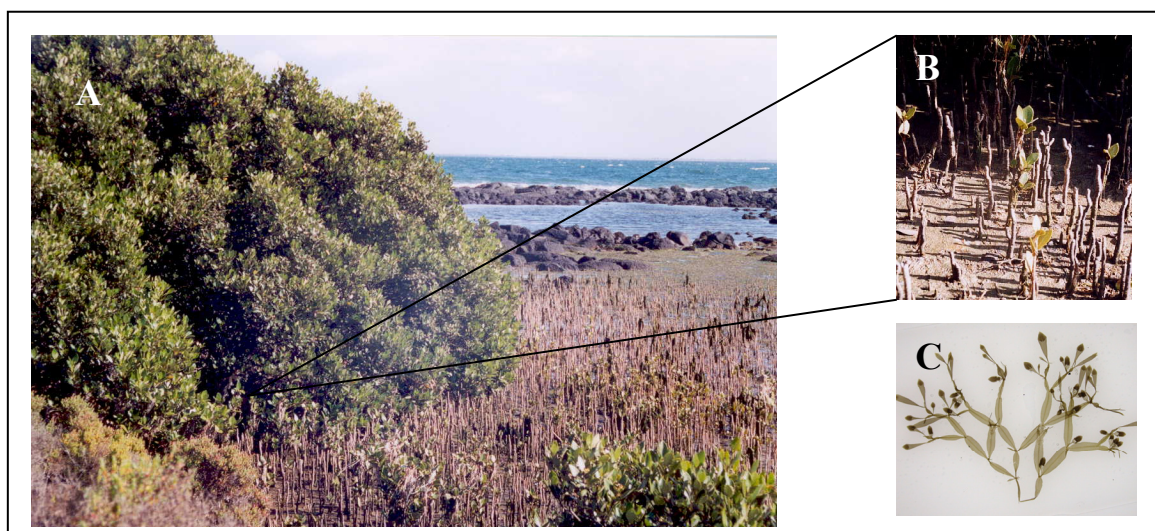


Abb. 1.1: A *Avicennia*-Gebüsch, Jawbone Reserve, Williamstown, Australien
 B Nahaufnahme Luftwurzeln (mit *Caloglossa*-*Bostrychia*-Assoziation)
 C Binokularansicht *Caloglossa leprieurii*, die abgebildete Alge ist ca. 3 cm lang

Rotalgen sind aber auch aus ökonomischer Sicht für den Menschen von großem Wert. *Gracilaria chilensis* und *Sarcothalia crispata* werden zum Beispiel für die industrielle Gewinnung von Agar bzw. Carrageen genutzt (Buschmann et al., 2001). Diese Substanzen haben durch ihre Gelierfähigkeit, ihr Wasserrückhaltevermögen und die Fähigkeit, Emulsionen zu bilden große Bedeutung in verschiedenen Industriezweigen (Chiovitti et al., 2001; Renn, 1997). Aus *Delisea pulchra* gewonnenes Fimbrolid (ein halogeniertes Furanon) erwies sich sowohl als effektiver Bestandteil von Antifouling-Produkten (Kjelleberg and Steinberg, 2001), als auch als mögliches Heilmittel gegen chronische *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen (Smit, 2004). Einige Rhodophyta produzieren antiviral wirksame (Witvrouw et al., 1994) oder zur Tumorbekämpfung geeignete Substanzen (Palermo et al., 1992), während die Makro-Rotalge *Gracilariopsis longissima* als Biofilter für Aquakulturen Verwendung findet (Hernandez et al., 2005). Schliesslich sind verschiedene *Porphyra*-Arten in Form des sogenannten Nori aus der asiatischen Küche nicht mehr wegzudenken.

Die molekulare Systematik und Phylogenie der Rotalgen wird gegenwärtig heiss diskutiert (Saunders and Hommersand, 2004). Aktuelle Forschungen mit umfangreichen Gensequenzanalysen identifizieren sieben Rotalgenklassen: die Florideophyceae und Bangiophyceae als Schwesterngruppen, Rhodellophyceae, Porphyridiophyceae, Stylonematophyceae, Compsopogonophyceae und schliesslich Cyanidiophyceae als älteste eigenständige Rotalgenlinie (Yoon et al., 2006). Damit tritt die traditionelle Sichtweise, nach der Bangiophyceen aufgrund ihres einfachen Baus und Fortpflanzungsmechanismus' als ursprüngliche Klasse der Rhodophyta gelten, aus der sich evolutionär die Florideophyceen entwickelten (Van den Hoek et al., 1995), immer stärker in den Hintergrund.

Aber nicht nur die verwandtschaftlichen Verhältnisse der Rotalgen untereinander sind momentan Gegenstand zahlreicher Forschungen und wissenschaftlicher Diskussionen, sondern auch die Phylogenie zu den anderen Eukaryoten-Linien. Die Nutzung morphologischer und biochemischer Ähnlichkeiten ist dabei bereits an ihre Grenzen gestossen (Brugerolle G. and Taylor, 1977), daher haben auch in diesem Bereich molekularbiologische Untersuchungen immer stärkere Bedeutung (Sogin, 1991). In diesem Zusammenhang hat sich die Erforschung der Evolution der Plastiden (u.a. gekennzeichnet durch mehrere Endosymbiose-Ereignisse) als sehr informativ erwiesen

(Keeling, 2004). Offenbar hat sich die Linie der Rotalgen-Plastiden relativ zeitig in der Evolution von den übrigen Linien getrennt und führt über verschiedene Zwischenstufen u.a. zu den Kryptomonaden, Dinoflagellaten und Apikomplexa (Oliveira and Bhattacharya, 2000). Letztere Gruppe enthält interessanterweise ausschliesslich intrazelluläre Parasiten wie beispielsweise *Plasmodium malariae* (Erreger der Malaria) und *Eimeria tenella* (Mannitolproduzierender Parasit, [Allocco et al., 1999]). In Zukunft könnte die Erforschung der Rotalgen-Plastiden zu neuen Behandlungsmethoden parasitärer Erkrankungen durch den Einsatz von Herbiziden führen (McFadden and Roos, 1999).

Trotz der großen Diversität der Rhodophyta (Ragan et al., 1994; Butterfield, 2000) in Vorkommen und äußerem Erscheinungsbild teilen die Vertreter dieses Stammes (welche größtenteils marin vorkommen) spezifische morphologische Merkmale, die sie von anderen Algen unterscheiden. Einzigartig unter den Eukaryoten ist das Fehlen von Zentriolen und Flagellen bei den vegetativen Zellen, Sporen und Gameten. Hauptspeicherprodukt ist Florideen-Stärke, welche sich (im Gegensatz zu der in Grünalgen vorkommenden Stärke) kaum durch eine Jodprobe mit Lugolscher Lösung anfärben lässt. Typisch ist ausserdem die Bildung proteinhaltiger Tüpfelverschlüsse (*pit plugs*).

Lange Zeit wurde auch die Synthese bestimmter, niedermolekularer Kohlenhydrate als sehr spezifisches Merkmal angesehen, welches sogar für taxonomische Bestimmungen geeignet schien (Hegnauer, 1962; Kremer and Vogl, 1975). Man ging nach zahlreichen Untersuchungen davon aus, dass Arten der Ordnung Ceramiales Digeneasid (2-o-Glycerat-a-D-Mannopyranosid) produzieren, während Vertreter aller anderen Rotalgenordnungen Floridosid (2-O-D-Glycerol- α -D-Galactopyranosid) bzw. Isofloridosid (Ordnung Bangiales) bilden. Diese Substanzen wirken als organische Osmolyte und stabilisieren darüber hinaus Enzyme, Membranen und Makromoleküle bei Salzstress (Bisson and Kirst, 1979; Kirst and Bisson, 1979), ohne die restlichen Stoffwechselprozesse der Zelle zu stören (Hagemann, 1998). Sie werden daher auch als „compatible solutes“, also „Stoffwechselverträgliche Verbindungen“, bezeichnet (Brown and Simpson, 1972).

Besonders bei in extremen Habitaten wie den Mangroven vorkommenden Rotalgen wurden aber nach und nach immer mehr Ausnahmen von dieser Regel entdeckt. *Bostrychia*-Arten nutzen weder Digeneasid noch Floridosid/Isofloridosid, sondern die

Polyole D-Sorbitol und D-Dulcitol als organische Osmolyte (Karsten and Kirst, 1989; Kremer, 1976), während *Stictosiphonia*-Arten nur D-Sorbitol synthetisieren (Karsten et al., 1992b; Karsten et al., 1990).

Für *Caloglossa*-Spezies wurde schliesslich D-Mannitol als Hauptphotosyntheseprodukt nachgewiesen (Karsten et al., 1992a), welches bis dato als *compatible solute* lediglich aus den Phaeophyta bekannt war (Reed et al., 1985). Genauere Untersuchungen ergaben, dass der Mannitolmetabolismus in *Caloglossa* offenbar zyklisch erfolgt und jeweils zwei Enzyme für die Synthese bzw. Degradation notwendig sind (Karsten et al., 1997a). Dabei wird aus dem reduktiven Pentosephosphat-Weg stammendes Dihydroxyacetonphosphat über einen Phosphat-Translokator aus dem Chloroplasten in das Cytoplasma gebracht. Nach der Umsetzung zu Fructose-6-Phosphat (F6P) wird durch das Enzym Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase (Mt1PDH) Mannitol-1-Phosphat (Mt1P) gebildet. Diese Reaktion verläuft bei einem pH-Wert-Wert von 7,0 am optimalsten, während eine Erhöhung auf den pH-Wert 8,5 die Rückreaktion begünstigt. Durch Mannitol-1-Phosphatase (Mt1Pase; optimal bei pH-Wert 7,2) wird dann Mannitol gebildet. Eine Rückbildung über Fructose zu Fructose-6-Phosphat (F6P) kann mit Hilfe der Mannitol-Dehydrogenase (MtDH) und einer unspezifischen Hexokinase (HK) erfolgen (Abb.1.2).

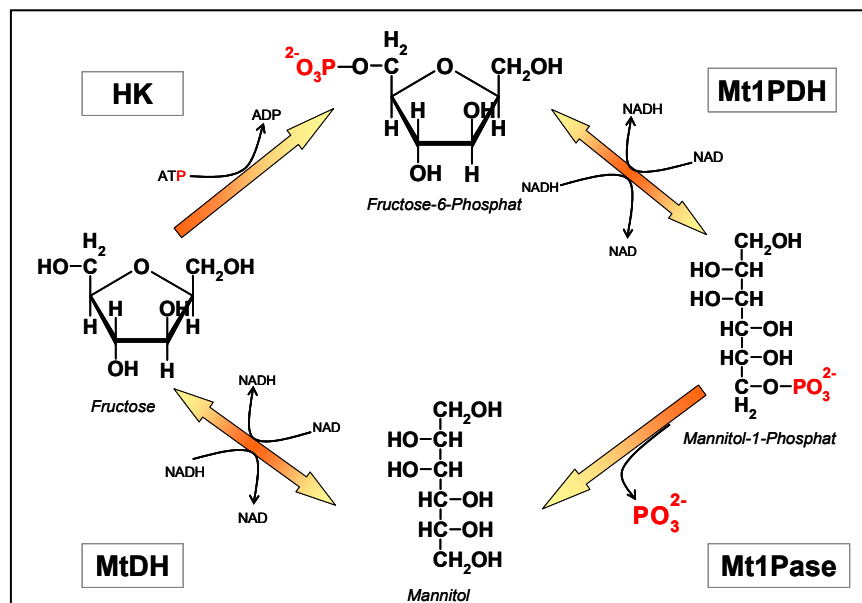


Abb. 1.2: Mannitol Metabolismus in *Caloglossa lepreurii*, verändert nach (Karsten et al., 1997a)
Mt1PDH Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase **Mt1Pase** Mannitol-1-Phosphatase
MtDH Mannitol-Dehydrogenase **HK** Hexokinase

Dieser Mannitolmetabolismus entspricht im Wesentlichen dem für Braunalgen (Ikawa et al., 1972) und Pilzen (Hult and Gatenbeck, 1979) postulierten Stoffwechselweg und galt für einige Jahre als einzigartig unter den Rhodophyta, als besondere Anpassung an den durch abiotische Extreme geprägten Standort Mangrove (Karsten, 1997).

Neben organischen spielen aber auch anorganische Osmolyte in *Caloglossa leprieurii* (Montagne) J. Agardh eine wichtige Rolle im Umgang mit Salzstress (Mostaert et al., 1995). K^+ - und Cl^- -Ionen werden in osmotisch relevanten Mengen in der Zelle akkumuliert, während stoffwechselphysiologisch gesehen nicht inerte Na^+ -Ionen aktiv aus der Zelle transportiert werden. Ausserdem wurde beobachtet, dass eine Plasmolyse durch das extreme Anschwellen der Zellwand verhindert wird; eine bei Rotalgen häufig auftretende Anpassung an zeitweise hypertonische Bedingungen (Fischer, 1984). Offenbar übernimmt die Zellwand für kurzzeitigen Salzstress eine Pufferfunktion, indem sie als Wasserspeicher und Ionentauscher fungiert (Karsten et al., 1997b), bis die etwas langsamer ablaufende Stressbewältigung über den Mannitolgehalt greift.

Bei umfangreichen Untersuchungen zum Verteilungsmuster niedermolekularer Kohlenhydrate in Bangiophyceen mit Hilfe von ^{13}C -NMR (Nukleare Magnetische Resonanzspektroskopie) entdeckte man dann 1999 schliesslich, dass auch in den Vertretern der als eher ursprünglich angesehenen Gattungen *Rhodella* (Abb. 1.3) und *Dixoniella* (Abb. 1.4) ausschliesslich Mannitol vorkommt (Karsten et al., 1999; Karsten et al., 2003).

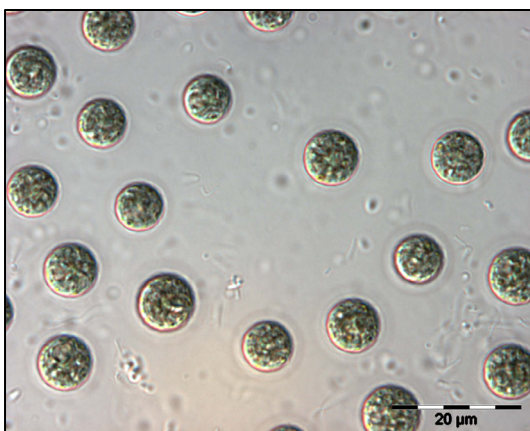


Abb. 1.3: *Rhodella violacea*, Stamm 3621, Sammlung der Universität Rostock

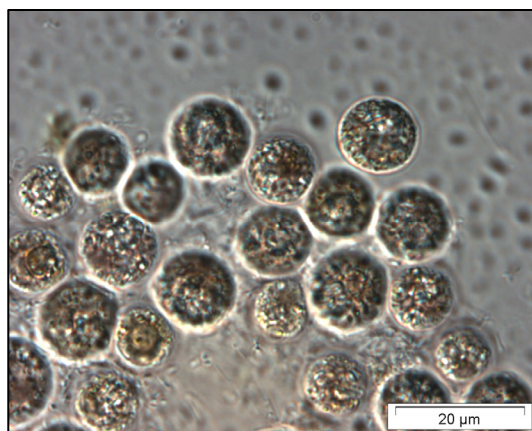


Abb. 1.4: *Dixoniella grisea*, Stamm 3620, Sammlung der Universität Rostock

Dadurch ergeben sich einige Fragen nach der Evolution dieses Stoffwechselweges in den Rhodophyta:

1. Ist die Entwicklung in den verschiedenen Gattungen konvergent erfolgt, also jeweils unabhängig voneinander? Für die Lactat-Dehydrogenase von *Trichomonas vaginalis* wurde eine solche konvergente Enzymentwicklung beispielsweise bereits beschrieben (Gang et al., 1999).
2. War dieser Metabolismus ursprünglich in allen Rotalgen ausgeprägt und wurde später in Habitaten mit moderaten Umweltbedingungen und geringen Amplituden in den abiotischen Faktoren zugunsten energetisch günstigerer organischer Osmolyte verdrängt; konnte sich also nur in Rhodophyta extremer Standorte halten? Ähnliches wird auch für die Expression verschiedener sekundärer Metabolite in Pflanzen diskutiert (Wink, 2003).
3. Erfolgte eine Weitergabe aller für diesen Metabolismus benötigten Gensequenzen durch lateralen Gentransfer von einem anderen Ursprungsorganismus in die Rhodophyta?

Man weiss bereits, dass Gruppe I Introns des Gens der kleinen Untereinheit der rRNA aus *Hildenbrandia rubra* (Sommerf., Menegh) homolog zu Introns aus Pilzen sind (Müller et al., 2005); die Weitergabe dieser Sequenzen erfolgte vermutlich durch Viren-vermittelten Gentransfer von Pilzen auf die Rotalgen. Ein lateraler Gentransfer auch anderer Sequenzen ist daher denkbar. Eine weitere Möglichkeit wäre der Gentransfer über Plasmide und Phagen, wie er für zwischen Bakterien der Ostsee bekannt ist (Leitet et al., 2006).

Ziele der Arbeit

Um mit der Aufklärung/Beantwortung der oben genannten Unklarheiten zu beginnen ergaben sich in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen bzw. Aufgabenstellungen:

A Die Ermittlung der Gensequenz eines am Metabolismus beteiligten Enzyms, der Mt1PDH, auf zwei verschiedenen Wegen, um Gensonden für die Überprüfung anderer Rhodophyta auf das Vorhandensein der Mannitolgene ableiten zu können.

- 1 biochemisch: durch Aufreinigung des Enzyms, um über die Aminosäuresequenz die Gensequenz zu ermitteln
- 2 molekularbiologisch: durch Ableiten degenerierter Primer und anschliessender PCR einen Teil der Gensequenz fischen und davon ausgehend das komplette Gen sequenzieren

B Die Klärung der Frage: Ist der Mannitolstoffwechsel in den Bangiophyceen *Rhodella violacea* und *Dixoniella grisea* mit dem bereits für *Caloglossa leprieurii* (Florideophyceae) beschriebenen Zyklus vergleichbar (gleiche enzymatische Ausstattung und wenn ja, ähnliche biochemische Kenngrößen)?

Sollte der Metabolismus über die gleichen Enzyme ablaufen, dann:

C Die ökophysiologische Charakterisierung von *Rhodella violacea* und *Dixoniella grisea*, um beide Algen als Modellsysteme für molekularbiologische Untersuchungen (v.a. der am Mannitolstoffwechsel beteiligten Gene) zu etablieren.

2. Material und Methoden

Alle für Puffer und Lösungen verwendeten Grundchemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, analysenrein von folgenden Firmen bezogen:

Difco, Detroit

Roth, Kandel

Serva, Heidelberg

Sigma, Deisenhofen

2.1 Algenkultivierung und Probennahme von Frischmaterial

Die Kultivierung der Algen erfolgte in Habitatwasser der Nord- bzw. Ostsee. Dieses wurde mittels Meersalz „Sel marin hw *professional*“ der Wiegand GmbH (Krefeld) bzw. aqua bidest. auf die gewünschte Salinität eingestellt. Anschliessend erfolgte eine Sterilfiltration über eine Filtrationsanlage der Firma Sartorius, bestehend aus je einer Filtrationseinheit Sartobran P mit einer Porengröße von $0,65 + 0,45 \mu\text{m}$ bzw. $0,45 + 0,2 \mu\text{m}$; angetrieben von einer peristaltischen Schlauchpumpe (Magna Multifix).

Das Algenmaterial von *Caloglossa leprieurii* wurde größtenteils aus der Kultur 3267 der Sammlung von Prof. Dr. John West der University of Melbourne, basierend auf Sammlungen von Frischmaterial in der Gegend von St. Lucia, Natal, South Africa, angezogen. Die Algen wurden bei Raumtemperatur und einer Photonenflussdichte (PFD) von ca. $22 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in verschlossenen 500 ml-Kolben bei ständiger Begasung mit mehrfach gefilterter Raumluft kultiviert (Abb. 2.1).

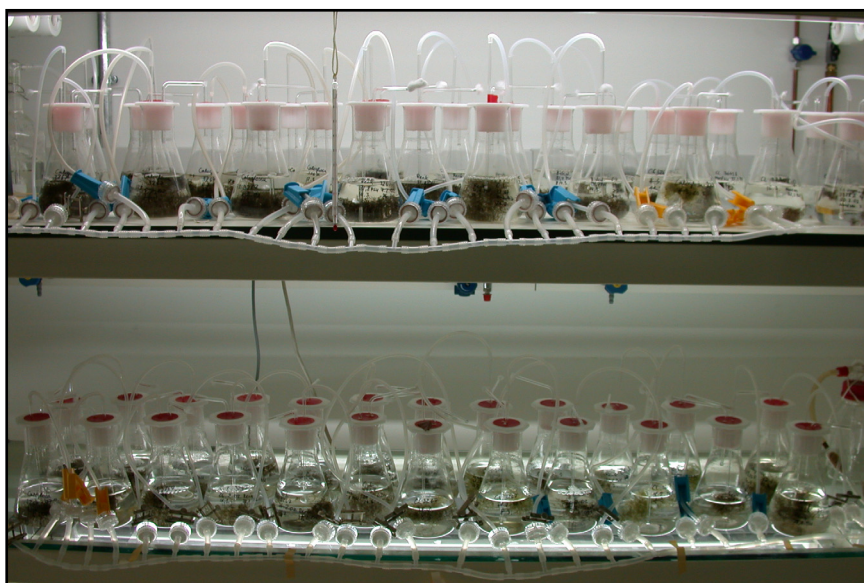


Abb. 2.1: Kulturkolben für Biomasseproduktion von Makrorotalge *Caloglossa leprieurii*, mit mehrfach gefilterter Raumluft begast

Für die Extraktion der Mt1PDH (Methode 2.2.1) wurde überwiegend gefriergetrocknetes Feldmaterial von einer steinernen Flußeinfassung am Stony Creek Backwash, Williamstown, Australien eingesetzt (Abb. 2.2 und 2.3); für die RNA-Extraktion (Methode 2.3.1) wurde Frischmaterial des gleichen Probenahmeortes genutzt.



Abb. 2.2: Stony Creek Backwash, Williamstown, Hauptprobenahmeort für *C. lepriurii* in Australien

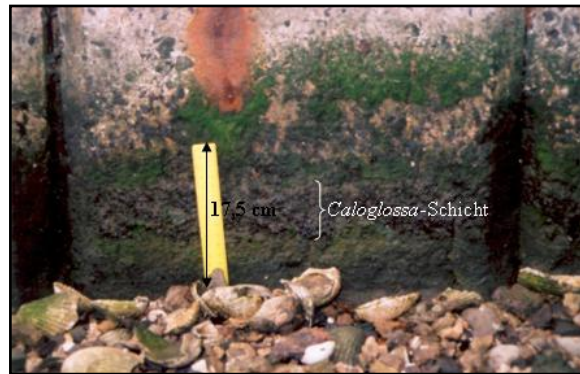


Abb. 2.3: *Caloglossa*-Schicht am Probenahmeort, das abgebildete Lineal hat eine Länge von 17,5 cm, *C. lepriurii* lag hier in Monokultur und nicht im *Bostrychietum* vor

Rhodella violacea wurde aus der Kultur 2427 und *Dixoniella grisea* aus Kultur 2320 der UTEX Culture Collection der Universität von Texas in Austin wie oben für *Caloglossa lepriurii* beschrieben angezogen. Die Kulturproben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. John West zur Verfügung gestellt.

2.2 Extraktion/Charakterisierung Enzyme des Mannitolmetabolismus

2.2.1 Enzymextraktion

Die Extraktion erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von (Karsten *et al.*, 1997).

Das gefriergetrocknete Algenmaterial wurde mittels Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C ausgeführt.

Nach wenigen Minuten Antauens wurde eiskalter Extraktionspuffer (50 mM MOPS, pH 7,4; 2 mM EDTA- Na_2 Salz; 5 mM MgCl_2 ; 3 mM DTT; 13 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 20 % (w/v) Glycerol) im Verhältnis Algenpulver : Puffer = 1 : 10 zugegeben. Anschliessend wurde je 10 ml Extraktionspuffer jeweils 1 g Amberlite XAD-4 bzw. Polyclar AT zugesetzt. Der

Extrakt wurde nun für 10-15 min in einem Becherglas auf Eis gerührt. Danach erfolgte für 15 min eine Zentrifugation bei 4 °C mit 20 000 g (Zentrifugation immer unter diesen Bedingungen, soweit nicht anders angegeben). Zum Zentrifugationsüberstand wurde schrittweise $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugeben (vorher mit Mörser pulverisiert), bis 25 % Sättigung erreicht wurden. Der Extrakt wurde für 20 min im Eisbad gerührt. Nach erneuter Zentrifugation wurde zum Überstand schrittweise $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer Sättigung von 85 % gegeben, der Extrakt anschliessend wieder für 20 min gerührt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das resultierende Pellet in 50 mM MOPS Puffer resuspendiert und für Enzymaktivitätsbestimmungen (Methode 2.2.2) verwendet. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach Methode 2.3.3.

Polyclar AT wurde wie folgt vorbehandelt: 10 g Polyclar AT wurden für 10 min unter dem Abzug in 10 % HCL gekocht, anschliessend mit A. dest. gewaschen, bis ein pH-Wert von 7 erreicht war und das Wasser durch ein gleiches Volumen an 50 mM MOPS Puffer ersetzt.

Amberlite XAD-4 wurde nach folgendem Protokoll vorbehandelt: Amberlite XAD-4 Perlen wurden mehrfach mit A. dest., dann 1x mit 1 N NaOH waschen und anschliessend wieder mit A. dest. gewaschen. Die Lagerung erfolgte in A. dest.

2.2.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Der molekulare Wirkungsmechanismus von Enzymen beruht im Wesentlichen auf der Bildung eines Komplexes zwischen Enzym und Substrat, welcher durch Bildung einer spezifischen Mikroumgebung für die Verminderung der Aktivierungsenergie verantwortlich ist (Pauling, 1948). Nach einer gewissen Reaktionszeit wird der Komplex unter Freisetzung des Reaktionsproduktes und des ursprünglichen Enzyms wieder zersetzt, welches dann erneut zur Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes genutzt werden kann (Michaelis and Menten, 1913). Nach dieser Beschreibung der Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen berechnet sich die Reaktionsgeschwindigkeit v aus:

$$v = \frac{V_{\max} * [S]}{K_M + [S]}$$

Dabei ist V_{\max} die Maximalgeschwindigkeit bei Sättigung des Enzyms mit Substrat, $[S]$ ist die Substratkonzentration und K_m ist die Michaelis-Konstante oder Dissoziationskonstante des Komplexes (ist die Substratkonzentration, bei der die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird). Die Ausgangsgleichung wird oft durch verschiedene graphische Extrapolationsverfahren (Linearisierung) umgeformt, um eine korrektere Bestimmung der K_m - und V_{\max} -Werte zu ermöglichen. Die Methode von Lineweaver und Burke ist zur graphischen Darstellung der erhobenen Daten zwar gut geeignet (weil für das menschliche Auge leicht erfassbar und interpretierbar), zur korrekten Ermittlung der K_m - und V_{\max} -Werte aber generell nicht empfehlenswert, da kleine Fehler in der Bestimmung der Geschwindigkeit v bei kleinen Substratkonzentrationen $[S]$ eine große Abweichung in $1/v$ ergeben; diese Unsicherheit haben die Autoren bei der Veröffentlichung der Methode ausdrücklich erwähnt (Lineweaver and Burk, 1932).

Die Linearisierungsmethode nach Hanes (Hanes, 1932) gilt allgemein als am zuverlässigsten für die Bestimmung der K_m - und V_{\max} -Werte und wurde daher in der vorliegenden Arbeit für die Bestimmung dieser Parameter genutzt. Dabei wird der Wert der Substratkonzentration durch die Reaktionsgeschwindigkeit ($[S]/v$) auf der y-Achse gegen die Substratkonzentration auf der x-Achse aufgetragen (Abb. 2.4). Der Schnittpunkt mit der x-Achse ergibt den $-K_m$ -Wert; die Geschwindigkeit kann aus dem Anstieg errechnet werden, da der Anstieg das Reziproke der Geschwindigkeit ist ($1/v$).

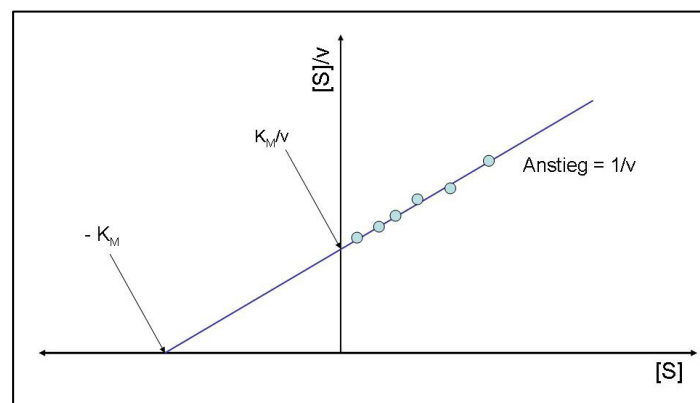


Abb. 2.4: Linearisierung enzymkinetischer Daten nach Hanes; $[S]$ ist die Substratkonzentration, v ist die Reaktionsgeschwindigkeit, der K_m -Wert kann direkt vom Schnittpunkt mit der x-Achse abgelesen werden, V_{\max} errechnet man aus dem Anstieg der Geraden

Die Messung der Reaktionen erfolgte (soweit nicht anders angegeben) in 1 ml Quarzküvetten an einem Spektralphotometer UV – 2401 PC der Firma Shimadzu nach einer Inkubationszeit von 2 min bei 30 °C und einer Wellenlänge von 340 nm. Zur konstanten Temperierung wurde ein Kühlgerät Thermo Haake K 10 an das Photometer angeschlossen. Die Datenauswertung erfolgte computergestützt mit Hilfe der UV Probe Software der Firma Shimadzu. Für die Versuche zur pH-Abhängigkeit der Enzyme wurden drei verschiedene Puffer (MOPS: pH-Wert 6,0 – 8,0; TRIS: 8,0 – 9,0 und CAPSO: 9,0 – 10,3) mit einander überlappenden Wirkungsbereichen verwendet, um den pH-Bereich von 6,0 bis 10,3 abzudecken. Dabei ergaben sich mit TRIS immer leicht niedrigere Werte als bei Verwendung der beiden anderen Puffer. Die Datenauswertung erfolgte mithilfe der UV-Probe Software (Version 2.00) der Firma Shimadzu und Excel.

2.2.2.1 Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase (Mt1PDH) EC 1.1.1.17

Für die Charakterisierung der Reduktionsreaktion von Fruktose-6-Phosphat (F6P) wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert: 150 mM PIPES/NaOH Puffer (pH-Wert 7,5), 0,45 mM NADH bzw. NADPH, 5-50 µl Enzymextrakt, aufgefüllt auf 900 µl mit A. dest. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 50 mM F6P oder eines anderen Substrats gestartet.

Die Oxidation von Mannitol-1-Phosphat (Mt1P) wurde mit folgendem Reaktionsansatz bestimmt: 100 mM TRIS/HCl (pH-Wert 8,5), 0,9 mM NAD bzw. NADP, 5-50 µl Proteinextrakt, aufgefüllt mit A. dest. auf 960 µl. Durch Zugabe von 40 µl 25 mM Mt1P oder eines alternativen Substrats wurde die Reaktion gestartet. Das hierfür verwendete Mt1P wurde als Bariumsalz von der Firma Sigma bezogen und das Barium vor Versuchsbeginn mittels K_2SO_4 nach Wolff und Kaplan (1955) ausgefällt, da Barium die Nachweisreaktion stört.

2.2.2.2 Mannitoldehydrogenase (MtDH) EC 1.1.1.67

Die Oxidation von Mannitol zu Fruktose wurde mit nachfolgendem Reaktionsansatz gemessen: 150 mM CAPSO Puffer (pH-Wert 9,5), 1,5 mM NAD bzw. NADP, 5-50 µl Enzymextrakt, aufgefüllt auf 900 µl mit A. dest. Der Reaktionsbeginn erfolgte durch Zugabe von 100 µl 100 mM Mannitol oder eines anderen Substrats.

Die Reduktionsreaktion wurde mit folgendem Reaktionsansatz überprüft: 100 mM MOPS Puffer (pH-Wert 7,0), 0,15 mM NADH bzw. NADPH, 50-100 µl Enzymextrakt,

aufgefüllt auf 900 µl mit A. dest. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 1M Fruktose oder eines alternativen Substrats gestartet.

2.2.2.3 Hexokinase (HK) EC 2.7.1.1

Die Messung erfolgte in einem gekoppelten Reaktionssystem, in welchem das durch die Hexokinase unter ATP-Verbrauch freigesetzte Fruktose-6-Phosphat (F6P) über die Phosphoglucose-Isomerase in Glukose-6-Phosphat (G6P) umgesetzt wird, das dann unter meßbarem NADP-Verbrauch durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase umgesetzt wird. Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert: 50 mM Tris/HCl (pH-Wert 7,5), 2,5 mM MgCl₂, 2,4 mM ATP, 0,9 mM NADP, 5,51 nkat Phosphoglucoseisomerase, 4,51 nkat Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 50-100 µl Enzymextrakt, aufgefüllt auf 950 µl mit A. dest. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 µl 1 M Fruktose bzw. eines alternativen Substrates.

2.2.2.4 Mannitol-1-Phosphatase (Mt1Pase) EC 3.1.3.22

Zur Bestimmung der Phosphatase-Aktivität wurde folgender Testansatz in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert: 100 mM Tris/HCl (pH-Wert 7,5), 5 mM MgCl₂, 1,5 mM Mt1P (Barium wurde vorher ausgefällt, siehe Methode 2.1.2.1), 5-100 µl Enzymextrakt, aufgefüllt auf 500 µl mit A. dest. Nach fünfminütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 0,2 N NaOH gestoppt. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden 300 µl des Überstandes einer Phosphatbestimmung nach Gerlach und Deutike (1963) unterzogen. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 820 nm.

2.3 Extraktion/Charakterisierung Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii*

2.3.1 Enzymextraktion

Die Extraktion erfolgte nach einer Kombination modifizierter Protokolle von Karsten *et al.* (1997) und Iwamoto *et al.* (2003).

Das gefriergetrocknete Algenmaterial wurde mittels Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C ausgeführt.

Nach wenigen Minuten Antauens wurde eiskalter Extraktionspuffer (siehe Methode 2.2.1) im Verhältnis Algenpulver : Puffer = 1 : 10 zugegeben. Anschliessend wurde je 10 ml Extraktionspuffer jeweils 1 g Amberlite XAD-4 bzw. Polyclar AT (vorbehandelt wie unter 2.2.1 angegeben) zugesetzt. Der Extrakt wurde nun für 10-15 min in einem Becherglas auf Eis gerührt. Danach erfolgte für 15 min eine Zentrifugation bei 4 °C mit 20 000 g (Zentrifugation immer unter diesen Bedingungen, soweit nicht anders angegeben). Volumen und Proteingehalt der Überstandes (Methode 2.3.3) wurden bestimmt und für spätere Untersuchungen eine Proteinprobe (5-10 µg Protein) mit ½ VT 3x Laemmli-puffer (3 ml 0,5 M Tris/HCl pH-Wert 6,8; 2,4 ml Glycerol; 1,2 ml 2-Mercaptoethanol; 1,2 ml 1 % Bromphenolblau (in A. dest. gelöst); 480 mg SDS; 0,2 ml H₂O) versetzt, 10 min bei 95 °C inkubiert und bei 4 °C gelagert. Zum verbliebenen Zentrifugationsüberstand wurde 50 %ige (wt/vol) PEG 6000 Lösung zugegeben, bis eine Konzentration von 15 % (wt/vol) erreicht war, anschliessend wurde der Lösung noch schrittweise (NH₄)₂SO₄ zugeben (vorher mit Mörser pulverisiert), bis 25 % Sättigung erreicht wurden. Der Extrakt wurde für 20 min im Eisbad gerührt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere der nun deutlich ausgeprägten Phasen verworfen. Zur unteren Phase wurde nach Volumenbestimmung schrittweise (NH₄)₂SO₄ bis zu einer Sättigung von 55 % gegeben, der Extrakt anschliessend wieder für 20 min gerührt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das resultierende Pellet in 50 mM MOPS Puffer resuspendiert und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert (Pellet 1). Zum Zentrifugationsüberstand wurde schrittweise (NH₄)₂SO₄ bis zur Sättigung von 85 % gegeben und 20 min gerührt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 50 mM MOPS Puffer resuspendiert (Pellet 2). Die Extrakte waren für 1-3 Tage bei 4°C lagerbar.

2.3.2 Enzymreinigung

Die Aufreinigung der Mt1PDH erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Iwamoto *et al.* (2001).

Der nach Methode 2.2.1 gewonnene Proteinextrakt wurde mittels einer Spritze über HiTrap Desalting - Säulchen von Amersham mit 5 ml Bettvolumen entsalzen und dabei auf 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 umgepuffert. Bei Probenvolumen > 5 ml erfolgte vorher eine Aufkonzentrierung mittels AMICON-Zelle und einer Ultrafiltrationsmembran YM 10 (Ausschlussgröße 10 kDa). Vor dem nächsten Aufreinigungsschritt wurden Volumen und Proteingehalt (Methode 2.3.3) bestimmt und für spätere Analysen eine Proteinprobe wie

unter 2.3.1 beschrieben entnommen. Der verbleibende Proteinextrakt wurde auf schwerkraftbetriebene Reactive Red 120 Agarose Säulchen (2,5 ml) der Firma Sigma-Aldrich (äquibriert mit 10 mM Tris/HCl; pH 7,4) überführt. Die Elution der Mt1PDH erfolgte durch 0,1 mM NADH-Lösung in Äquibrierungspuffer. Die Fraktionsgröße betrug 0,5 ml; aktive Fraktionen wurden vereinigt (Aktivitätsbestimmung nach Methode 2.2.2.1), deren Volumen und Proteingehalt bestimmt und eine Proteinprobe entnommen. Anschliessend erfolgte eine erneute Umpufferung über HiTrap Desalting – Säulchen auf 50 mM MOPS Puffer (pH 7,4) bevor die Extrakte auf eine Ionenaustauschersäule (HiTrap DEAE FF 1 ml Säulchen von Amersham; nach mitgelieferter Anleitung gewaschen und äquibriert) gegeben wurden. Die Proteinelution erfolgte durch einen kontinuierlichen KCl-Gradienten von 0 – 2 M in 50 mM MOPS Puffer, der Gradient wurde für 20 min gefahren, die Fraktionsgröße betrug 0,5 ml. Aktive Proben wurden wieder vereinigt, der Proteingehalt bestimmt und nach Entnahme einer Proteinprobe bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Ionenaustauschchromatographie wurde eine FPLC-Anlage der Firma Amersham genutzt, bestehend aus folgenden Komponenten: Kontrolleinheit Programmer GP 250 Plus, 2 Pumpen P-500, Monitor UV-M 2 mit Durchflußküvette (2 Filter, 254 und 280 nm), Injektionsventil mit 1 ml Probenschleife, Schreiber REC 102, Fraktionssammler Frac-100.

2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford mit dem Bio-Rad Protein Assay Kit

Zuerst wurde die Färbelösung 1 + 4 mit H₂O verdünnt. Der Proteinstandard lag bereits fertig verdünnt nach Herstellerangaben vor (Konzentration Albumin: 1,44 mg/ml). Für die Eichkurve wurden dieser Stammlösung 347,2 µl entnommen und mit H₂O auf ein Volumen von 500 µl gebracht. Von dieser Lösung ausgehend wurde die einzelnen Standards der Eichkurve pipettiert (Tab. 2.1). Zur Erstellung der Eichkurve wurden die 20 µl jedes Standards jeweils mit 1 ml der Färbelösung versetzt und am Spektralphotometer (siehe Methode 2.2.2) vermessen. Als Blindwert diente eine Probe, die neben 1 ml Nachweisreagenz 20 µl H₂O enthält.

Tab. 2.1: Schema der Zusammensetzung der einzelnen Eichstandards, die rechte Spalte gibt den resultierenden Gesamtgehalt des jeweiligen Standards an BSA in μg an

μl Stammlösung	μl H_2O	μg BSA
15,0	5,0	15,0
12,0	8,0	12,0
10,0	10,0	10,0
8,0	12,0	8,0
5,0	15,0	5,0
2,0	18,0	2,0

Die Proben wurden vorsichtig gemischt (um Bläschenbildung zu vermeiden) und die Absorption bei 595 nm gemessen. Für jeden Standard wurden 3 Parallelmessungen durchgeführt. Bei späteren Messungen wurden 3 der Standards einmal gemessen und mit den im Computer gespeicherten Werten abgeglichen. Für die Messung der extrahierten Proteinproben wurde der Probenextrakt in 1 ml Nachweisreagenz eingesetzt.

2.3.4 Denaturierende Proteinelektrophorese im SDS-Gel

Die SDS-PAGE wurde in einem diskontinuierlichen System durchgeführt. Dabei war die vertikale Gelmatrix in zwei Bereiche eingeteilt: ein Sammel- und darunter ein Trenngel, die sich in Gelporengröße, Ionenstärke und pH-Wert voneinander unterschieden. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 mA in 12 % Trenngelen unter denaturierenden Bedingungen. Dies wurde v.a. durch die Zugabe von SDS erreicht, welches verschiedene Modifikationen verursacht: 1. Die Eigenladung der Polypeptide wird vollständig überdeckt; alle Partikel sind jetzt negativ geladen. 2. Intramolekulare Wasserstoffbrücken werden gespalten. 3. Die Aggregatbildung von Proteinen wird verhindert. Als Ergebnis entstehen ellipsoide Protein-SDS-Mizellen, bei denen die negative Nettoladung proportional zur Länge des Moleküls ist (Lottspeich and Zorbas, 1998). Die Trennung erfolgt daher ausschließlich nach der Molekülgröße, da alle anderen, für die Wanderungsgeschwindigkeit maßgeblichen Moleküleigenschaften beiseite bzw. überlagert werden.

Alle Gele wurden mittels einer Mini-Protean II-Kammer bzw. einer Protean II-Kammer der Firma Bio-Rad gegossen. Dabei wurde zuerst das Trenngel hergestellt und zum

Auspolymerisieren bei Raumtemperatur mit A. dest. überschichtet. Anschliessend wurde das Wasser durch Dekantieren wieder entfernt und das Sammelgel gegossen. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel wird aus Tabelle 2.2 ersichtlich.

Tab. 2.2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für 12 % SDS-Gele

	Trenngel	Sammelgel
Monomer Konz.	12 %	6 %
Acrylamid Stamm-Lsg.: Acrylamid/Bis 37,5:1 Mischung der Firma Bio-Rad	40,0 ml	1,3 ml
A. dest.	33,5 ml	6,1 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	25,0 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	2,5 ml
10 % SDS	1,0 ml	100 µl
Ammoniumpersulfat: 100 mg AP in 1 ml H ₂ O	500 µl	50 µl
TEMED	50 µl	10 µl

Als Laufpuffer wurde 1x Elektrodenpuffer (5x Elektrodenpuffer: 15 g Tris, 72 g Glycin, 5 g SDS auf 1 l A. dest.) verwendet, als Probenpuffer 1x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970), die Stromversorgung erfolgte über einen Power Pac 300 der Firma BioRad. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.5 Native Elektrophorese im Polyacrylamidgel

Die Proteintrennung funktioniert bei dieser Methode nach dem gleichen Prinzip, wie die denaturierende Elektrophorese im SDS-Gel (Methode 2.3.4), allerdings wird bei der nativen Trennung weder den Polyacrylamidgelen (Gelzusammensetzung: Tab. 2.3), noch dem Laufpuffer SDS zugesetzt.

Tab. 2.3: Gelzusammensetzung von nativen Polyacrylamidgelen

	Trenngel	Sammelgel
Monomer Konz.	12 %	6 %
Acrylamid Stamm-Lsg.: Acrylamid/Bis 37,5:1 Mischung der Firma Bio-Rad	15,0 ml	1,3 ml
A. dest.	28 ml	6,1 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	0,9 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	2,5 ml
87 % (g/v) Glycerin	0,9 ml	-
Ammoniumpersulfat: 100 mg AP in 1 ml H ₂ O	50 µl	50 µl
TEMED	21 µl	10 µl

Der Probenpuffer setzte sich wie folgt zusammen: 15 ml Glycerol; 18,75 ml 0,5 M Tris/HCl (pH-Wert 6,8) auf 50 ml mit A. dest. aufgefüllt. Als Laufpuffer wurde 1x Elektrodenpuffer (10x Stammlösung: 30 g Tris, 142 g Glycin, auf 1 l A. dest.) verwendet, die Stromversorgung erfolgte über einen Power Pac 300 der Firma BioRad. Die Elektrophorese erfolgte in einem Kühlraum bei 4 °C.

2.3.6 Native Elektrophorese im Stärkegel

Das Trägermaterial bei dieser Elektrophorese ist chemisch und elektroosmotisch inerte Stärke. Dieses Trennungsverfahren ist nativ und aufgrund der Proteinfreundlichen Eigenschaften der Stärke gut für Enzymuntersuchungen geeignet.

2.3.6.1 Pufferzusammensetzungen

Bei dieser Methode fanden drei unterschiedliche Puffer für die Herstellung von Gelen mit unterschiedlichen pH-Werten Verwendung, zur Proteinstabilisierung wurden EDTA und MgCl₂ wie angegeben zugesetzt.

Puffer A: Amin-Citrat-Puffer, pH-Wert 6,1; mit N-(3-aminopropyl)morpholin eingestellt
11,2 g Citrat Monohydrat
4,96 g EDTA
5,79 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
auf 2000 ml A. dest

Dieses Puffersystem ist eine durch Zugabe von EDTA und $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ modifizierte, 66,6 %ige Verdünnung eines 1972 veröffentlichten Puffers (Clayton and Tretiak, 1972).

Puffer B: Tris-Citrat-Puffer, pH-Wert 7,0; mit NaOH eingestellt
32,78 g Tris
18,91 g Citrat
0,89 g EDTA
5,79 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
auf 2000 ml A. dest

Das ursprüngliche Puffersystem (Avisé *et al.*, 1975) wurde durch die Zugabe von MgCl_2 verändert.

Puffer C: Tris-Citrat-Puffer, pH-Wert 8,0; mit NaOH eingestellt
32,80 g Tris
13,44 g Citrat
2,38 g EDTA
0,0032 M $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
auf 2000 ml A. dest

Die originale Pufferzusammensetzung (Shaw and Prasard, 1970) wurde durch Zugabe von EDTA und MgCl_2 abgewandelt.

2.3.6.2 Methode

Das Stärkegel wurde wie folgt angesetzt: 65 g handelsübliche Stärke der Firma Sigma wurden in 500 ml Gelpuffer (bestehend aus jeweils 25 ml Elektrodenpuffer auf 500 ml A. dest.) unter beständigem Rühren für mindestens 25-30 min aufgekocht, bis die Lösung durch den Gelierungsprozess glasig wurde. Nach Erreichen einer gleichmäßig transparenten Konsistenz wurde die Stärkelösung auf einer Glasplatte in einen Kautschukrahmen der Firma Desaga gegossen (Maße des Gels: 24,5 x 18,0 x 1,0 cm) und

mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur belassen bzw. im Kühlschrank vortemperierte. Die Applikation der Proteine erfolgte durch in der Probe getränkte Filterkartonstreifen FILTRAK No. 8, welche in einem zuvor mit einem Skalpell gezogenem Gel-Einschnitt ca. 7 cm von der kathodischen Gelseite entfernt platziert wurden. Um die Lauffront verfolgen zu können, wurde den Proteinproben 0,1 % Bromphenolblau zugesetzt. Der Gellauf (Abb. 2.5) erfolgte bei einer Temperatur von 4 °C und einer Stromstärke von anfangs 40 mA, was nach dem Entfernen der Probenplättchen nach ca. 30 min auf 60 mA erhöht wurde.

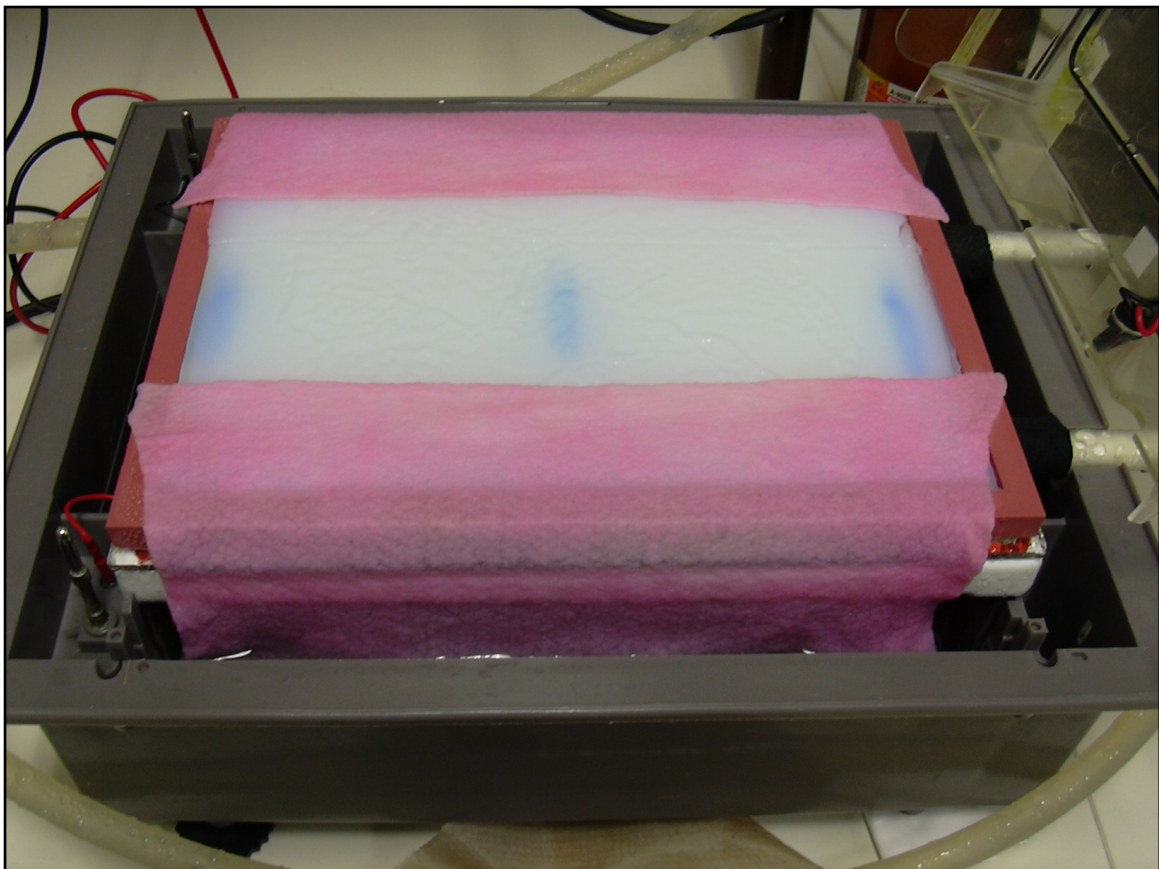


Abb. 2.5: Versuchsaufbau native Elektrophorese im Stärkegel: die Abbildung zeigt das 11,5 % Gel auf dem Träger nach dem Gellauf, die blauen Linien im Gel werden durch der Probe zugesetztes Bromphenolblau verursacht und zeigen die Lauffront an; die pinkfarbenen Tücher sind in Puffer getränkt worden und bilden die Ionenbrücke für die Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden Horizontalelektrophoresekkammern (Pharmacia-LKB-Multiphor II) genutzt, die an einen Umlaufkühler (Haake-Kryo-Thermat 350) angeschlossen wurden, was die Temperierung bei 4 °C ermöglicht hat. Als Spannungsquelle diente ein Netzgerät der Firma Consort (Typ E 443).

Nach dem Gellauf wurde das Stärkegel mittels Draht in bis zu 5 ca 1,5 mm starke Schichten zerteilt, die für Färbungen mittels MTT (Methode 2.3.7) verwendet wurden. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Videosystem der Firma Desaga.

2.3.6.3 Gelverdauer nach der Elektrophorese

Nach erfolgter Proteinelektrophorese und Anfärbung der Mt1PDH-Banden (Methode 2.3.6) wurden für einige Untersuchungen mehrere Banden mit einem scharfen Skalpell ausgeschnitten und die Gelstückchen mittels eines Turrax mechanisch homogenisiert. Davon wurden 80 µl Probe entnommen und in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 140 µl Citratpuffer (3,45 g Citrat; 5,5 g tri-Natriumcitrat x 5,5 H₂O in 75 ml A. dest, pH-Wert mit NaOH auf 4,6 einstellen, mit A. dest. auf 100 ml auffüllen) und 40 µl Amyloglucosidase versetzt. Nach 45-60 minütiger Inkubation bei 55°C unter gelegentlichem Schütteln wurde die Probe mit Lämmli-puffer versetzt und in einer denaturierenden SDS-Gelelektrophorese (Methode 2.3.4) aufgetrennt.

2.3.7 MTT(C,N-diphenyl-N'-4,5-dimethyl thiazol-2-yl Tetrazolium Bromid)-Färbung

Die Anfärbung des nativen Enzyms Mt1PDH erfolgte mit Hilfe der MTT/PMS-Färbung. Dieses Nachweisprinzip wird oft für Dehydrogenasen genutzt (Cedillo-Rivera *et al.*, 1992) - die ihre Substrate unter Nutzung von NAD bzw. NADP oxidieren - da es eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet und gleichzeitig sensitiv genug ist, um Messungen von physiologischen Substratkonzentrationen zu ermöglichen (Koopdonk-Kool and Van Noorden, 1995). Bei Zugabe des gelblichen Tetrazoliumsalzes MTT als Elektronenakzeptor wird dieses durch NADH (welches durch die enzymatische Aktivität der Mt1PDH gebildet wurde) zu einem wasserunlöslichen, blau oder rot gefärbten Formazan reduziert (Bank *et al.*, 1991); PMS dient dabei als Elektronenüberträger (Pacaud-Mercier *et al.*, 2007).

Für die MTT-Färbung wurde folgender Färbepuffer (Endvolumen 25 ml) jeweils frisch angesetzt: 0,6057 g TRIS, mit HCl auf pH-Wert 8,0 eingestellt; 5 mg MTT (bei Umwandlung des Tetrazoliumsalzes zu Formazan erfolgt Farbumschlag von gelb zu blau/braun); 10 mg NAD (Nicotin-Adenin-Dinucleotid), 0,3 ml Mt1P (Stammlsg.: 125 mM); 0,5 ml MgCl₂ (Stammlsg.: 250 mM); einige Körnchen PMS (Phenazin Methosulphat). Die Inkubation erfolgte für ca. 20 min bei 37°C in einer Färbeschale.

2.3.8 Coomassie-Färbung

Nach ca. 30-minütiger Inkubation in Coomassie-Färbelösung (200 mg Coomassie Brilliant Blau G-250 in 200 ml Entfärber-Lösung) wurde das Gel bzw. die Blot-Membran mit Entfärberlösung (500 ml H₂O, 400 ml Methanol, 100 ml Essigsäure) gewaschen, bis der gewünschte Grad der Entfärbung erreicht wurde.

2.3.9 Silberfärbung

2.3.9.1. Lösungen

<i>Fixierer:</i>	50 ml Ethanol, 12 ml Essigsäure, 100 µl Formaldehyd (37 % v/v) mit A. dest. auf 100 ml
<i>Ethanol 50 %:</i>	521 ml EtOH ; 479 ml A. dest.
<i>Thiosulfat-Lsg.:</i>	0,2 g Na ₂ S ₂ O ₃ * 5 H ₂ O auf 1000 ml A. dest.
<i>1 M Eisessig:</i>	5,72 ml Essigsäure mit A. dest. auf 100 ml
<i>Stopp-Lsg.:</i>	18,6 g EDTA-Na Salz mit A. dest. auf 1000 ml ; pH-Wert mit NaOH auf 7-8
<i>Imprägnier-Lsg.:</i>	0,1 g AgNO ₃ ; 37,5 µl Formaldehyd (37 % v/v) ; mit A. dest. auf 50 ml
<i>Entwickler-Lsg.:</i>	3 g Na ₂ CO ₃ ; 25 µl Formaldehyd (37 % v/v) ; 1 ml Thiosulfat-Lsg. ; mit A. dest. auf 50 ml

2.3.9.2 Methode

Das SDS-Gel wurde nach der Gelelektrophorese für 1-24 h in Fixierer inkubiert. Anschliessend folgten 3 jeweils zweiminütige Spülungen mit 50 % Ethanol. Danach wurde das Gel für exakt 1 min in Thiosulfat-Lsg. inkubiert, um danach 3x für jeweils 20 sec. mit A. dest. gespült zu werden. Dann wurde das Gel für 20 min imprägniert. Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe der Entwickler-Lsg. Nach Erreichen der gewünschten Bandenstärke wurde das Gel kurz in Wasser gespült und die Reaktion durch mindestens 10 minütige Inkubation in Stopp-Lsg. unterbrochen. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt und die Gele anschliessend auf einem Gel Trockner konserviert.

2.3.10 Western Blot

Es wurde ein LKB Nova Blot (Semi-dry Elektrobloetter) der Firma Pharmacia verwendet. Die Anodenplatte wurde auf einem ebenen Untergrund platziert und mit A. dest. angefeuchtet. Für den Blotaufbau wurden 2-3 in 1x Transferpuffer (10x Stammlsg.: 390 mM Glycin, 480 mM TRIS, 0,37 % SDS; vor Gebrauch: 100 ml 10x Transferpuffer, 700 ml H₂O, 200 ml Methanol) getränkte Filterpapierstücke von der Größe des Gels und der Membran aufgelegt. Die ebenfalls mit Puffer befeuchtete Membran wurde mit einer Pinzette luftblasenfrei auf dieses Filterpapier gebracht. Nach dem Auseinanderbau der Elektrophoresekammer (Methode 2.3.4) wurde das Sammelgel entfernt, das Trenngel kurz in Transferpuffer inkubiert und luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Zum Schluss wurden erneut 2-3 in Puffer getränkte Filterpapierstücke über den Blot gedeckt. Abschließend wurde die Kathodenplatte aufgelegt.

Beide Platten wurden mit dem Stromversorger (Power Pac 300 der Firma BioRad) verbunden. Pro cm² Gel wurde eine Stromstärke von 0,8 mA angelegt. Der Blot wurde bei kleinen Gelen (Mini-Protean II) nach einer Stunde abgebaut, bei größeren Gelen (Protean II) nach 2 Stunden. Die Membran wurde nach dem Blot kurz in TBS gewaschen. Das Blotergebnis (Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran) wurde durch eine Coomassie-Färbung (Methode 2.3.9) sowohl des geblotteten Gels, als auch der Membran überprüft.

2.3.11 Serologischer Nachweis der Mt1PDH

Die Membran mit dem transferierten Protein wurde nach dem Blot (Methode 2.3.10) kurz in 1x TBS (10x Stammlösung: 20mM TRIS, 137 mM NaCl; pH-Wert 7,6) gespült und anschliessend zur Absättigung der noch freien Proteinbindungsorte auf der Membran für 1 Stunde in TBST-Lösung (10 % Tween 20 in 1x TBS) mit 4% Magermilchpulver inkubiert. Folgende Schritte schlossen sich an: Inkubation mit dem durch Kaninchenimmunisierung erhaltenen, Mt1PDH-spezifischen Antikörper in der Verdünnung 1:2000 (1 Stunde bei Raumtemperatur), Waschen der Membran mit TBST, Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper in der Verdünnung 1:5000 (Anti-Kaninchen mit Alkalischer Phosphatase der Firma Sigma-

Aldrich). Mit Hilfe der NBT/BCIP-Färbung (Methode 2.3.12) wurde die Membran danach entwickelt.

Der Anti-Mt1PDH (*Eimeria tenella*) Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. John J. Allocco (Department of Parasite Biochemistry and Cell Biology, Merck and Co., Rahway, New Jersey) zur Verfügung gestellt.

2.3.12 NBT(Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)/BCIP(5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat)-Färbung

Diese Färbemethode beruht auf dem gleichen Prinzip, wie die MTT/PMS-Färbung (2.3.7). Nach kurzer Inkubation in Färbepuffer (5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl; pH-Wert 9,5) erfolgte die Entwicklung der geblotteten Membran für 5-10 Minuten (je nach gewünschter Intensität) durch Inkubation in Färbelösung (30 ml Färbepuffer, 100 µl BCIP-Stammlösung [50 mg BCIP in 1 ml 100 % DMF], 200 µl NBT-Stammlösung [50 mg NBT in 1 ml 70 % DMF]). Abschliessend wurde die Membran kurz in A. dest. gespült und luftgetrocknet.

2.3.13 Ausfällung extrazellulärer Polysaccharide durch Metallsalze

Dem Proteinrohextrakt (siehe Methode 2.3.1) wurden Metallsalzlösungen (CaN₂O₆, MgSO₄) zugesetzt, bis eine Endkonzentration von 0,2 M; 0,4 M; 1 M oder 1,5 M erreicht wurde. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben für 5 min bei 20 000 G zentrifugiert, der Überstand über Sephadex G-25 Superfine-Säulchen (Kit der Firma Amersham) mit 50 mM MOPS-Puffer nach Vorschrift entsalzen und auf Aktivität von Mt1PDH hin untersucht (Methode 2.2.2.1).

2.4 Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung der Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii*

2.4.1 Isolation von RNA aus *Caloglossa leprieurii*

Die Extraktion aus frisch gesammeltem Algenmaterial (Probenahmeort beschrieben unter 2.1) wurde nach Su and Gibor (1988) durchgeführt.

2.4.2 Auftrennung von RNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Die Auftrennung der isolierten RNA erfolgte in 1,2 % Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen. Als Laufpuffer diente 1x MEN Puffer (10x Stammlösung: 10,3 g MOPS in 200 ml 0,1 M Natriumacetat, 5 ml 0,5M EDTA , pH-Wert 7,0, mit A. dest auf 250 ml). Die Proben wurden vor dem Gellauf wie folgt vorbereitet: 2,5-5 µg RNA wurden mit A. dest auf ein Volumen von 8 µl gebracht; anschliessend wurden 2 µl 10x MEN-Puffer, 2,4 µl Formaldehyd (37 %), 8 µl Formamid (100 %) sowie 3 µl EtBr/Stopp Prämix (17,5 µl Stopp-Lösung, 2,5 µl Ethidiumbromid) zugegeben. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben 20 min bei 65 °C und anschließend sofort 5 min auf Eis inkubiert.

2.4.3 cDNA-Synthese

Durch Gelabschätzung ermitteltes RNA Volumen, 1,0 µl Oligo (dT)-Primer (500 µg/ml) und 1,0 µl 10 mM dNTP-Mix (10 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP) wurden mit sterilem H₂O auf ein Volumen von 13 µl gebracht. Nach gründlichem Durchmischen wurde der Ansatz für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Danach wurden 4,0 µl 5x Erststrangpuffer und 2,0 µl 0,1 M DTT (Dithiothreitol)-Lösung in das Reaktionsgefäß pipettiert, vorsichtig gemischt und 2 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde durch Zugabe von 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase komplettiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15-minütige Inkubation bei 70 °C abgestoppt. Nach kurzer Zentrifugation (1 min mit 20 000 g) wurde die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.4 DNA-Amplifikation mittels PCR (*polymerase chain reaction*)

2.4.4.1 PCR-Ansätze

Alle PCR Ansätze wurden auf Eis gekühlt nach folgendem Schema pipettiert: 5 µl 10x Puffer (200 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,4; 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂) , 5 µl dNTP (2,5 mM), 1 µl Primer 1 (12 pmol/µl; sense; Oligonucleotid), 1 µl Primer 2 (12 pmol/µl; antisense; Oligonucleotid), 1 µl DNA bzw. cDNA, 37 µl H₂O, 0,05 µl Taq-Polymerase. Es wurden verschiedene PCR-Programme verwendet, deren Ablauf wie folgt aussah:

RT PCR (reverse transcription PCR)

- Denaturierung : 30 sec. bei 94 °C
- Annealing : 30 sec. bei 58 °C
- Elongation : 1,5 min bei 72 °C
- Endelongation : 2 min bei 72 °C
- Zyklenzahl: 35

NL58Shor

- Denaturierung : 1 min bei 94 °C
- Annealing: 1 min bei 58 °C
- Elongation: 1,5 min bei 72 °C
- Endelongation: 4 min bei 72 °C
- Zyklenzahl: 35

2.4.4.2 Oligonucleotide

Alle für diese Arbeit verwendeten Oligonucleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die Lieferung erfolgte im lyophilisierten Zustand. Nach Herstellerangaben wurde den Oligonucleotiden UV-sterilisiertes A. dest. zugegeben. Die Konzentration der Stammlösung betrug jeweils 100 pmol/μl. Die Oligonucleotide wurden als Start-Fragmente (= Primer) für die DNA-Synthese mittels PCR verwendet.

Oligonucleotidsequenzen:

<i>Kirsten1</i> (forward primer 1):	5'- GGNACYATBCGGTCAAC - 3'
<i>Kirsten2</i> (forward primer 2):	5'- TCHATBACCCATTC - 3'
<i>Kirsten3</i> (forward primer 3):	5'- GTYAATAACTTNCGTTC - 3'
<i>Kirsten4</i> (forward primer 4):	5'- GTYAABAGCTTNCTTTC - 3'
<i>Kirsten5</i> (reverse primer 1):	5'- CATTTTGGHGCWGGWAATAT - 3'
<i>Kirsten6</i> (reverse primer 2):	5'- CARTTTGGHGGWGGAAATAT - 3'
<i>Kirsten7</i> (forward primer control):	5'- TCCACAGCCTGGTGTTGACCCTAT - 3'
<i>Kirsten8</i> (reverse primer control):	5'- TCTTCCATTGTAGCAGCTGTCACG - 3'

Für die verschiedenen Primerkombinationen wurden aufgrund von Sequenzvergleichen folgende Fragmentgrößen erwartet:

Primer 1 + 5/6	≈ 485 bp
Primer 3/4 + 5/6	≈ 655 bp
Primer 2 + 5/6	≈ 561 bp
Primer 7 + 8	= 615 bp.

2.4.5 Isolation von DNA aus *Caloglossa leprieurii*

Die DNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll von Wattier *et al.* (2000).

2.4.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Zur Überprüfung von PCR Ergebnissen (Methode 2.4.4) und DNA-Isolation (Methode 2.4.5) wurde der Ansatz gelelektrophoretisch in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Laufpuffer (1x TAE; Stammlsg. 50x TAE-Puffer: 242 g TRIS; 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA; pH-Wert 8,0; autoklaviert) gegossen und mit Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml A. dest) im Verhältnis 1:10 000 versetzt. Dieser Farbstoff bindet an die DNA und kann mittels UV-Licht zum Leuchten gebracht werden. Dadurch wird die DNA auf einem Transilluminator sichtbar und kann fotodokumentarisch festgehalten werden. Für die Stromversorgung wurde ein Power Pac 300 der Firma BioRad genutzt. Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 2 µl Stopp-Lsg. (10 mM TRIS, pH-Wert 7,5; 1 mM EDTA; 0,2 % Bromphenolblau; 30 % Glycerin) versetzt.

2.4.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Nach Gelelektrophorese bzw. nach PCR notwendige Aufreinigungen von DNA-Fragmenten wurden mit einem High Pure PCR Product Purification Kit von Roche Diagnostics nach dem beigefügten Protokoll durchgeführt.

2.4.8 DNA-Isolation aus *Escherichia coli*

Um Genmaterial für die PCR-Gegenkontrolle mit *E. coli* zu erhalten wurde eine Kolonie des Stammes XL Blue 1 mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit 50 µl A. dest. überführt, 5 min bei 100 °C inkubiert und jeweils 1 µl davon als Template eingesetzt.

2.5 Ökophysiologische Charakterisierung von *Rhodella violacea*

2.5.1 Bestimmung des Mannitolgehaltes verschiedener Kulturen

2.5.1.1 Polyolextraktion

Ca. 10 mg Algenbiomasse (homogenisiert) wurden in Eppendorfreaktionsgefäß mit Schraubverschluss eingewiegen, mit 1 ml 70 % EtOH versetzt und nach kurzem Vortexen 3 Stunden bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt für 10 min bei 8000 g zentrifugiert, 800 µl des Überstandes in neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und in einer Speed Vac von SAVANT Instruments Inc. (Modell RH 40-10; gekoppelt an eine Lyovac GT 2 Gefriertrocknungsanlage sowie eine Pumpe vom Typ PK 8 D der Firma ILMVAC GmbH) eingeengt. Das resultierende Pellet wurde in 800 µl A. dest. gelöst, kurz anzentrifugiert und der Überstand in HPLC-Probengefäße überführt. Die Bestimmung des Mannitolgehaltes der Lösung erfolgte nach Methode 2.5.1.2.

2.5.1.2 HPLC (High Pressure Liquid Chromatographie) zur Bestimmung des Mannitolgehaltes

Für die Analysen wurde eine HPLC-Anlage der Firma HP Agilent bestehend aus: Vakuum-Entgaser, binärer Pumpe, Autosampler und Wellenlängendetektor verwendet. Die Auftrennung erfolgte über eine BioRad-Säule (HPLC Fast Carbohydrate Analysis Column – HPAP; 100 x 7,8 mm) mit Vorsäule (Carbo-Pb 2⁺), äquiliert mit dem Eluenten A. dest. bei 70 °C Säulentemperatur. Bei jedem Lauf wurden Mannitol- bzw. Polyolstandards verschiedener Konzentration mitgeführt, um die in der Probe enthaltene Mannitolmenge nach Integration der Chromatogrammdaten über Verhältnisgleichungen zu bestimmen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Chemstation Software von Hewlett Packard.

2.5.2 Bestimmung der Wachstumsraten μ

Die Bestimmung der Wachstumsraten erfolgte durch *in-vivo*-Wachstumsmessung mit einem Hansatech MFMS Fluorimeter (Norfolk, UK) wie bei (Karsten *et al.*, 1996) beschrieben (Abb. 2.5).

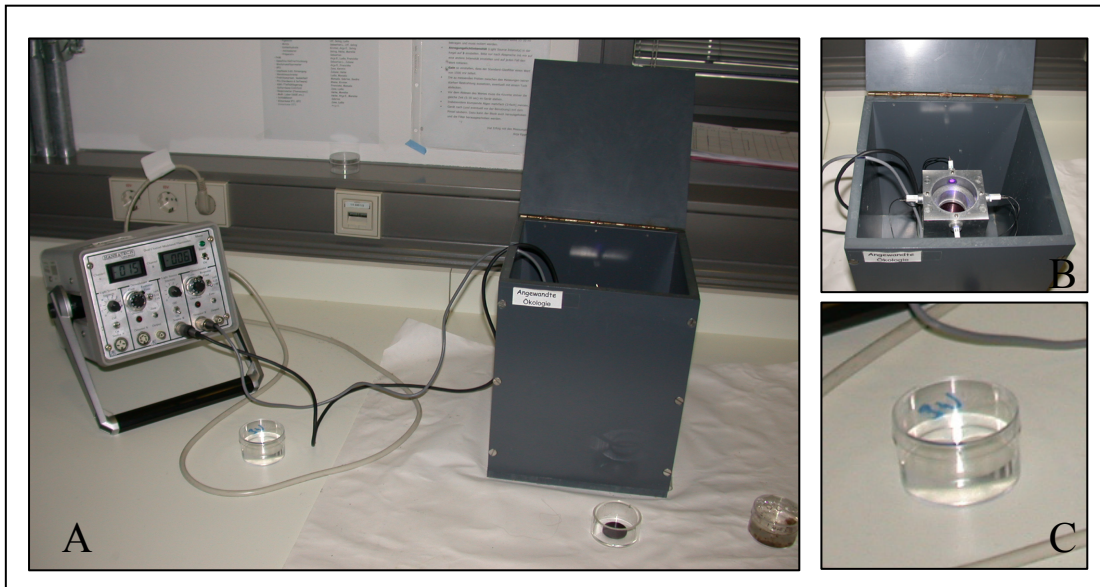


Abb. 2.5: A Wachstumsfluorimeter mit Meßeinheit
 B Innenansicht Fluorimeter mit Halterung für Kleinfeldküvette und 4 Leuchtdioden
 C mediumgefüllte Kleinfeldküvette (Blindwert)

Die Anzucht der Algen erfolgte in Kleinfeldküvetten (Ø 5 cm) mit 30 ml Medium und einem variablen Inokulumvolumen, welches jeweils so gewählt wurde, dass die Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz nach Animpfung der Kulturen über 50 mV (Differenz zwischen Meßwert und Blindwert) lag. Die Messungen erfolgten im 24h-Rhythmus. Pro Versuchsansatz wurden jeweils fünf Parallelen gemessen, aus welchen die Wachstumsrate durch iterative Optimierung (Excel) der exponentiellen Wachstumsfolge

$$\mu = (\ln F_t - \ln F_0) * t^{-1}$$

berechnet wurde (μ = Wachstumsrate pro Tag [d^{-1}]; F_t = Fluoreszenz nach t Tagen; F_0 = Fluoreszenz am Ausgangstag). Der Mittelwert dieser Wachstumsraten wurde bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1. Isolation und Charakterisierung der Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii*

Zu Beginn der Arbeiten war lediglich bekannt, dass sich die Mt1PDH durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat aus Proteinrohextrakten anreichern lässt (Karsten *et al.*, 1997b). Ausgehend von diesem Wissen wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Proteinreinigungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit für die Isolation dieses Enzyms getestet. Ziel der Untersuchungen war es, ein Aufreinigungsprotokoll für die Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* zu erarbeiten und anschliessend auf dessen Grundlage ausreichend gereinigtes Enzym für eine biochemische Charakterisierung sowie für die Ermittlung der Aminosäuresequenz (und letztlich der korrespondierenden Gensequenz) zu erhalten.

3.1.1 Aufreinigung des Proteins

3.1.1.1 Native Elektrophorese im Stärkegel und anschliessende Proteinelution

Zunächst wurde die Möglichkeit der Auftrennung und Isolation aus einem nativen 11,5 % Stärkegel überprüft (Methode 2.3.6). Die Auftrennung des Proteins wurde bei den pH-Werten 6,1; 7,0 und 8,0 durchgeführt. Diese pH-Werte haben sich hauptsächlich bei der Auftrennung von Dehydrogenasen bewährt (Shaw and Prasad, 1970). Der Nachweis des Proteins erfolgt bei dieser Methode nicht über einen mitgeführten Proteinstandard, sondern über eine anschliessende Färbung (Smithies, 1955), welche für die Mt1PDH mittels MTT/PMS (Methode 2.3.6) erfolgte (Abb. 3.1).

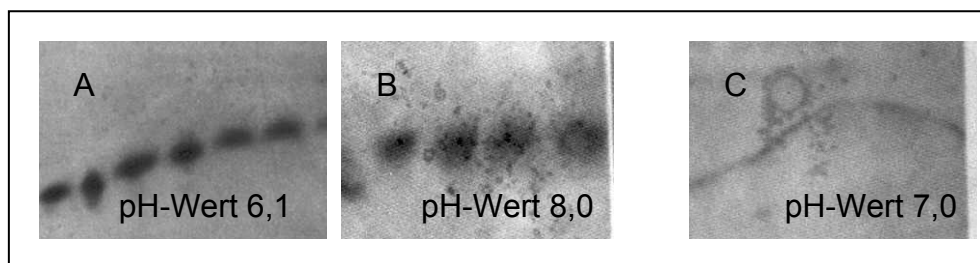


Abb.3.1: Proteinspots der Mt1PDH: Proben angereinigt durch Fällung mit 55 % Ammoniumsulfat, nach Elektrophorese im 11,5 % Stärkegel bei verschiedenen pH-Werten und anschliessender Anfärbung mit MTT/PMS; A – pH-Wert 6,1; B – pH-Wert 8,0; C – pH-Wert 7,0; die Verzerrung in der Lauffront wird durch die unterschiedlichen Ammoniumsulfatgehalte der aufgetragenen Proben (ein oder mehrere Proben getränkte Filterpapierplättchen wurden appliziert) verursacht

Für die pH-Werte 6,1 und 8,0 konnte das Enzym nachgewiesen werden, wobei die Proteinspots bei pH 6,1 deutlicher schärfer abgegrenzt waren. Die Auftrennung bei einem pH-Wert von 7,0 blieb ergebnislos. Die jeweils einzelnen Enzymspots in jeder Spur legen die Vermutung nahe, dass die Mt1PDH in *Caloglossa leprieurii* mit nur einem Isoenzym vertreten ist.

Anschliessend wurde die Möglichkeit der Elution der Mt1PDH aus dem Stärkegel überprüft. Die dafür notwendige mechanische Gelhomogenisation konnte weder durch Zugabe von Steatit-Kügelchen und Vortexen, noch durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und Pulverisierung mittels Mörser und Pistill erreicht werden. Die Homogenisation mit Hilfe eines Turrax der Firma IKA war dagegen erfolgreich. Eine anknüpfende Extraktion des Enzyms aus dem Homogenat wurde auf verschiedenen Wegen versucht:

1. die Lösung wurde zentrifugiert und nach dem Aktivitätsnachweis der Mt1PDH im Überstand (Methode 2.2.2.1) einer Extraktion laut Protokoll (Methode 2.2.1) unterzogen. In den resultierenden Fraktionen konnte keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden.
2. Der ausgeschnittene Gelbereich mit der Mt1PDH wurde auf ein SDS-Gel (Methode 2.3.4) mit großer Geltasche für den Probenaufrag aufgelegt und eine Elektrophorese gefahren. Bei der anschliessenden Gelfärbung konnten keine Proteinbanden detektiert werden, da das Stärkegel offenbar die Poren des Polyacrylamidgeles blockiert hat (Abb. 3.2; Probenspur 1).
3. Der ausgeschnittene Gelbereich mit der Mt1PDH wurde einem Verdau unterzogen, um die störende Stärke abzubauen (Methode 2.3.6.3). Danach konnten zwar Proteinbanden im SDS-Gel sichtbar gemacht werden (Abb. 3.2, Probenspur 2), jedoch war keine Mt1PDH-Aktivität mehr nachweisbar (Methode 2.2.2.1).

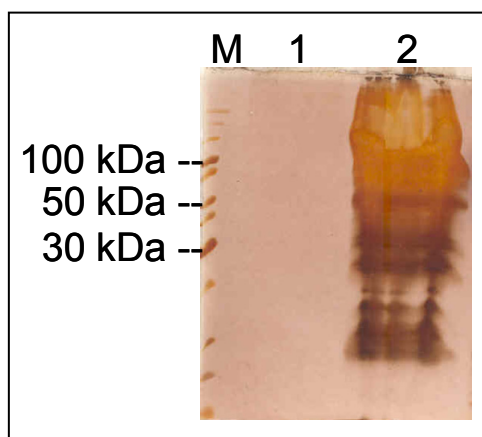


Abb. 3.2: silbergefärbtes SDS-Gel mit Probenelution Mt1PDH aus 11,5 % Stärkegel
 M = Molekulargewichtsmarker
 1 = Spur mit aufgelegtem Stärkegel mit Mt1PDH
 2 = Spur mit eluierter Probe aus Stärkegel nach Verdau

Die native Elektrophorese im Stärkegel und anschliessend die Identifizierung der Mt1PDH waren also erfolgreich; allerdings konnte das Enzym nachfolgend für weitere Untersuchungen nicht aus dem Gel eluiert werden.

3.1.1.2 Ausfällung von Polysacchariden durch Metallsalze

Es ist bekannt, dass Algenpolysaccharide durch den Gehalt an Uronsäuren und/oder Sulfatgruppen eine stark negative Ladung haben, welche ihre spezifischen physikochemischen Eigenschaften, beispielsweise die hohe Gelierfähigkeit, bedingen. Der Zusatz mehrwertiger Kationen, wie Ca^{2+} , bewirkt eine Gelbildung durch Änderung der Konformation der Polymere (Alban and Blaschek, 2007). Daher wurde getestet, ob eine Entfernung der bei der Extraktion ebenfalls freiwerdenden Polysaccharide mittels Ausfällung durch Metallsalze (Methode 2.3.13) möglich ist. Dies erwies sich allerdings als erfolglos: nach erfolgter Zentrifugation war im verbleibenden Überstand kein aktives Protein mehr nachweisbar (Methode 2.2.2.1).

3.1.1.3 Ausfällung von Polysacchariden durch Polyethylenglycol

Für die Aufreinigung bzw. Anreicherung von Proteinen hat sich vielfach der Einsatz von Polyethylenglycol (PEG) in Kombination mit einem Salz in einem wässrigen 2-Phasen-System (ATPS = Aqueous two-phase-system) bewährt (Chen, 1992; Iwamoto et al., 2001). Es wurde überprüft, ob diese Methode auch für die Aufreinigung der Mt1PDH anwendbar ist. Dafür wurde dem Proteinrohextrakt 15 % (wt/vol) PEG 6000 sowie schrittweise $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einem Sättigungsgrad von 25 % zugegeben. Nach der Zentrifugation verblieben die störenden extrazellulären Polysaccharide in der sehr viskosen oberen Phase, während sich die Mt1PDH in der unteren, wässrigen Phase anreicherte (Abb. 3.3). Die Aufkonzentrierung mittels ATPS war somit erfolgreich und wurde in das endgültige Aufreinigungsprotokoll (3.1.1.6) übernommen.



Abb. 3.3: Proteinrohextrakt aus *Caloglossa leprieurii* nach Zugabe von 15 % (w/t) PEG und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit 25 % Sättigung, zentrifugiert: obere Phase enthält extrazelluläre Schleime, untere Phase enthält die Mt1PDH

3.1.1.4 Proteinisolation mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography): Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie (siehe Methode 2.3.2) wurden zuerst Säulchen mit einer Cibacron Blue F3GA-Matrix (Firma BioRad) getestet, da dieses Material durch seine Sekundärstruktur sehr gut für die Aufreinigung von Dehydrogenasen und anderen Nucleotidabhängigen Enzymen geeignet ist (Thompson et al., 1975). Im resultierenden Eluat konnte aber in mehreren Testläufen keine Mt1PDH-Aktivität nachgewiesen werden (Methode 2.2.2.1).

Anschliessend wurden schwerkraftbetriebene Säulchen mit Reactive Red 120 Agarose (Firma Sigma-Aldrich) als Matrix getestet (Methode 2.3.2). Dieser Farbstoff eignet sich gut für Chromatographien mit Hydrogenasen (Watson et al., 1978; Schneider et al., 1983) und wurde bereits erfolgreich für die Aufreinigung der Mt1PDH aus *Caloglossa continua* (Okamura) King et Puttock (Iwamoto et al., 2003) eingesetzt. Reactive Red 120 Agarose erwies sich auch für die Reinigung der Mt1PDH aus *C. leprieurii* als sehr geeignet: zwei Fraktionen des Eluats zeigten hohe Enzymaktivitäten. Die Affinitätschromatographie mittels Reactive Red 120 Agarose wurde daher als Reinigungsschritt an die Ausfällung mit Ammoniumsulfat/PEG angeschlossen.

3.1.1.5 Proteinisolation mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography): Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie mittels FPLC (siehe Methode 2.3.2) wurde als weiterer möglicher Reinigungsschritt überprüft. Hierfür wurden Q Sepharose XL (starker Anionenaustauscher) sowie DEAE FF (schwacher Anionenaustauscher) getestet. Beide Materialien lieferten während der Elution einen deutlichen Proteinpeak (Abb. 3.4) und erwiesen sich als geeignet: die jeweils bei einer KCl-Konzentration von 0,8 M bis 1,0 M eluierten Fraktionen zeigten deutliche Aktivitäten der Mt1PDH.

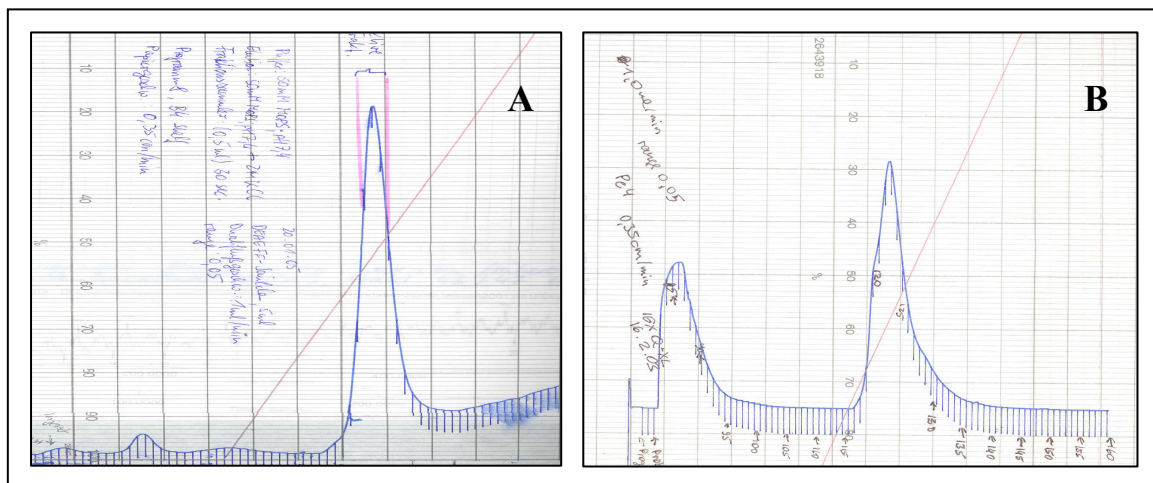


Abb. 3.4: Chromatogramme der IEX mit verschiedenen Säulenmatrices: **A** – mit DEAE FF, Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; **B** – mit Q Sepharose XL, Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; die Elution der Mt1PDH erfolgte in beiden Fällen zwischen 0,8 M und 1,0 M KCl

3.1.1.6 Aufreinigungsprotokoll

Die Kombination aller Vorversuche mit den Protokollen von Iwamoto *et al.*, (2001) sowie von Karsten *et al.*, (1997a) ergab das unter Methode 2.3.1 beschriebene Aufreinigungsprotokoll für die Mt1PDH (Fließ-Schema: Abb. 3.5). Dabei wurde nach der Fällung mit Ammoniumsulfat und PEG für die weitere Aufreinigung das resultierende Pellet nach Zugabe von 55% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ genutzt (Pellet 1). Die nach diesem Schritt notwendige Aufkonzentrierung der Probe wurde mit Hilfe einer Amiconzelle und einer YM 10-Membran (Ausschluss-Größe 10 kDa) erreicht. Ebenfalls getestete Zentrifugenröhrchen mit eingesetzter Proteinmembran („Centricon“-System der Firma Amicon; Ausschlußgröße der Membran: 10 kDa bzw. 30 kDa) erwiesen sich aufgrund des großen zeitlichen Aufwandes als ungeeignet, da sich das aufgetragene Probenvolumen trotz mehrstündiger Zentrifugation nur unwesentlich verringerte, während die Einengung über eine Amiconzelle stets in weniger als einer Stunde beendet war. Für die Entsalzung bzw. Umpufferung der Proben zwischen den einzelnen Reinigungsschritten hat sich die Nutzung von Sephadex G-25 Säulchen (betrieben über eine 25 ml-Spritze) als äußerst geeignet erwiesen. Die Affinitätschromatographie wurde mit Reactive Red 120 Agarose durchgeführt; anschliessend wurden bei einer Fraktionsgröße von 0,5 ml die Fraktionen 4 und 5 (also die Milliliter 1,5 bis 2,0 und 2,0 bis 2,5 des Durchflusses nach Zugabe des Eluenten) für die Ionenaustauschchromatographie weiter verwendet. Diese wurde mit

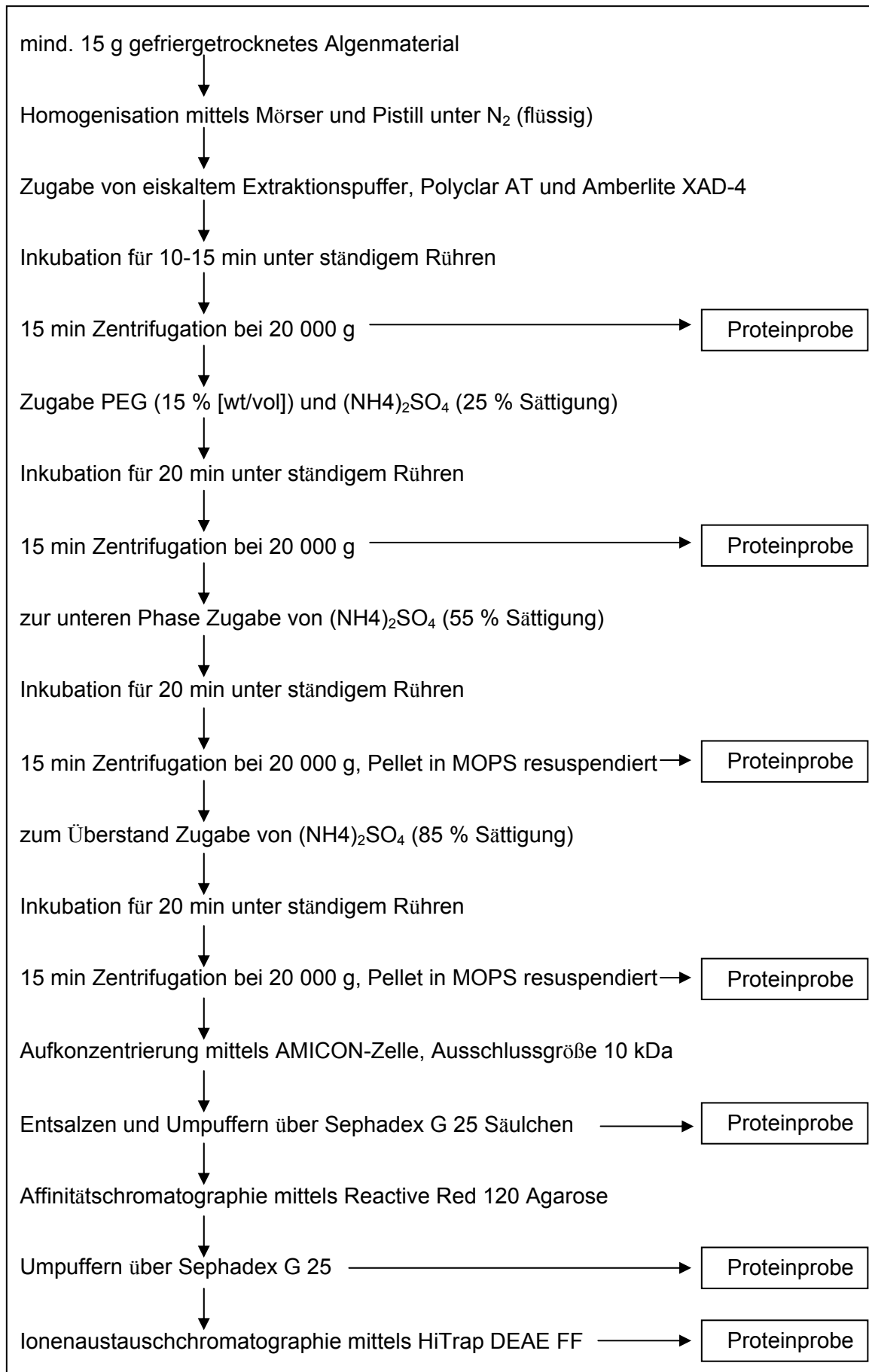


Abb. 3.5: Fließ-Schema Aufreinigung der Mt1PDH, alle Schritte wurden bei 4°C ausgeführt

DEAE FF durchgeführt, die Elution erfolgte im 20 minütigen KCl-Gradienten. Die Lagerung des gereinigten Proteins erfolgte bei -80 °C.

Nach diesem Protokoll konnten je Durchlauf aus 25 g gefriergetrocknetem Algenmaterial 1,4 µg Protein isoliert werden. Die Mt1PDH wurde dabei im Vergleich zum Rohextrakt insgesamt um den Faktor 1229,1 angereichert.

Damit wurde das Ziel, ein Aufreinigungsprotokoll für die Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* zu entwickeln und gereinigtes Protein für eine biochemische und molekularbiologische Charakterisierung zu isolieren, erreicht.

3.1.2 Biochemische Charakterisierung der Mt1PDH

3.1.2.1 Allgemeine Kenngrößen

Die Reinheit des so isolierten Proteins wurde nach der Aktivitätsbestimmung (Methode 2.2.2.1) durch eine SDS-Gelelektrophorese (Methode 2.3.4) und anschließende Silberfärbung (Methode 2.3.9) überprüft (Beispielgel: Abb 3.6). Neben der Proteinprobe wurde im dargestellten Gel BSA in definierten Mengen aufgetragen, um eine Abschätzung der in der Enzymprobe enthaltenen Proteinmenge zu ermöglichen. Dies diente der Verifizierung der durch Proteinbestimmung nach Bradford (Methode 2.3.3) erhaltenen Ergebnisse.

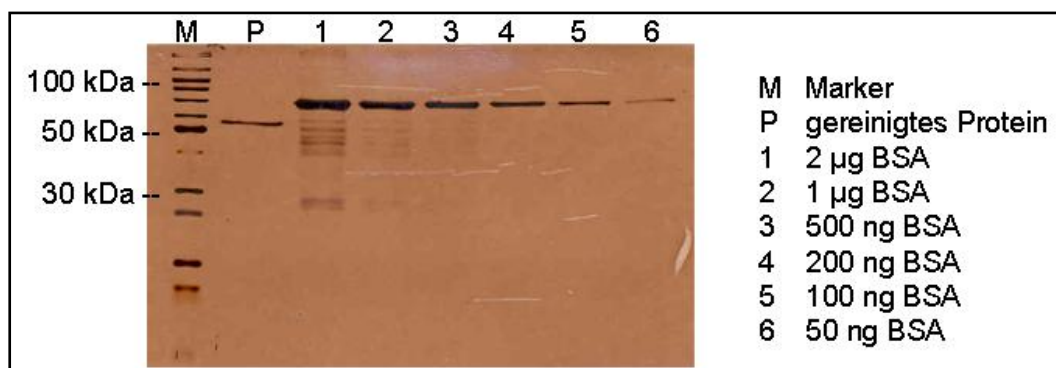


Abb. 3.6: Silbergefärbtes Gel nach SDS-PAGE im 12 % Gel; für die Spur mit dem gereinigten Protein zeigt sich nur eine einzelne Bande (spricht für die hohe Reinheit der Probe); das Molekulargewicht des isolierten Proteins liegt knapp über 50 kDa

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford (Methode 2.3.3) wird der Farbstoff Coomassie Brilliantblau verwendet (genau wie bei der Coomassie-Färbung, Methode 2.3.8), dessen untere Nachweisgrenze bei 100 bis 500 ng Protein liegt. Nach diesem Test enthielt die Probenspur 900 ng gereinigtes Protein. Die Silberfärbung beruht dagegen auf der Reduktion von löslichen Silberionen zu unlöslichem Silber, die in Anwesenheit von Proteinen beschleunigt wird. Die untere Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0,2 bis 0,6 ng Protein. Damit ist dieser Nachweis für die hier eingesetzten Proteinmengen zuverlässiger. Die aufgetragene Menge der Mt1PDH betrug demnach nur ca. 100 ng und die Ergebnisse der Proteinbestimmung nach Bradford müssen für die nach der Chromatographie erhaltenen Fraktionen um den Faktor 9 nach unten korrigiert werden.

Das Molekulargewicht des Enzyms wurde durch die Auftrennung im 12 % Gel (Methode 2.3.4) auf ca. 50 kDa bestimmt, wobei durch die denaturierende SDS-PAGE noch keinerlei Aussage über eine evtl. Zusammensetzung des Proteins aus Homomeren und damit über das native Molekulargewicht getroffen werden kann. Darüber hinaus ist nur 1 Bande im Gel zu sehen, was für eine hohe Reinheit des aufgereinigten Proteins spricht.

Danach wurde mit der gereinigten Proteinprobe eine native Elektrophorese im Polyacrylamidgel durchgeführt (Methode 2.3.5). Anschliessend wurde eine Probenspur mit Silber gefärbt (Methode 2.3.9), während mit einer weiteren Probe ein Zymogramm durchgeführt wurde (Methode 2.3.7). Die Silberfärbung zeigte nur einen einzelnen Proteinspot (Abb. 3.7 A), was wiederum für die hohe Reinheit des isolierten Proteins spricht. Die Enzymfärbung ergab ebenfalls einen einzelnen Proteinspot (Abb. 3.7 B), womit bestätigt wurde, dass die Mt1PDH in der gereinigten Proteinprobe enthalten war. Ein direkter räumlicher Vergleich beider Gelteile - der bestätigt hätte, dass der silbergefärbte Proteinspot die aktive Mt1PDH ist - war allerdings nicht möglich, da sich die Größe der ursprünglich gleich großen Gelteile durch die verschiedenen Färbetechniken unterschiedlich veränderte.

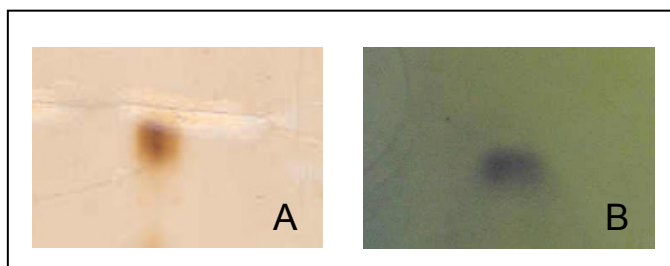


Abb. 3.7: PA-Gele nach nativer Gel-Elektrophorese mit gereinigter Mt1PDH:
A nach Silberfärbung
B nach Färbung mit MTT/PMS
es wurde jeweils nur ein einzelner Proteinspot detektiert

Um die Reinheit des aufgereinigten Proteins genauer zu überprüfen wurde eine Probe davon in der Abteilung Mikrobiologie der Universität Rostock durch Frau Dr. Katrin Schwarz einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen. Mittels dieser gelelektrophoretischen Methode werden die Proteine in der ersten Dimension entsprechend ihres isoelektrischen Punktes, in einer zweiten nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Klose, 1975; O'Farrell, 1975). Nach Färbung des Gels mit kolloidalem Coomassie (Neuhoff et al., 1988) zeigten sich zwei verschiedene Proteinspots mit nahezu gleichem Molekulargewicht (jeweils zwischen 45 und 66,2 kDa), aber unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (ca. pH-Wert 6 bzw. 8; Abb. 3.8).

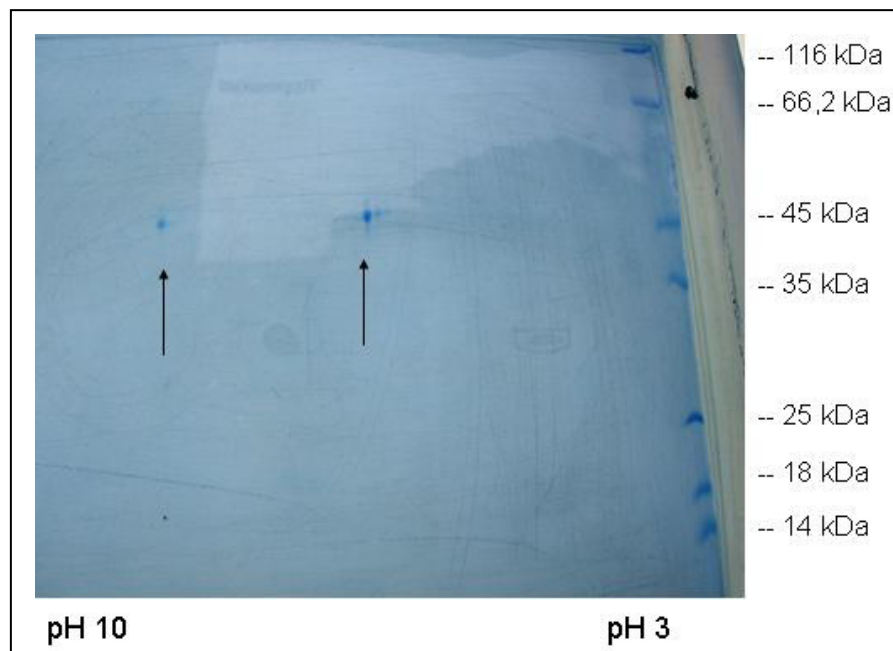


Abb. 3.8: Ergebnis der 2D-PAGE der aufgereinigten Mt1PDH; nach Färbung mit kolloidalem Coomassie zeigen zwei verschiedene Proteinspots mit gleichem Molekulargewicht von ca. 50 kDa, aber unterschiedlichen isoelektrischen Punkten

Dieses Ergebnis legt nahe, dass in der aufgereinigten Proteinprobe neben der Mt1PDH noch mindestens ein weiteres Protein vorlag, dessen Signal in der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 3.6) durch die Bande der Mt1PDH überlagert wurde und somit nicht detektierbar war.

3.1.2.2 Identifizierung der AS-Sequenz durch Edmann-Abbau

Zur Ermittlung der Aminosäuresequenz des gereinigten Proteins wurden 1,7 µg Protein einer denaturierenden Proteinelektrophorese unterzogen (Methode 2.3.4) und anschliessend auf eine PVDF-Membran übertragen (Methode 2.3.10). Mit Hilfe einer Coomassie-Färbung (Methode 2.3.8) von Gel und Membran wurde anschliessend überprüft, ob der Transfer des Proteins vom Gel auf die Membran vollständig erfolgt war. Die Membran mit der angefärbten Proteinbande wurde dann für eine Sequenzierung durch Edmann-Abbau mit Hilfe eines Procise Sequenzers von Applied Biosystems an die Firma SeqLab geschickt.

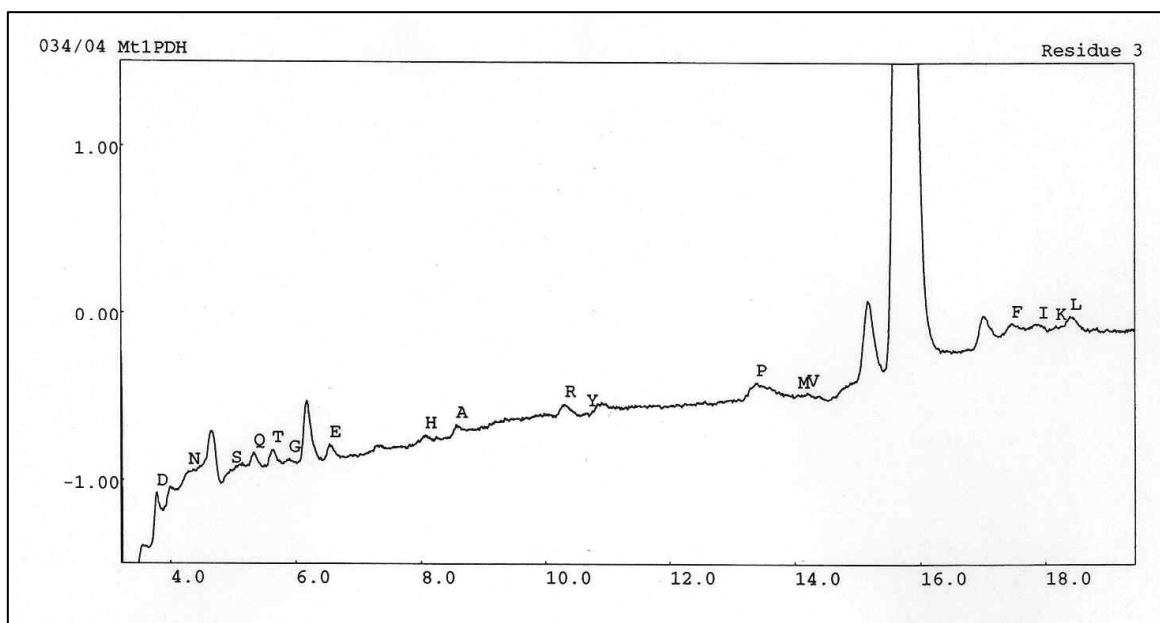


Abb. 3.9: Sequenzauswertung einer auf PVDF-Membran geblotteten Probe der MtlPDH nach Aminosäuresequenzierung mittels Edmann-Abbau durch die Firma SeqLab

Diese erklärte nach Bearbeitung der Proben, dass keine Sequenz bestimmt werden konnte (Abb. 3.9), ein Grund wurde dafür nicht angegeben. Auch ein zweiter Versuch der Sequenzierung mit einer neuen Proteinprobe und einer kürzeren Coomassie-Färbung (Essigsäure könnte die Nachweismethode stören) führte zu dem gleichen Resultat.

3.1.2.3 Identifizierung der AS-Sequenz durch MALDI-TOF

Das gereinigte Protein (1,7 µg) wurde einer denaturierenden Proteinelektrophorese (Methode 2.3.4) unterzogen. Anschliessend wurde das Gel kurz mit Coomassie gefärbt (Methode 2.3.8), die Proteinbande mit einem Skalpell aus dem Gel entfernt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 100 µl 1,5 M TRIS-Puffer (pH-Wert 8,8) überführt. Zur Ermittlung der Aminosäuresequenz mittels MALDI-TOF wurde jeweils eine Probe

gekühlt an das MPI in Golm (Kooperationspartner der Arbeitsgruppe) und die Firma SeqLab verschickt. In beiden Fällen konnte jedoch keine Aminosäuresequenz oder auch nur eine Teilsequenz für die Mt1PDH ermittelt werden.

3.1.2.4 Antikörper - Kreuzreaktionstest

Das Enzym Mt1PDH ist auch aus dem einzelligen Parasiten *Eimeria tenella* bekannt und wurde dort ausführlich charakterisiert (Allocco *et al.*, 1999). Dr. John Allocco von Merck & Co., Inc. in Rayway, NJ, USA hat für Kreuzreaktionstests freundlicherweise den im Rahmen seiner Forschung durch Kaninchenimmunisierung gewonnenen Antikörper zur Verfügung gestellt. Die aufgereinigte Mt1PDH aus *Caloglossa* wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Methode 2.3.4) auf eine PVDF-Membran übertragen (Methode 2.3.10) und anschliessend mit diesem Antikörper inkubiert (Methode 2.3.11). Eine Kreuzreaktion des Antikörpers aus *Eimeria tenella* mit der aus *Caloglossa leprieurii* aufgereinigten Mt1PDH hätte Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz ermöglicht, allerdings konnte keine Kreuzreaktion festgestellt werden.

3.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung der Mt1PDH

Mit Hilfe der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden die bereits bekannten Aminosäuresequenzen der Mt1PDH aus verschiedenen Organismen ermittelt und in einem computergestützten BLAST miteinander verglichen (Abb. 3.10). So konnten offenbar konservierte (und damit für das Enzym vermutlich essentielle) Bereiche identifiziert werden, welche dann zur Ableitung degenerierter Primer (Sequenz: siehe 2.4.4.2) für die Fischung des Gens durch PCR bzw. RT-PCR (Methode 2.4.4) herangezogen wurden. Aus der bereits bekannten Gensequenz der großen Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/ Oxygenase aus *Caloglossa leprieurii* (Zuccarello *et al.*, 2000) wurde ein weiteres Primerpaar (Primer „Kirsten7“ und „Kirsten8“, Sequenz siehe 2.4.4.2) als Positiv-Kontrolle für die PCR-Durchläufe mit *Caloglossa*-DNA/cDNA abgeleitet.

Um auch die generelle Funktionalität der Mt1PDH-spezifischen Primer (vier *forward*-Primer, zwei *reverse*-Primer) zu überprüfen, wurden alle PCR-Ansätze gleichzeitig mit aus *Escherichia coli* gewonnener DNA (Methode 2.4.8) gefahren, da für die Primerableitung Aminosäuresequenzen dieses Organismus' genutzt wurden.

Clostr. aceto	---MKF	AFGC	GN	I	RGF	GYLLAKSNVTE	TFVD	IFDKVVD	IN	KYKRN	TV	ILIS	---TSKNK	EVN	RAV	AL	KDSV	---ALEKEV	LEAD	IT	SL	GN	IKST	GE	IR	FE	LK	RR	SE	IN	DK	---	DI	AC	EN	AL	---	AS	DI	AK	KA	---	133																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
Thermoanero	---MKF	AFGC	GN	I	RGF	GYLLAKSGE	IT	VD	ISKE	VD	IN	KYKRN	IL	IK	---PE	VE	EV	TE	SE	VA	NA	VS	IG	ED	---	VD	IF	DA	FL	AD	LV	MT	SV	GN	SI	SG	IR	KK	YK	LA	KE	NE	---	134																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
Salmon. typhii	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	133																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
E. coli	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	133																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Klebs. pneu	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	133																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Yers. pest	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	133																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Vibrio. para	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	133																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Vibrio. vulni	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	133																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Pasteur. multo	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	134																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Vibrio. chol	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	134																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Pasteur. multo	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	135																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Buch. sp	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	135																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Buch. aph	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	134																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Strept. pneu	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	134																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Strept. mut	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	134																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Lact. lact	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	136																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Enter. faec	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	136																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Lact. plant	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	136																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Geobac. stearo	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	136																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Ocean. theven	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	135																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Bac. halo	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	135																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Paracocci. brasili	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	134																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Aspergillus	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	135																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Staphyl. aur	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	135																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Staphyl. pul	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	135																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Mycopl. pneu	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	130																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Mycopl. myco	---MK	F	AFGC	GN	I	RGF	GKLIADAG	IT	VD	IN	QV	IL	DA	NAL	MA	RS	OV	HE	VE	NE	IG	ED	---	V	DI	LA	HD	VT	AV	GP	VL	IR	IA	PA	TA	KL	VR	KA	QO	NE	---	129																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
ruler	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3000	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110	3120	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3230	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300	3310	3320	3330	3340

Als Ausgangsmaterial für die PCR-Überprüfungen (für die zunächst eine aus rekombinanten *E. coli*-Stämmen präparierte *Taq*-Polymerase genutzt wurde) wurde aus frisch geernteten Proben von *Caloglossa leprieurii* DNA (Methode 2.4.5) bzw. RNA (Methode 2.4.1) isoliert; letztere wurde dann für die Synthese von cDNA eingesetzt (Methode 2.4.3). In der anschließenden PCR (Methode 2.4.4) wurden DNA und cDNA aus *Caloglossa leprieurii* sowie genomische DNA aus *E. coli* mit allen möglichen Kombinationen der Mt1PDH-spezifischen Primer eingesetzt. Dabei konnte für die Primerkombination *Kirsten1* (*forward*) und *Kirsten5* (*reverse*) bei der Auftrennung der amplifizierten DNA im Agarosegel (Methode 2.4.6) zunächst ein Genfragment in der erwarteten Größe identifiziert werden (Abb. 3.11 A). Dieses wurde eluiert (Methode 2.4.7) und durch Herrn Dr. Bastrop der Abteilung Stoffwechselphysiologie der Universität Rostock sequenziert, wobei sich eine hundertprozentige Identität mit der

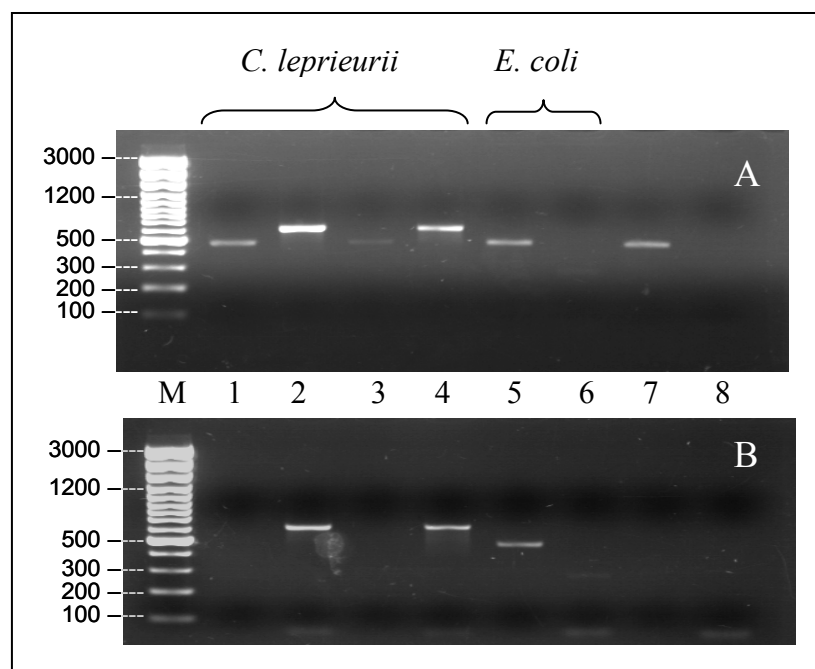


Abb. 3.11: Überprüfung der DNA-Fragment-Amplifikation im 1 % Agarosegel; beide PCR-Ansätze wurden nach dem selben Schema pipettiert und auf das Gel aufgetragen, aber

A mit laboreigener *Taq*-Polymerase, aus *E. coli* isoliert

B mit kommerzieller *Taq*-Polymerase

M = Größenstandard mit der jeweils angegebenen Anzahl an Basenpaaren

1 = cDNA aus *C. leprieurii*; Primerkombination *Kirsten1* und *Kirsten5*; Mt1PDH-spezifisch

2 = cDNA aus *C. leprieurii*; Primerkombination *Kirsten7* und *Kirsten8*; Positiv-Kontrolle

3 = DNA aus *C. leprieurii*; Primerkombination *Kirsten1* und *Kirsten5*; Mt1PDH-spezifisch

4 = DNA aus *C. leprieurii*; Primerkombination *Kirsten7* und *Kirsten8*; Positiv-Kontrolle

5 = DNA aus *E. coli*; Primerkombination Mt1PDH-spezifisch; Positivkontrolle

6 = DNA aus *E. coli*; Primerkombination RuBisCo-spezifisch; Negativkontrolle

7 = H₂O; Primerkombination Mt1PDH-spezifisch; Negativkontrolle

8 = H₂O; Primerkombination RuBisCo-spezifisch; Negativkontrolle

bekannten Sequenz der Mt1PDH aus *E. coli* ergab. Um sicherzustellen, dass keine Verunreinigung mit *E. coli*-DNA vorliegt (auch die Negativkontrolle mit A. dest. als *template* ergab ein Signal, siehe Spur 7 in Abb. 3.11 A), wurde die PCR mit kommerzieller *Taq*-Polymerase wiederholt (Abb. 3.11 B). Dabei zeigte sich, dass es sich im ersten Ergebnis tatsächlich um Falsch-Positive Resultate handelte, die offenbar auf eine mit *E. coli*-DNA kontaminierte *Taq*-Polymerase zurückzuführen waren. Somit konnte mit den abgeleiteten Primern letztlich kein Genfragment der Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* gefischt werden.

Allerdings wurde durch die Überprüfungen die generelle Funktionalität zumindest einer Mt1PDH-spezifischen Primerkombination (*Kirsten1/Kirsten5*, siehe Abb. 3.11 B, Spur 5) sowie der RuBisCo-spezifischen Primerkombination (Abb. 3.11 B, Spuren 2 und 4) bewiesen, was einen guten Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen liefert.

3.2 Mannitolmetabolismus in *Rhodella violacea*

Zu Beginn der Arbeiten war lediglich bekannt, dass die einzelligen Rotalgen *Rhodella violacea* und *Dixoniella grisea* den für Rotalgen untypischen Zuckeralkohol Mannitol als Hauptphotosyntheseprodukt und organisches Osmolyt produzieren (Karsten *et al.*, 1999). Die an diesem Stoffwechselweg beteiligten Enzyme sollten jetzt identifiziert und biochemisch charakterisiert werden. Dafür wurde ausgehend von dem aus der Makroalge *Caloglossa leprieurii* bekannten Mannitolmetabolismus (Karsten *et al.*, 1997b) überprüft, ob die dort beschriebenen Enzyme auch in *Rhodella* bzw. *Dixoniella* nachweisbar sind. Die Untersuchungen wurden an durch Ammoniumsulfatfällung angereinigten Proteinextrakten durchgeführt (Methode 2.2.1).

Für beide Mikrorotalgen konnten als Ergebnis alle vier aus *Caloglossa* beschriebenen Enzymreaktionen nachgewiesen werden, offenbar besitzen also beide bezüglich des Mannitolmetabolismus die gleichen Enzyme wie *Caloglossa leprieurii*. Eine erste biochemische Charakterisierung dieser Enzyme in *Dixoniella grisea* wurde in einer von mir mitbetreuten Diplomarbeit ausgelagert (Raimund, 2005). Die Charakterisierung für *Rhodella violacea* ist im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgt, deren Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

Für die Untersuchungen des pH-Optimums der einzelnen Enzyme wurden drei verschiedene Puffer (MOPS, TRIS und CAPSO) mit einander überlappenden Wirkungsbereichen verwendet, um den pH-Bereich von 6,0 bis 10,3 abzudecken. Dabei ergaben sich mit TRIS immer leicht niedrigere Werte als bei Verwendung der beiden anderen Puffer (Bsp.: Abb. 3.12).

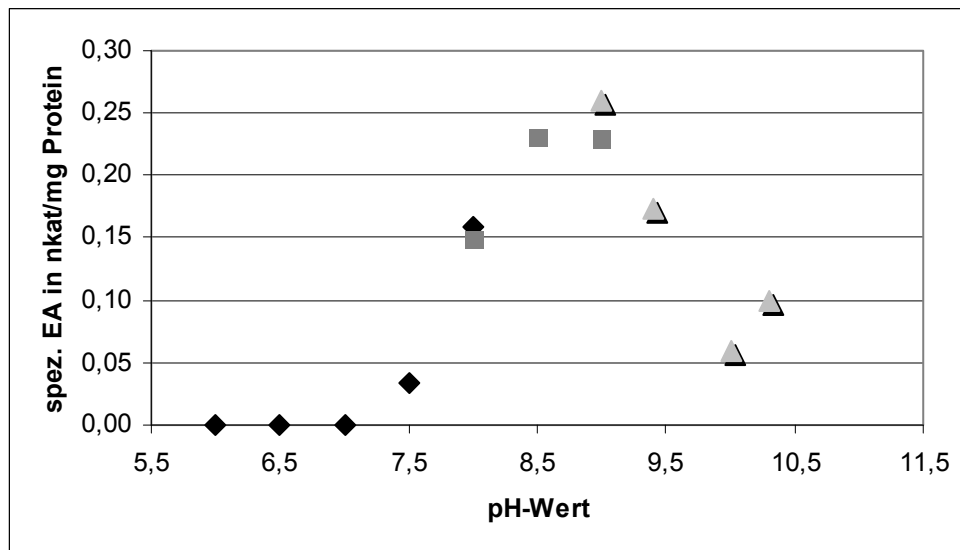


Abb. 3.12: spezifische Enzymaktivität der Mt1PDH (oxidative Reaktion) bei verschiedenen pH-Werten, der Test erfolgte mit verschiedenen Puffern: ♦ MOPS-Puffer, ■ TRIS-Puffer, ▲ CAPSO-Puffer; die mit TRIS bestimmte spez. EA liegt jeweils leicht unterhalb des mit MOPS bzw. CAPSO bestimmten Wertes

3.2.1 Charakterisierung Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase (Mt1PDH) EC 1.1.1.17

Dieses Enzym zeigte für beide möglichen Reaktionsrichtungen mit den vom Mannitolzyklus in *Caloglossa lepriourii* bekannten Substraten eine maximale Aktivität. Konkret waren das Mannitol-1-Phosphat (Mt1P) für die oxidative Reaktion (Abb. 3.13) mit einem Aktivitätsmaximum bei pH 8,5 sowie Fructose-6-Phosphat (F6P) für die Reduktionsreaktion (Abb. 3.14), deren Aktivitätsmaximum bei pH 7,4 lag. Für die Messungen wurden (sofern nicht anders angegeben) jeweils 5 echte Parallelen genutzt. Die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte erfolgte jeweils durch graphische Extrapolation nach der Methode von Hanes (Hanes, 1932).

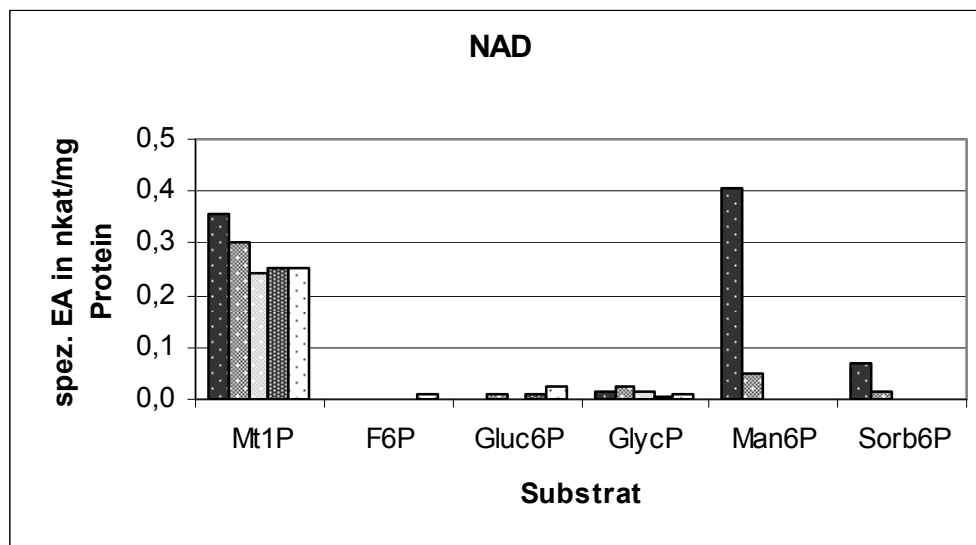


Abb. 3.13: Substratspezifität der Mt1PDH, oxidative Reaktion: dargestellt ist jeweils die spez. EA für verschiedene Substrate, vermessen wurden 5 echte Parallelen, die nebeneinander dargestellt wurden, um „Ausreißer“ in den Werten genauer darstellen zu können; Mt1P = Mannitol-1-Phosphat, F6P = Fructose-6-Phosphat, Gluc6P = Glucose-6-Phosphat, Man6P = Mannose-6-Phosphat, Sorb6P = Sorbitol-6-Phosphat

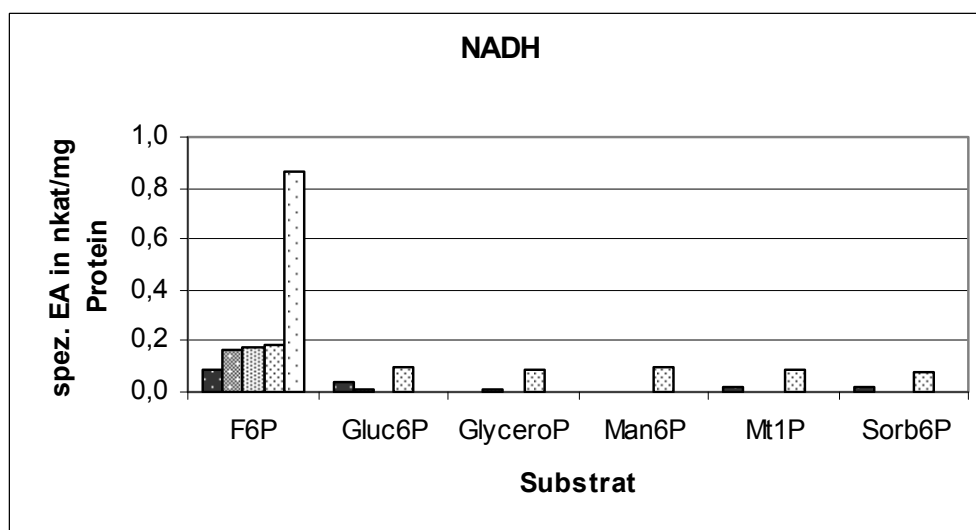


Abb. 3.14: Substratspezifität der Mt1PDH, reduzierende Reaktion: dargestellt ist jeweils die spez. EA für verschiedene Substrate, vermessen wurden 5 echte Parallelen, die nebeneinander dargestellt wurden, um „Ausreißer“ in den Werten genauer darstellen zu können; Mt1P = Mannitol-1-Phosphat, F6P = Fructose-6-Phosphat, Gluc6P = Glucose-6-Phosphat, Man6P = Mannose-6-Phosphat, Sorb6P = Sorbitol-6-Phosphat

Bei Verwendung der alternativen Nucleotide (NADP bzw. NADPH) und Substrate waren die gemessenen Aktivitäten sehr gering, sofern überhaupt meßbare Reaktionen stattfanden. Eine Ausnahme bildete der Versuchsansatz mit NADP und Glucose-6-Phosphat (G6P) für die oxidierende Reaktion. Die hier gemessenen Enzymaktivitäten variierten von 66,6 % bis zu 350 % der Hauptreaktion (Abb. 3.15), was die Vermutung nahe legt, dass im gemessenen Rohextrakt auch jeweils immer eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase vorlag. Eine Klärung könnte durch die Wiederholung der Messungen mit aufgereinigtem Enzym erfolgen.

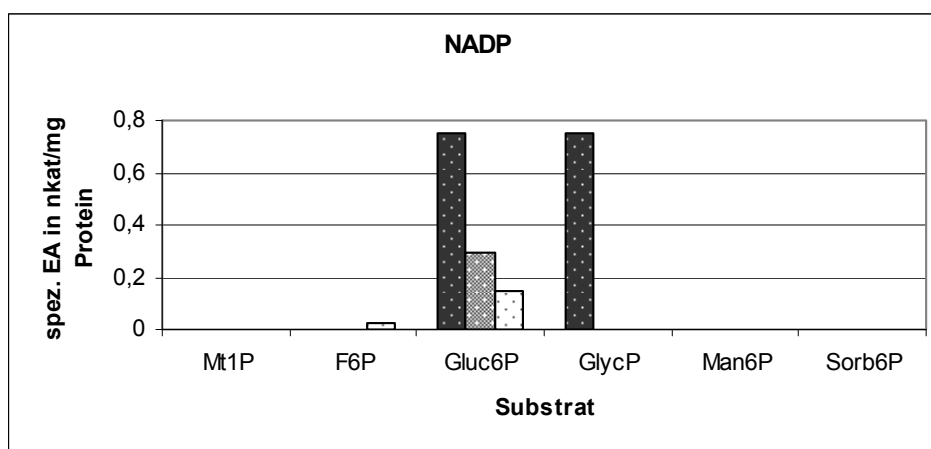


Abb. 3.15.: Substratspezifität der Mt1PDH, oxidierende Reaktion, mit dem alternativen Nucleotid NADP, gemessen wurden 3 echte Parallelen, die zur eindeutigeren Darstellung der Streuung der Werte nebeneinander aufgetragen wurden; Mt1P = Mannitol-1-Phosphat, F6P = Fructose-6-Phosphat, Gluc6P = Glucose-6-Phosphat, Man6P = Mannose-6-Phosphat, Sorb6P = Sorbitol-6-Phosphat

Die Werte für V_{\max} ($0.44 \text{ nkat mg}^{-1} \text{ Protein}$ für die Oxidation und $0.16 \text{ nkat mg}^{-1} \text{ Protein}$ für die Reduktion) und K_m (1.82 mM bzw. 1.94 mM) lagen für beide Reaktionen jeweils in der gleichen Größenordnung (Abb. 3.16 A und B).

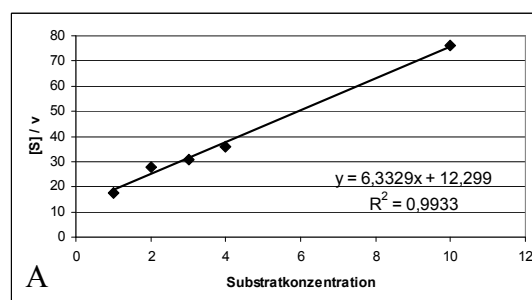
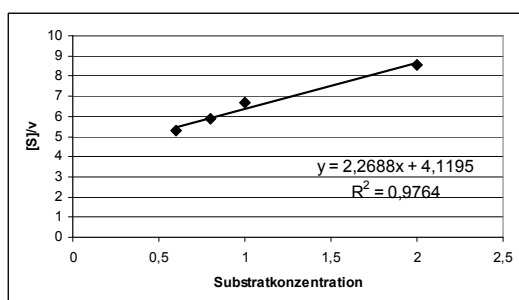


Abb. 3.16: graphische Extrapolation nach Hanes zur

Bestimmung der K_m - und V_{\max} -Werte der Mt1PDH;
A – oxidativer Reaktionsweg; B – reduktiver Reaktionsweg

3.2.2 Charakterisierung Mannitol-1-Phosphatase (Mt1Pase) EC 3.1.3.22

Für diese Enzymreaktion konnte kein eindeutiges Hauptsubstrat bestimmt werden, jedoch zeigte sich, dass sowohl Mt1P (das bevorzugte Substrat des Enzyms in *Caloglossa leprieurii*), als auch F6P gut umgesetzt werden (Abb. 3.17). Glucose-6-Phosphat und Sorbitol-6-Phosphat können ebenfalls als Substrate genutzt werden. Bei Verwendung von PNPP als Substrat wurden im Vergleich dazu 5-8 mal höhere Werte gemessen, was auf das Vorhandensein vieler unspezifischer Phosphatasen im Extrakt schliessen läßt (Flint and Hopton, 1977). Dadurch konnte auch keine für dieses Enzym spezifische Kinetik nach Michaelis-Menten bestimmt werden.

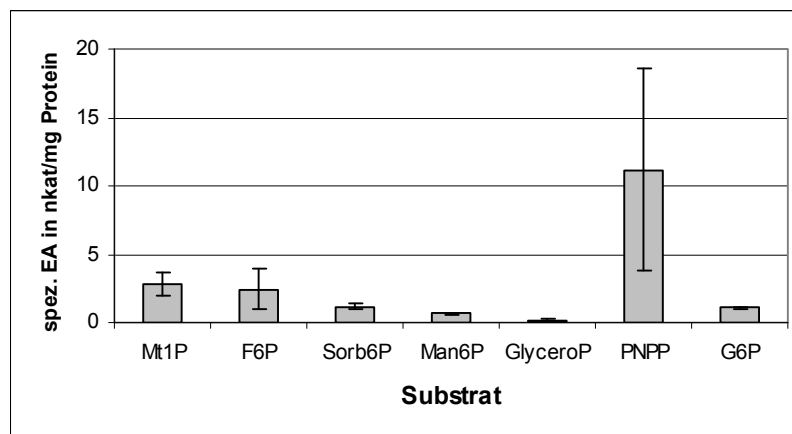


Abb. 3.17: Substratspezifität der Mt1Pase; es konnte kein eindeutiges Hauptsubstrat bestimmt werden, die hohe Umsetzung von PNPP lässt auf das Vorhandensein unspezifischer Phosphatasen im untersuchten Rohextrakt schliessen

3.2.3 Charakterisierung Mannitoldehydrogenase (MtDH) EC 1.1.1.67

Die MtDH erwies sich als sehr spezifisch. Die höchsten Aktivitäten wurden für die Oxidation bei einem pH-Wert von 9,2 (Optimum) mit Mannitol und NAD im Versuchsansatz gemessen; für die Reduktion bei pH 7,0 bis 7,4 (Optimum) mit Fructose und NADH. Alle weiteren überprüften Substrate ergaben (auch in Kombination mit den alternativen Nucleotiden) mindestens 10 mal schwächere bzw. gar keine Enzymreaktionen (Abb. 3.18 und 3.19).

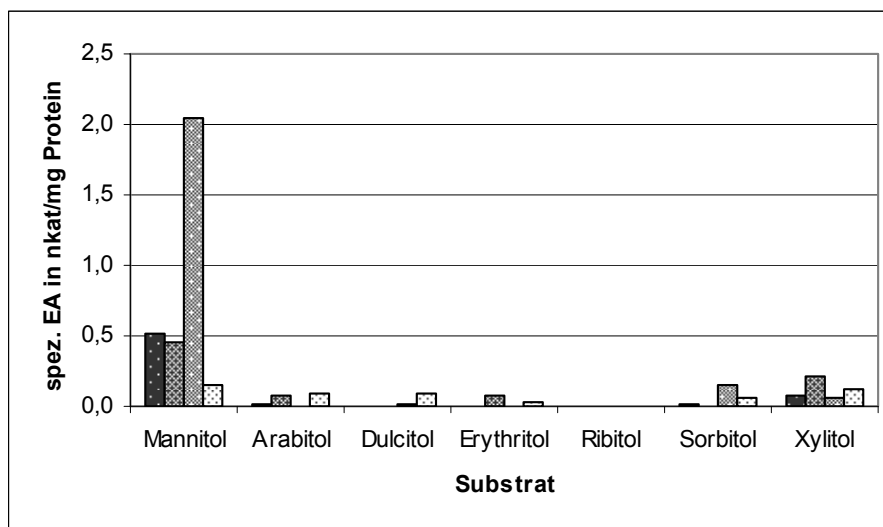


Abb. 3.18: Substratspezifität der MtDH, oxidative Reaktion; es wurden jeweils 4 echte Parallelen vermessen; Mannitol ist eindeutig als Hauptsubstrat anzusehen, in geringem Umfang kann auch Xylitol genutzt werden

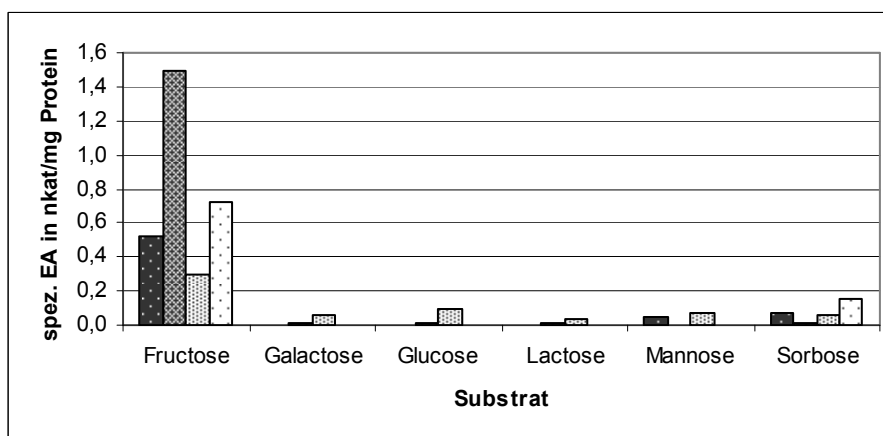


Abb. 3.19: Substratspezifität der MtDH, reduzierende Reaktion; es wurden jeweils 4 echte Parallelen vermessen; Hauptsubstrat ist eindeutig Fructose

V_{\max} der Fructosereduktion ($133.53 \text{ nkat mg}^{-1} \text{ Protein}$) war ca. 5 mal höher als V_{\max} der entgegengesetzten Reaktion ($27,69 \text{ nkat mg}^{-1} \text{ Protein}$), während die K_m -Werte sich in der gleichen Größenordnung (3.65 mM bzw. 2.60 mM) bewegten (Abb. 3.20 A und B).

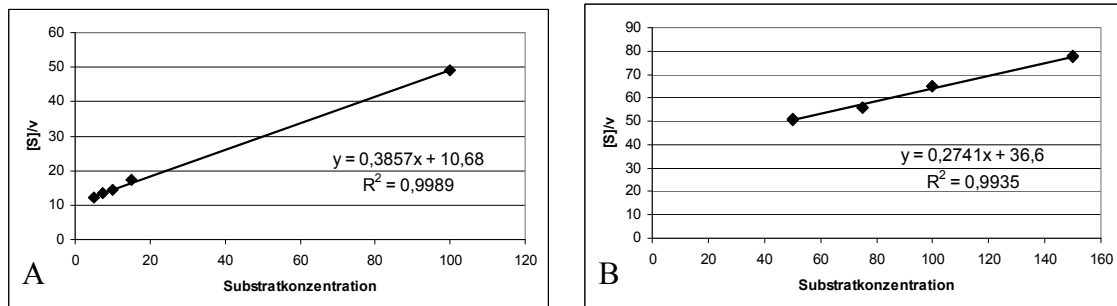


Abb. 3.20: graphische Extrapolation nach Hanes zur Bestimmung der K_m - und V_{\max} -Werte der Mt1PDH; A – oxidativer Reaktionsweg; B – reduktiver Reaktionsweg

3.2.4 Charakterisierung Hexokinase (HK) EC 2.7.1.1

Die höchste Enzymaktivität wurde mit dem Substrat Fructose gemessen. Von allen anderen getesteten Substraten zeigte nur noch Glucose nennenswerte Aktivitäten, die allerdings nicht mehr als 10-20 % der Hauptaktivität erreichten (Abb. 3.21). Der K_m -Wert (2.70 mM) war in etwa mit dem für die MtDH errechneten vergleichbar; der V_{\max} -Wert betrug $4.83 \text{ nkat mg}^{-1} \text{ Protein}$ (Abb. 3.22). Dieses Enzym wurde in einem gekoppelten Versuchsansatz unter Verwendung von Phosphoglucose Isomerase, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und NADP getestet, daher wurde kein pH-Optimum bestimmt.

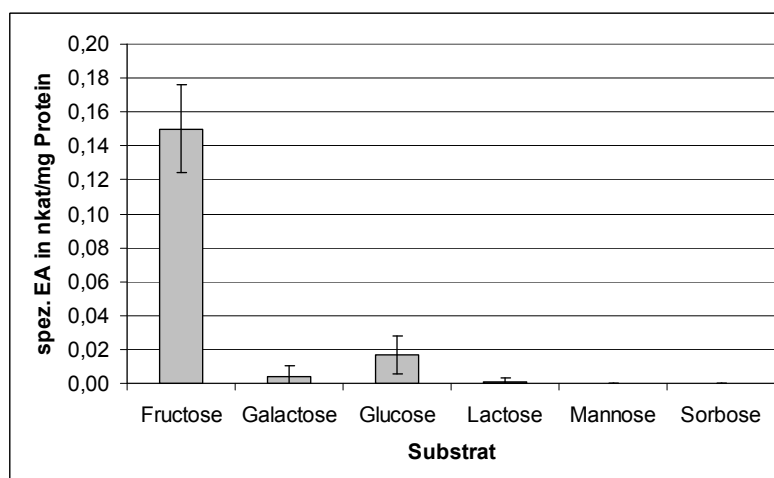


Abb. 3.21: Substratspezifität der Hexokinase; Hauptsubstrat ist Fructose; die Fehlerbalken bezeichnen die Standard-Abweichung

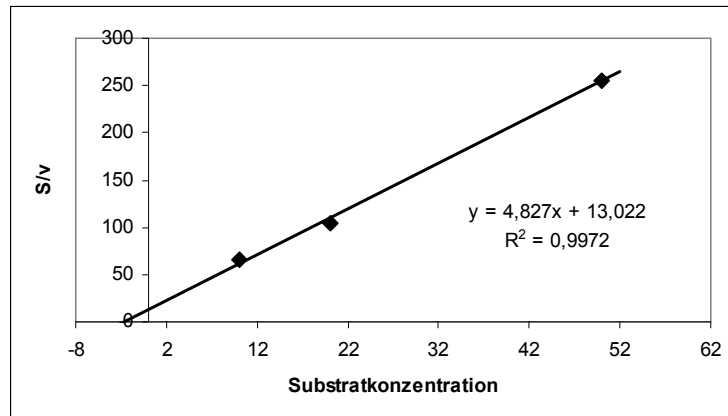


Abb. 3.22: graphische Extrapolation nach Hanes zur Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte der Hexokinase

Die Ergebnisse belegen, dass der Mannitolmetabolismus in *Rhodella violacea* offenbar nach dem gleichen Prinzip wie in *Caloglossa leprieurii* abläuft. Die optimalen pH-Werte für die einzelnen Enzymreaktionen sind in beiden Rotalgen fast identisch. Für die übrigen biochemischen Kenngrößen, wie Substratspezifität, K_m -Wert und V_{max} -Wert gibt es zwischen den Arten allerdings teilweise beträchtliche Unterschiede. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Messungen mit kaum angereinigten Rohextrakten durchgeführt wurden.

3.3 Ökophysiologische Charakterisierung von *Rhodella violacea*

Nachdem im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Nachweis erbacht werden konnte, dass auch die einzellige Mikro-Rotalge *Rhodella violacea* die aus *Caloglossa leprieurii* bekannten Enzyme zur Synthese bzw. Degradation von Mannitol nutzt (siehe 3.2.), wurde eine erste ökophysiologische Charakterisierung von *Rhodella* vorgenommen. Dies ist eine wichtige Voraussetzung zur Etablierung von *Rhodella* als Modellsystem für zukünftige biochemische und molekularbiologische Untersuchungen. Dafür wurden das Wachstum bei verschiedenen Salinitäts- und Lichtstufen, sowie die Mannitolproduktion von Langzeitkulturen bei verschiedenen Salzstufen untersucht.

3.3.1 Wachstum bei verschiedenen Salinitätsstufen

Vorversuche ergaben, dass eine dauerhafte Kultivierung von *Rhodella violacea* nur bei Salinitäten zwischen 10 PSU und 55 PSU möglich ist; kurzzeitiges Wachstum für wenige Wochen konnte auch noch bei 5 bzw. 60 PSU beobachtet werden (Abb. 3.23).

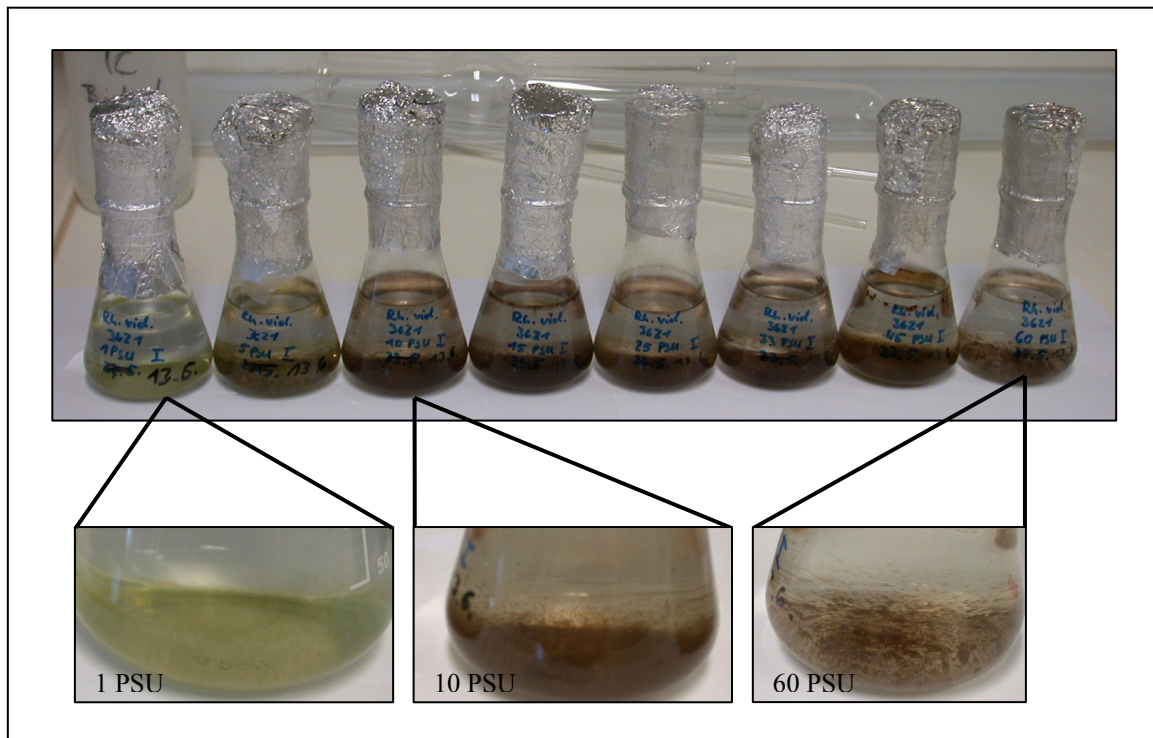


Abb. 3.23: Vorkulturen von *Rhodella violacea* bei 1 PSU, 5 PSU, 10 PSU, 15 PSU, 25 PSU, 33 PSU, 45 PSU und 60 PSU nach einem Monat Wachstum bei 22 °C und einer PFD von 22 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, die bei 1 PSU gehaltene Kultur ist bereits ausgebleicht; die Zellen dieser Kultur waren im mikroskopischen Bild kurz vor dem Zerplatzen

Die Wachstumsuntersuchungen (Methode 2.5.2) wurden anschliessend bei einer Temperatur von 20 °C und einer Photonenflußdichte (PFD) von 22 $\mu\text{mol Photonen}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$ mit Salinitäten von 1 PSU und ab 5 PSU in Fünferschritten aufwärts bis 55 PSU durchgeführt. Für jede Salinitätsstufe wurden jeweils echte 5 Parallelen gemessen und deren Wachstumsrate μ einzeln bestimmt, anschliessend wurden alle berechneten Werte einer Salzstufe gemittelt. Es zeigte sich, dass das Optimum für *Rhodella violacea* bei einer Salinität von 25 PSU liegt (Abb. 3.24), aber auch bei 15 bzw. 20 PSU ist sehr gutes Wachstum möglich (mindestens 80 % vom optimalen Wert). Die Salinitätsstufen von 5 PSU bis 55 PSU erlauben ein mäßiges Wachstum (mindestens 20 % vom Optimum).

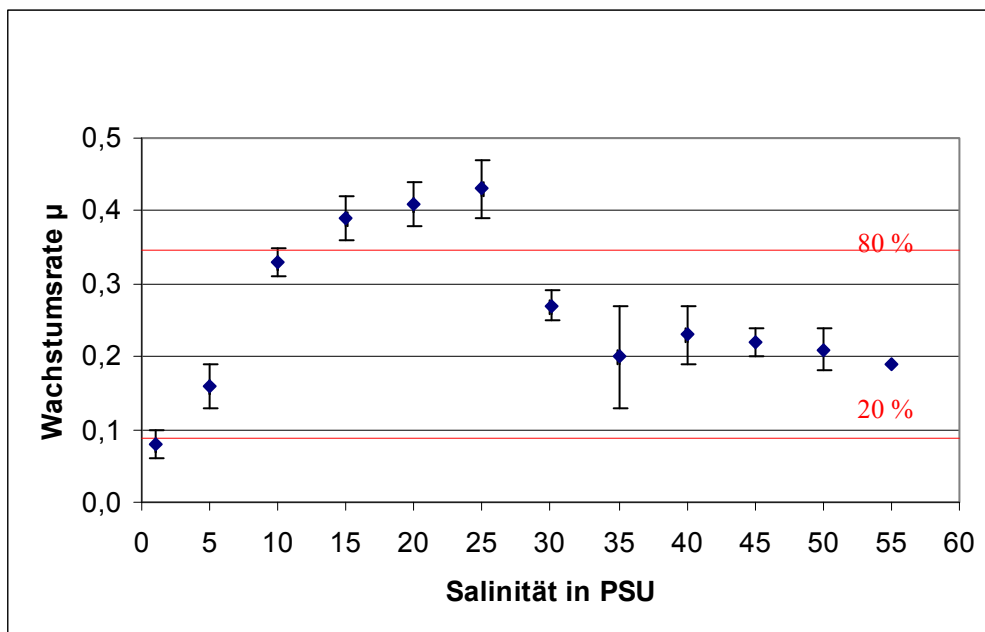


Abb. 3.24: Wachstumsraten von *Rhodella violacea* bei unterschiedlichen Salinitätsstufen; angegeben ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung von μ aus 5 Parallelen, 20 % bzw. 80 % Optimumsgrenzen sind durch eine rote Linie markiert

Damit konnte *Rhodella violacea* als euryhaliner Organismus charakterisiert werden, was auch die weltweite Verbreitung von Europa (Guiry, 1997) über Skandinavien (Athanasiadis, 1996) und Nordamerika (Scagel et al., 1989) bis nach Asien (Yoshida, 1998) erklärt.

3.3.2 Wachstum bei verschiedenen Lichtstufen

Die Ansprüche von *Rhodella violacea* an das Lichtklima, v. a. an die Photonenflussdichte, wurden ebenfalls untersucht. Die Hälterung der Kulturen erfolgte über die gesamte Meßperiode bei 20 °C und 20 PSU, die verschiedenen Lichtstufen wurden mit Hilfe handelsüblicher, schwarzer Fenstergaze eingestellt. Dabei wurden PFDs ausgehend von 10 $\mu\text{mol Photonen/m}^2\text{s}$ in Zehnerschritten aufwärts bis 70 $\mu\text{mol Photonen/m}^2\text{s}$ überprüft (Abb. 3.25).

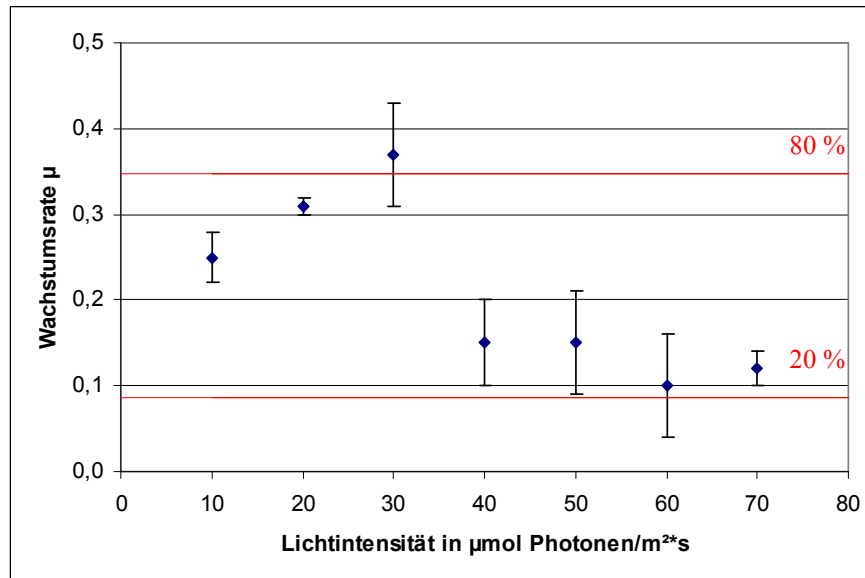


Abb. 3.25: Wachstumsraten von *Rhodella violacea* bei unterschiedlichen Lichtstufen; angegeben ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung von μ aus 5 Parallelen, 20 % bzw. 80 % Optimumsgrenzen sind durch eine rote Linie markiert

Es konnte festgestellt werden, dass *Rhodella violacea* bei einer Photonenflussdichte von 30 $\mu\text{mol Photonen/m}^2\text{s}$ am optimalsten wächst und offenbar generell niedrigere Photonenflussdichten bevorzugt.

3.3.3 Mannitolgehalt von Langzeitkulturen bei verschiedenen Salinitätsstufen

Mannitol nimmt als organisches Osmolyt in *Caloglossa lepriourii* eine wichtige Rolle in der kurzfristigen Anpassung an eine Salzgehaltserhöhung der Umgebung ein (Mostaert et al., 1995). Auch in *Rhodella violacea* kann 72 Stunden nach einem Salzschock eine verstärkte Akkumulation nachgewiesen werden (U. Nitschke, Universität Rostock, pers. Mitteilung). Untersuchungen zur Bedeutung des Mannitols für die Alge bei längerfristig gleichbleibenden, hohen Salzgehalten sind bisher aber noch nicht durchgeführt worden. Daher wurden aus Langzeit-angepassten Kulturen die Polyole extrahiert (Methode 2.5.1.1) und mittels einer HPLC identifiziert (Methode 2.5.1.2). Untersucht wurden jeweils drei echte Parallelen.

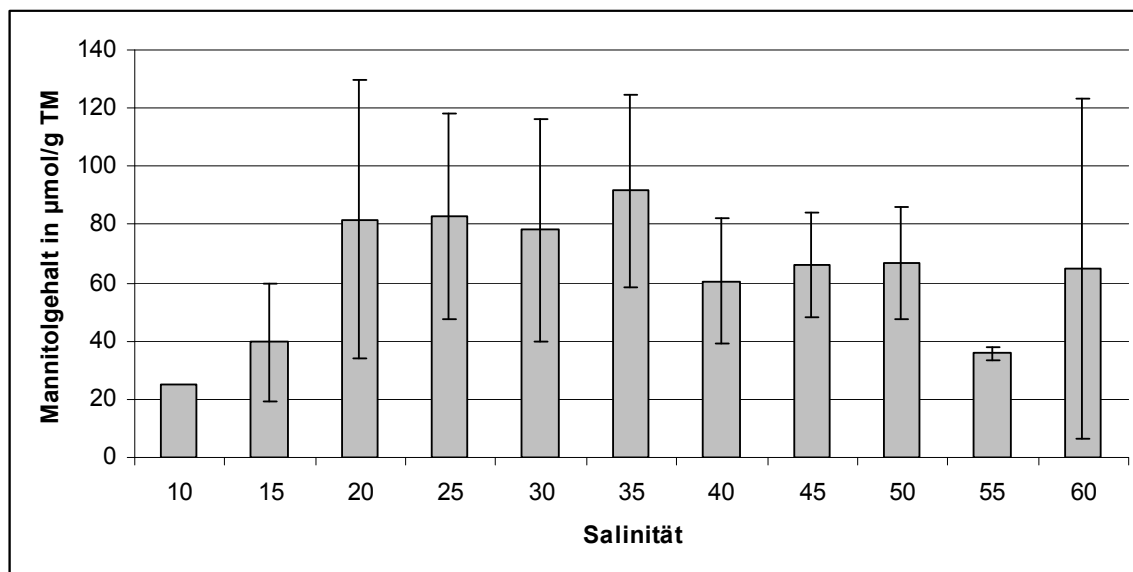


Abb. 3. 26: Mannitolgehalte salzadaptierter Kulturen verschiedener Salinitätsstufen (n=3)

Dabei wurde festgestellt, dass Mannitol bei den Langzeitkulturen für die Anpassung an hohe Salinitäten offenbar nicht von essentieller Bedeutung ist (Abb. 3.26). Ab einer Salzstufe von 20 PSU sind höhere Manitolgehalte als bei 15 PSU oder 10 PSU detektiert worden, allerdings setzt sich der Aufwärtstrend nicht kontinuierlich fort. Ab einer Salzstufe von 40 PSU sind wieder verminderte Mannitolgehalte zu verzeichnen.

4. Diskussion

4.1. Aufreinigung der Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii*

Die Proteinreinigung ist eine wichtige Voraussetzung für die exakte biochemische und molekularbiologische Charakterisierung eines Enzyms (Isaacson et al., 2006), da nur auf diesem Weg sichergestellt ist, dass die Ergebnisse nicht durch Interferenzen und Kontaminationen mit anderen Enzymen verfälscht werden (Kornberg, 1990). Dabei macht man sich den Umstand zu nutze, dass jedes Protein charakteristische Eigenschaften wie Größe und Ladung oder spezielle Adsorptionseigenschaften an eine Trägermatrix besitzt, welche eine Abtrennung von allen anderen Proteinen einer Lösung ermöglichen. Zur Isolation des zu untersuchenden Proteins aus einem Rohextrakt wird dabei in der Regel eine Kombination verschiedener Techniken genutzt (Palekar et al., 2000). Für Rotalgen hat sich eine solche Proteinreinigung als besonders schwierig erwiesen, da die Rohextrakte große Mengen an nicht-enzymatischen Enzymen (beispielsweise Phycobilline) und extrazellulären Polysacchariden enthalten, welche die weiteren Reinigungsschritte stören (Nakamura and Ikawa, 1993). In der vorliegende Dissertation wurde ein Aufreinigungsprotokoll für ein spezielles Rotalgenenzym, die Mannitol-1-Phosphate-Dehydrogenase (Mt1PDH) aus *Caloglossa leprieurii*, entwickelt. Die dabei getesteten bzw. genutzten Methoden sowie das endgültige Reinigungsprotokoll werden in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert.

4.1.1 Pufferzusätze

Für die Herstellung eines Proteinrohextraktes aus *Caloglossa leprieurii* wurde ein Puffer mit verschiedenen Zusätzen genutzt, welche die extrahierten Proteine stabilisieren bzw. die spätere Proteinreinigung erleichtern sollten.

Zur Proteinstabilisierung wurde dem Puffer 1,4-Dithiothreitol (DTT) in einer Endkonzentration von 3 mM zugesetzt. DTT stabilisiert Proteine in ihrer funktionalen Form (Ershov et al., 1993), indem es die Oxidation von Sulfidhydrylgruppen zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff verhindert. Andererseits kann es aber auch die

Faltung von Proteinen, deren Struktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird, durch Reduktion zerstören (Klis et al., 2007), daher darf die DTT-Konzentration nicht zu hoch gewählt werden. Ausserdem wurde dem Puffer der Chelator Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA; Endkonzentration: 2 mM) zugesetzt, welcher zweifach positive Ionen, z.B. Metallionen, bindet. Metallionen können Proteine aus zwei verschiedenen Gründen schädigen: zum einen verstärken sie die Oxidation von Thiol-Gruppen durch molekularen Sauerstoff, zum anderen können sie mit einzelnen Gruppen des Proteins unerwünschte Komplexe bilden. Anschliessend wurden der Extraktionslösung noch das Ionenaustauscherharz Amberlite XAD-4, welches der Suspension ebenfalls störende Metallionen entzieht (Turker, 2007), sowie Polyclar AT zugesetzt. Letztgenannte Substanz entzieht Proteinmischungen u.a. die phenolischen Komponenten (Krastanov, 2000), welche teilweise auch von Rotalgen synthetisiert werden (Pedersen et al., 1996). Der Zusatz dieser Substanzen hat sich bereits früher für die Herstellung von angereinigten Proteinextrakten aus *Caloglossa leprieurii* bewährt (Karsten et al., 1997b).

Mit der gewählten Pufferzusammensetzung wurden im Verlauf der Arbeit gute Erfahrungen gemacht. Die Mt1PDH blieb während der gesamten Extraktionsprozedur stabil und enzymatisch aktiv und konnte im Anschluss an die Reinigung stabil bei -80 °C gelagert werden.

4.1.2 Native Elektrophorese im Stärkegel

Die native Stärkegelelektrophorese wurde seit ihrer Einführung (Smithies, 1955) vielfach zur Trennung von Proteinen genutzt und findet auch heutzutage noch häufig für Allozymuntersuchungen (Prasankok et al., 2007; Cheng et al., 2006) und genetische Populationsstudien Anwendung (Ozsoy, 2007). Wie allen Elektrophoresen liegt auch dieser zu Grunde, dass geladene Moleküle und Partikel in einem elektrischen Gleichstromfeld jeweils in Richtung der Elektrode mit entgegengesetztem Vorzeichen wandern, also positive Moleküle zur Kathode und negative zur Anode (Westermeyer *et al.*, 1990). Da verschiedenartige Proteine eines Gemisches auf Grund ihrer verschiedenen Ladungen, Massen und Molekülformen unterschiedlich schnell wandern, trennen sie sich dabei in einzelne Fraktionen auf. Während der Entwicklung eines Reinigungsprotokolles für die Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit

untersucht, ob das Enzym nach der elektrophoretischen Trennung aus dem Stärkegel eluiert werden kann, was gleichzeitig eine teilweise Reinigung des Enzyms aus dem ursprünglich applizierten Gemisch bewirken und durch die vorangegangene Färbung die enzymatische Aktivität der Mt1PDH bestätigen würde. Der Vorteil der Stärkegelelektrophorese lag bei dieser Vorgehensweise darin, dass das ca. 1 cm dicke Gel nach der Elektrophorese mit Hilfe eines Drahtes (z.B. eine straff gespannte Gitarrenseite) in bis zu 5 Schichten zerteilt werden kann. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, das Enzym durch Färbung in einer Schicht des Gels zu identifizieren und aus dem Gelrest an der entsprechenden Stelle ein unbehandeltes Stück für die Elution zu entnehmen. Diese Methode ermöglichte es ausserdem, nach einem Gellauf verschiedene Elutionstechniken gleichzeitig zu testen, da mehrere Schichten mit identischer Probenbeladung zur Verfügung standen. Die Nutzung von nativen Polyacrylamidgelen hätte für einen einzelnen Gellauf zwar eine etwas kürzere Bearbeitungsdauer und einen leicht verminderten Arbeitsaufwand in der Vorbereitung erfordert, die Ergebnisgele hätten aber aufgrund der geringen Schichtdicke (ca. 0,3 mm) nicht mehr horizontal geteilt werden können.

Die Elektrophorese im Stärkegel und anschliessende Visualisierung der Mt1PDH durch Anfärbung war erfolgreich möglich und brachte zusätzlich die Erkenntnis, dass die Mt1PDH in *Caloglossa leprieurii* vermutlich nur mit einem Isoenzym vorliegt, da bei allen Anfärbungen immer nur ein einzelner Proteinspot detektiert werden konnte (Wendel and Weeden, 1989). Bei einem Vorliegen mehrerer Varianten der Mt1PDH hätte sich in der Enzymfärbung dagegen ein Bandenmuster ergeben. Als Reinigungsschritt im Rahmen eines Aufreinigungsprotokolles erwies sich diese Methode jedoch als völlig ungeeignet, da das Enzym nicht erfolgreich aus dem Gel eluiert werden konnte und wurde zugunsten der chromatographischen Methoden (siehe 4.1.7) aufgegeben.

4.1.3 Proteinbestimmung in den einzelnen Fraktionen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung stehen eine ganze Reihe von Verfahren, angefangen bei quantitativen Aminosäureanalysen wie dem Edman-Abbau (der sehr zeitaufwändig und daher für kurze Zwischenkontrollen eher ungeeignet ist) über Kolorimetrie bis hin zur Spektrometrie (Bestimmung der Absorption der aromatischen

Aminosäurereste bei 280 nm) zur Verfügung. Der Nachweis über Spektrometrie hat den Vorteil, dass keine Denaturierung des Proteins erfolgt (was nachfolgende Analysen des Proteins erlaubt), hat aber den Nachteil, dass zahlreiche Störsubstanzen (z.B. Pufferbestandteile der Probe) das Ergebnis beeinflussen können. Das legt die Verwendung vor allem für bereits gereinigte Proteinlösungen, nicht aber für Proteingemische nahe.

Für Zwischenkontrollen im Zuge der Proteinaufreinigung sind die kolorimetrischen Methoden besonders geeignet, da sie in der Regel schnell und mit geringem Aufwand durchgeführt werden können, wobei das Protein in allen Verfahren denaturiert wird und für den weiteren Aufreinigungsprozess nicht mehr zur Verfügung steht. Zu den bekanntesten kolorimetrischen Verfahren gehören u.a. der BCA (Bicinchoninsäure) Test (Smith et al., 1985) und der Lowry-Test (Lowry et al., 1951), die auf dem Prinzip der Biuret-Reaktion (Gornall et al., 1949) basieren. In beiden Fällen findet eine Cu^{2+} -haltige Nachweislösung Verwendung, welche mit der Peptidbindung reagiert und einen farbigen Komplex bildet, der dann im Spektrophotometer nachgewiesen werden kann (Wiechelman et al., 1988). Beide Verfahren haben aber den Nachteil, dass die Anwesenheit von Ammoniumsulfat, DTT und EDTA den Test stört (Marshall and Williams, 1991), was sie für Proteinbestimmungen im vorliegenden Reinigungsprotokoll gänzlich ungeeignet machte, da diese drei Substanzen notwendige Bestandteile des Extraktionspuffers sind.

Die Proteinbestimmung erfolgte daher nach dem Bradford-Test (Bradford, 1976). Der Nachweis erfolgt hierbei durch den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250, der in saurer Lösung an aromatische und basische Aminosäurereste bindet, was eine Verschiebung des Absorptionsspektrums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm bewirkt. Weitere wichtige Vorteile dieser Methode sind der geringe Zeitaufwand (die Farbentwicklung erfolgt nach 2 min) sowie die geringe Variabilität der Färbung zwischen den einzelnen Proteinen (Read and Northcote, 1981). Der Nachweisbereich für Proteine liegt bei dieser Methode zwischen 0,2 µg und 20 µg. Diese Methode erwies sich als sehr gut für die Proteinbestimmung der angereinigten Fraktionen geeignet. Zur Absicherung der Zuverlässigkeit der Methode wurden stichprobenartig einzelne Proteinextrakte in der Abteilung Mikrobiologie durch Fr. Dr. Katrin Schwarz spektrometrisch überprüft, was die mit der Bradford-Methode ermittelten Werte immer bestätigte. Allerdings zeigten sich im

Verlauf der Arbeiten auch die Grenzen der Bradford-Bestimmung: die gereinigten Proteinlösungen enthielten sehr geringe Proteinmengen dicht an der unteren Sensitivitätsgrenze der Methode. Daher wurden bei der gelelektrophoretischen Überprüfung der Reinheit der Proteinprobe gleichzeitig verschiedene Konzentrationen an BSA als Eichreihe aufgetragen (war auch das Standardprotein im Bradfordtest). Dabei wurde festgestellt, dass die Proteinbestimmung nach Bradford für geringe Konzentrationen nicht mehr sehr zuverlässig ist und besser über die Eichung im SDS-Gel mit anschließender Silberfärbung erfolgen sollte.

4.1.4 Wässriges 2-Phasen-System (ATPS = Aqueous two-phase-system)

Mischt man wässrige Lösungen zweier unterschiedlicher Polymere (z.B. Polyethylenglycol und Dextran) oder ein Polymer und eine hochkonzentrierte Salzlösung (z.B. PEG und Phosphatlösungen), dann bilden sich zwei verschiedene Phasen aus (Chen, 1992). Gibt man ein Gemisch verschiedener Biomoleküle zu diesem Versuchsansatz, dann teilen sich die Inhaltsstoffe auf beide Phasen auf (Albertsson, 1986). Dieses Verfahren ist besonders zur Grobreinigung im Verlauf einer Proteinisolation geeignet (Roy et al., 2007) und wurde für Rotalgen bereits erfolgreich bei der Reinigung der Mannitol-1-Phosphatase (Iwamoto et al., 2001) sowie der Mt1PDH (Iwamoto et al., 2003) aus *Caloglossa continua* genutzt.

Für die Reinigung der Mt1PDH aus *C. lepriurii* hat sich im Verlauf der Untersuchungen die Kombination von 15 % (wt/vol) PEG 6000 und 25 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bewährt. Nach der Zentrifugation verblieben extrazelluläre Polysaccharide und ein Großteil der Phycobilline (Iwamoto and Shiraiwa, 2005) in der sehr viskosen oberen Phase, während sich die Mt1PDH in der unteren, wäßrigen Phase anreicherte. Dadurch konnte eine Aufkonzentrierung der Mt1PDH gegenüber dem Rohextrakt um den Faktor 6,8 erreicht werden. Gleichzeitig war die resultierende Fraktion deutlich weniger viskos als der Rohextrakt, was die spätere Aufkonzentrierung über Ultrafiltration (4.1.6) deutlich erleichterte.

4.1.5 Proteinfällung

Lösliche Proteine bilden unter spezifischen physikalischen und/oder chemischen Voraussetzungen Aggregate und präzipitieren dann. Soll die biologische Aktivität des Proteins dabei erhalten bleiben, beispielsweise weil das Zielenzym in den resultierenden Fraktionen durch einen Aktivitätstest identifiziert werden muss, so empfiehlt sich eine Fällung mit Ammoniumsulfat (Englard and Seifter, 1990). Dabei werden den gelösten Proteinen durch die Zugabe von hohen Konzentrationen an geladenen Ionen (v.a. SO_4^{2-} und NH_4^+) die Hydrathüllen entzogen, was die Aggregation der Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen und damit deren Ausfällung verursacht. Da verschiedene Proteine bei unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen präzipitieren, können durch eine schrittweise Erhöhung der Salzkonzentration und die Entfernung der jeweils ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation bereits die ersten „unerwünschten“ Bestandteile des Rohextraktes in verschiedenen Fraktionen entfernt werden. Dieser Umstand wurde schon oft für die Reinigung von Algenproteinen genutzt (Chu et al., 2006; Winkler et al., 2003; Piedras et al., 2000; Verdel et al., 2000; Kakita et al., 1999). Vorteile der Nutzung von Ammoniumsulfat sind seine gute Löslichkeit (was das Erreichen hoher Ionenstärken in der Fällungslösung ermöglicht) und der Umstand, dass Ammoniumsulfat sich stabilisierend auf Proteinstrukturen auswirkt (Baldwin, 1996). Ein geringfügiger Nachteil ist die Ansammlung einer großen Menge von Ionen in den einzelnen Fraktionen durch die Fällung, welche sich störend auf die nachfolgenden Reinigungsschritte auswirken können. Die Enzymproben müssen daher im Anschluss noch entsalzen werden (siehe 4.1.4), bevor eine Aufreinigung durch verschiedene Chromatographieschritte erfolgen kann.

Da für die Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* bereits durch frühere Untersuchungen bekannt war, dass die Ausfällung mit Hilfe von Ammoniumsulfat unproblematisch ist und die Enzymaktivität nicht beeinträchtigt wird (Karsten et al., 1997a), wurde für die Entwicklung des Aufreinigungsprotokolles erfolgreich diese Methode eingesetzt. Die Bestimmung der Fraktion mit dem größten Anteil an Mt1PDH, welche im Anschluss für die weiteren Reinigungsschritte genutzt wurde, erfolgte durch Enzymaktivitätsmessungen (Methode 2.2.2.1).

4.1.6 Entsalzung und Aufkonzentrierung der Proteinlösung

Einige Schritte des Reinigungsprotokolles verursachten hohe Ionenkonzentrationen in den resultierenden Fraktionen. Da diese Ionen nachfolgende Reinigungsschritte (v.a. die Affinitätschromatographie) durch unerwünschte Interaktionen mit den verwendeten Chromatographie-Matrices stören können, war eine Entsalzung der Proteinlösung erforderlich. Dieser Schritt ist in der Regel mit einer Aufkonzentrierung der Probenlösung verbunden. Dafür standen verschiedene Techniken zur Auswahl: Dialyse, Ultrafiltration und Gelfiltration.

Für die Entsalzung per Dialyse werden semipermeable Membranen genutzt, welche den Durchtritt kleiner Moleküle (z.B. Salze) erlauben, große Biomoleküle aber zurückhalten. Generell kann durch die Dialyse ein schonender Pufferaustausch und gleichzeitig die Entsalzung der Probe erreicht werden, ohne dass die Löslichkeit der Proteine verändert wird oder Enzym durch diesen Vorgang verloren geht. Damit ist die Dialyse theoretisch sehr gut zur Entsalzung von Proteingemischen im Rahmen einer Aufreinigung geeignet und wird oft im Verlauf einer Proteinreinigung genutzt (Lozano et al., 2008; Schwarz et al., 2007; Bella et al., 2007; Dogan and Salman, 2007). Dem gegenüber steht aber der praktische Nachteil des Zeitaufwandes. Die Dialyse selbst dauert in der Regel 12-24 Stunden, für die vorbereitende Rehydratisierung des Membranschlauches sind ebenfalls einige Stunden erforderlich. Frühere Untersuchungen zur Proteinstabilität der Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* haben aber gezeigt, dass die Enzymaktivität bereits 72 Stunden nach der Extraktion trotz konstanter Lagerung bei 4 °C nur noch ca. 41 % des ursprünglich gemessenen Wertes beträgt (Karsten et al., 1997a). Im Rahmen der Entwicklung eines kompletten Reinigungsprotokolles dieses Enzyms wurde daher für die Entsalzung nicht die Dialyse, sondern schnellere Methoden getestet.

Die Ultrafiltration beruht, ähnlich wie die Dialyse, auf der Trennung von Proteinen durch die Verwendung einer semipermeablen Membran mit definierter Porengröße. Dabei werden die kleinen Salz-moleküle durch die Membran gepresst, während die wesentlich größeren Protein-moleküle auf der Membran zurückgehalten werden. Bei dieser Methode erfolgt die Trennung oft mit Hilfe der Schwerkraft, genauer gesagt durch Zentrifugation. Die Proteinlösung wird auf eine Membran mit definierter Ausschlussgröße gegeben, unter der sich ein Auffanggefäß befindet. Durch die spezielle Konstruktion der

Zentrifugenröhrchen und die Verwendung von Festwinkelrotoren wird ein zu starkes Eintrocknen der Proteinlösung vermieden, welches leicht zur Denaturierung der Proteine führen könnte. Dies ist theoretisch ein wichtiger Vorteil gegenüber der Ultrafiltration über Unterdruck (wo ein Austrocknen der Probe bei zu langer Filtration möglich ist), daher wurde diese Methode mit Hilfe von Centricon-Röhrchen der Firma Millipore (Ausschlussgröße der Membran 10 kDa bzw. 30 kDa) im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet. Allerdings erfolgt bei der Zentrifugation kein beständiges Rühren der Proteinlösung, was sich für diesen konkreten Fall als praktischer Nachteil erwies. Die Proteinlösung verstopfte die Membran, sodass auch nach stundenlanger Zentrifugation keine signifikante Reduktion des Probenvolumens erreicht werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Ultrafiltration mit leichtem Druck unter Stickstoff genutzt und zwar hauptsächlich zur Aufkonzentrierung der Proteinlösung nach der Ammoniumsulfatfällung. Langsames Bewegen der Proteinlösung während der gesamten Prozedur mit einem Magnetrührer verhinderte das Verstopfen der Membran. Dadurch wurde das Probenvolumen von teilweise mehr als 30 ml auf ca. 1 ml reduziert, was den anschliessenden Auftrag auf die Affinitätschromatographiesäulchen erheblich vereinfachte. Der zeitliche Aufwand für die Ultrafiltration betrug nur ca. 1 Stunde, was letztlich auch der Grund für die Bevorzugung der Ultrafiltration gegenüber der Dialyse war. Der Entsalzungseffekt war allerdings für die nachfolgenden Chromatographieschritte noch nicht ausreichend (das Protein ging keine Bindung mit der Säulenmatrix ein), daher wurde mit der volumenreduzierten Probe noch eine Gelfiltration durchgeführt.

Die Gelfiltration oder Größenausschlusschromatographie ist eine Säulenchromatographie, die darauf basiert, dass die inerten Partikel der verwendeten Säulenmatrix Poren definierten Durchmessers haben. Größere Moleküle können nicht in diese Poren eindringen und werden ausgeschlossen, während kleinere Moleküle (z.B. verschiedene Salze) in die Poren hinein diffundieren. Dadurch brauchen sie für den Durchlauf der Säule wesentlich länger als die großen Biomoleküle, was die Auftrennung von Proteinen nach den verschiedenen Größen sowie eine Entsalzung von Lösungen ermöglicht (Stellwagen, 1990). Der Aufreinigungseffekt ist dabei relativ gering (Palekar et al., 2000). Die Gelfiltration wird daher größtenteils zur Größenbestimmung bereits gereinigter Proteine (Kim and Lee, 2007; Crab et al., 2002) oder, wie in der vorliegenden Arbeit, zur Entsalzung von Lösungen genutzt (Linnemayr et al., 1998). Dabei war eine Kopplung der

Säule an einen Absorbanz-Detektor zur Identifizierung einzelner Proteinpeaks nicht notwendig, da keine spezielle Proteinfraction identifiziert werden musste, sondern nur eine Abtrennung der Salzmoleküle erreicht werden sollte. Dafür wurden bereits vorgepackte Säulchen der Firma Amersham (Säulenmaterial: Sephadex G-25 superfine; Bettvolumen: 5 ml) genutzt. Diese erlauben über einen speziellen Adapter die Nutzung einer handelsüblichen 25 ml-Spritze zur Beladung der Säule und für den Vorgang der Elution. Dadurch verringerte sich die Bearbeitungszeit für diesen Arbeitsschritt auf insgesamt ca. 30 bis 45 Minuten, während bei Nutzung einer FPLC mehrere Stunden notwendig wären, da beispielsweise die Äquilibration hier deutlich aufwändiger ist und meist nur niedrige Flußgeschwindigkeiten für die Elution genutzt werden können. Diese Methode war auch zum Umpuffern zwischen einzelnen Chromatographieschritten sehr gut geeignet und erwies sich im Verlauf der Arbeiten als große Erleichterung im Umgang mit den Proteinproben während der Aufreinigungsprozedur.

4.1.7 Chromatographische Reinigungsschritte

Der Begriff „Chromatographie“ bezeichnet ganz allgemein Trennmethoden, bei denen Substanzgemische durch eine Verteilung in verschiedenen Phasen in ihre Bestandteile zerlegt werden. Eine dieser Phasen ist dabei in der Regel stationär und besteht aus einer Matrix mit verschiedenen Adsorptionseigenschaften. Die zweite Phase ist flüssig (manchmal auch gasförmig) und enthält die gelöste Probe. Nun wird die mobile Phase an der Stationären vorbeigeführt. Dabei kommt es zu Wechselwirkungen der gelösten Substanzen mit den Molekülen der feststehenden Phase, was die jeweilige Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Bestandteile der Lösung beeinflusst und eine Aufrennung der einzelnen Komponenten ermöglicht (Chicz and Regnier, 1990). Durch die Kombination mit einem geeigneten Detektor, z.B. in einer FPLC-Anlage, können dann einzelne Bestandteile des Durchflusses identifiziert und quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Proteinreinigung die Affinitätschromatographie und die Ionenaustausch-Chromatographie genutzt.

Bei der Affinitätschromatographie werden Proteine aufgrund einer reversiblen Interaktion zwischen dem Protein und einem spezifischen Liganden der Säulenmatrix aus dem Stoffgemisch isoliert (Mohr and Pommerening, 1986). Dabei muss sichergestellt werden,

dass diese Interaktion nicht durch sterische oder biochemische Interferenz zwischen dem Trägermaterial des Liganden und den Biomolekülen gestört wird (Mohr et al., 1980) und der Ligand durch die Kopplung an die Matrix nicht seine spezifischen Bindungseigenschaften verliert. Im Verlauf der Trennung wird der angereinigte Extrakt mit dem Zielprotein in einem Laufpuffer auf die Säule gegeben, wobei das gesuchte Protein an den Liganden - oft ein Substrat des Enzyms oder ein biomimetischer Farbstoff (Clonis et al., 2000; Garg et al., 1996) - bindet, während ein Grossteil der anderen Proteine eluiert wird. Die gebundenen Biomoleküle werden dann im nächsten Schritt durch Zugabe eines Überschusses an Ligand oder Substrat oder auch durch Absenken des pH-Wertes wieder von der Säule eluiert (Ostrove, 1990). Durch die sehr spezifische Bindung zwischen Zielprotein und Ligand können dabei sehr hohe Aufreinigungsfaktoren erzielt werden (Beydemir and Ciftci, 2007; Coban et al., 2007; Rolland et al., 2008).

Für die Aufreinigung von Dehydrogenasen und anderen Nucleotid-abhängigen Enzymen ist der Farbstoff Cibacron-Blue-F3GA (gebunden an den Träger Agarose) als Säulenmatrix besonders gut geeignet, da spezielle Faltungen seiner Sekundärstruktur genau in die Nucleotidbindungsstelle dieser Proteine passen (Durisova et al., 1990; Thompson et al., 1975). Der Farbstoff konnte auch bereits erfolgreich für die Aufreinigung einer Nitratreduktase aus der Rotalge *Gracilaria tenuistipitata* genutzt werden (Lopes et al., 2002). Die Elution erfolgt in der Regel über NAD- bzw. NADH-haltige Puffer (Labrou, 2000; Labrou and Clonis, 1996), kann aber auch durch hohe Salzkonzentrationen erreicht werden (Hidayat et al., 2003). Die Kopplung an eine FPLC-Anlage mit Absorbanzdetektor ermöglicht schliesslich eine schnelle Trennung des Proteingemisches sowie die genaue Identifizierung einzelner Proteinpeaks und garantiert zudem eine hohe Reproduzierbarkeit (Gisch and Reid, 1988). Die ersten Testläufe für die Affinitätschromatographie im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher nach diesem Prinzip durchgeführt. Allerdings konnte nach dem Auftrag von angereinigtem Proteinextrakt aus *Caloglossa leprieurii* im Durchfluss der Säule nie eine Fraktion mit messbarer Mt1PDH-Aktivität nachgewiesen werden. Eine Ursache dafür können die vielfältigen Bindungseigenschaften sein, die der Farbstoff (ein Triazin) neben seiner speziellen Sekundärstruktur noch besitzt, beispielsweise die negativen Ladungen, welche Ionenaustauschereigenschaften verursachen (Zhang and Sun, 2004), oder seine Hydrophobizität (Subramanian and Kaufman, 1980; Zhang and Sun, 2001). Dadurch könnte eine irreversible, unspezifische Bindung der Mt1PDH an den Liganden entstanden sein. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das Zielenzym über die vorgesehene

Bindungsstelle zu fest an den Liganden gebunden hat und deshalb nicht mehr eluiert werden konnte oder die Bindung über eine andere Proteindomäne erfolgte, was eine Inhibierung des Enzyms bewirken kann (Ramesh and Appaji, 1980). Der Farbstoff Cibacron-Blue-F3GA erwies sich also für die Aufreinigung der Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* als ungeeignet und eine weitere Matrix mit einem anderen Farbstoff als Ligand wurde getestet.

Reactive Red 120 ist ebenfalls ein Triazinfarbstoff (Billington et al., 2004), der an Agarose gebunden v.a. für die Aufreinigung von Hydrogenasen (Schneider et al., 1983; Watson et al., 1978) und NADP-abhängigen Dehydrogenasen (Ashton and Polya, 1978) genutzt wird. Seine reversible Bindung an Proteine wird hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert (Kirchberger et al., 1987). Bei der Aufreinigung von Algenproteinen kam dieser Farbstoff bereits mehrfach erfolgreich zum Einsatz (Iwamoto et al., 2003; Ghoshal et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden schwerkraftbetriebene, vorgepackte Säulchen mit Reactive Red-120 Agarose genutzt. Da die Chromatographiesäulchen bei dieser Technik an keine FPLC und somit weder an einen Absorbanzdetektor, noch an einen Fraktionssammler angeschlossen werden, erfolgte die Fraktionierung des Eluates manuell. Dieser Nachteil wurde aber durch die insgesamt sehr einfache Handhabung der Säulen und die daraus resultierende schnelle Bearbeitungszeit wieder ausgeglichen. Die Nutzung von Reactive Red-120 Agarose erwies sich für die Aufreinigung der Mt1PDH als sehr erfolgreich. Im Eluat konnten zwei Fraktionen mit hoher Mt1PDH-Aktivität identifiziert werden, was eine Aufkonzentrierung der Mt1PDH gegenüber dem vorangegangenen Schritt um den Faktor 13,2 erbrachte.

An die Affinitätschromatographie wurde als letzter Reinigungsschritt eine Ionenaustauschchromatographie angeschlossen. Bei dieser Chromatographie trägt die stationäre Phase kovalent gebundene, ionisierbare Gruppen, die entweder positiv (Anionenaustauscher) oder negativ (Kationenaustauscher) geladen sind. Nach Beladung der Chromatographiesäule mit dem angereinigten Extrakt binden die geladenen Gruppen der Proteine an die Matrix und verdrängen dabei die zuvor dort gebundenen, mobilen Ionen. Die Stärke der elektrostatischen Bindung eines Proteins hängt bei diesem reversiblen Vorgang u.a. von pH-Wert und Ionenstärke des Puffers, dem isoelektrischen Punkt des Proteins und der Dichte der Ladungen auf der Matrix ab (Rossomando, 1990).

Die Elution des Zielenzyms erfolgt dann durch Zugabe eines Puffers mit hoher Ionenstärke, was eine Verdrängung des Proteins durch mobile Ionen mit noch größerer Affinität zu den geladenen Bindungsstelle an der Matrix und damit die Elution des Proteins bewirkt.

Um zu überprüfen, welches Matrixmaterial sich am besten für die Reinigung der Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* eignet, wurde in Vorversuchen ein Säulen-Kit der Firma Amersham mit jeweils starken und schwachen Anionen- bzw. Kationenaustauschern genutzt (Säulenvolumen jeweils 1 ml). Dabei zeigte sich, dass das Zielprotein sowohl an Q Sepharose XL (starker Anionenaustauscher) sowie an DEAE Sepharose FF (schwacher Anionenaustauscher) bindet und in beiden Fällen die Elution bei einer KCl-Konzentration zwischen 0,8 M bis 1,0 M erfolgt. Beide Matrices sind gleich gut für die Aufreinigung des Zielenzyms geeignet; im späteren Reinigungsprotokoll wurde DEAE Sepharose FF für die Proteinisolation genutzt. Durch diesen letzten Reinigungsschritt wurde noch einmal eine Konzentrierung der Mt1PDH um den Faktor 13,8 erreicht.

4.1.8 Bewertung des entwickelten Reinigungsprotokolles

Das Reinigungsprotokoll ermöglichte die stufenweise Anreicherung der Mt1PDH aus einem Proteinrohextrakt aus *Caloglossa leprieurii*, bis das Zielenzym im Vergleich zum Rohextrakt 1229-fach aufkonzentriert war (Tab 4.1). Besonders die beiden chromatographischen Reinigungsschritte waren dabei von Bedeutung, da sie jeweils eine Aufreinigung um den Faktor 13 im Vergleich zum vorangegangenen Arbeitsschritt ermöglichten.

Tab. 4.1: Reinigungserfolg der einzelnen Schritte des erarbeiteten Protokolls: die Enzymaktivitäten wurden durch Messung der Reduktion von F6P durch die Mt1PDH bestimmt; der erreichte Reinigungsfaktor wurde aus der spez. EA errechnet und jeweils auf den Wert des Rohextraktes bezogen

Reinigungsschritt	Gesamtproteingehalt in mg	Gesamt-EA in nkat	spez. EA in nkat/mg Protein	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	110,281	642,83	5,83	1,0
ATPS	3,612	142,48	39,45	6,8
Aff. Chr.	0,035	18,06	39,45	89,0
IEX	0,001	3,64	7164,75	1229,1

Eine Erhöhung der Gesamt-Enzymaktivität nach der Fällung mittels PEG und Ammoniumsulfat bzw. nach der Affinitätschromatographie mit Reactive Red 120 Agarose, wie aus der Literatur für die Aufreinigung der Mt1PDH aus *Caloglossa continua* bekannt (Iwamoto et al., 2003), konnte nicht beobachtet werden. Der erzielte Reinigungsfaktor von 1229 liegt für das im Rahmen der vorliegenden Arbeit erarbeitete Protokoll etwas unterhalb des für *Caloglossa continua* erreichten Wertes von 9939-facher Aufkonzentrierung der Mt1PDH; ist aber mit dem anderer Algenenzyme durchaus vergleichbar (z.B. Faktor 1326 für eine Braunalgen-Glykolatoxidase [Iwamoto et al., 1996]). Die spezifische Enzymaktivität der gereinigten Mt1PDH wurde für *Caloglossa leprieurii* dagegen etwas höher als für *Caloglossa continua* bestimmt, bewegt sich aber (mit einer Ausnahme für *Brochothrix thermospacta*) in der gleichen Größenordnung, wie aus der Literatur für die Mt1PDH aus anderen Organismen bekannt (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: spezifische Enzymaktivität der Mt1PDH in verschiedenen Organismen; Daten wurden aus folgenden Veröffentlichungen berechnet: ^avorliegende Arbeit; ^b(Iwamoto et al., 2003); ^c(Singh and Rogers, 1993); ^d(Allocco et al., 1999); ^e(Kiser and Niehaus Jr., 1981); ^f(Suvarna et al., 2000)

Ursprungsorganismus	spez. EA in nkat/mg Protein
<i>Caloglossa leprieurii</i> ^a	7162,7
<i>Caloglossa continua</i> ^b	3817,6
<i>Brochothrix thermospacta</i> ^c	300,6
<i>Eimeria tenella</i> ^d	1092,2
<i>Aspergillus niger</i> ^e	2505
<i>Cryptococcus neoformans</i> ^f	1937,2

Der erreichte Aufreinigungsgrad (überprüft durch SDS-PAGE und 2D-Gelelektrophorese) ist bereits ausreichend, um eine Bestimmung der Aminosäuresequenz mittels MALDI-TOF zu ermöglichen (Simpson, 2004); für weitergehende Untersuchungen (beispielsweise die Charakterisierung der Enzymkinetik, Röntgenstrukturanalysen oder die Analyse mittels NMR) ist allerdings ein höherer Reinigungsfaktor wünschenswert. Dafür könnte eine völlig neue Reinigungsmethode genutzt werden, bei welcher ein Proteingemisch auf einen Stapel aus drei Gelschichten appliziert wird (Atmeh et al., 2008). Das in der Mitte befindliche Polyacrylamidgel ermöglicht dabei eine elektrophoretische Auftrennung. Die Proteine werden nach dem Passieren der angefügten Dialysemembran elektrisch eluiert und liegen dann in bereits stark angereinigter und

aufkonzentrierter Form für weitere Untersuchungen vor. Abhängig von dem dadurch erreichten Reinheitsgrad könnten noch einzelne Chromatographieschritte angeschlossen werden.

Im Verlauf der Arbeiten hat sich aber auch immer wieder gezeigt, dass die Bereitstellung von Biomasse ein limitierender Faktor für die Durchführung der Proteinreinigung und damit der anschließenden Charakterisierung war. Aus 25 g gefriergetrockneter Algenbiomasse (die über einen Zeitraum von mehreren Wochen schrittweise angezogen bzw. per Luftpost von Prof. John West von der University of Melbourne, Australien geschickt werden mussten) konnten in einem einzelnen Reinigungsdurchlauf ca. 1,4 µg Enzym gewonnen werden. Das reicht theoretisch zwar für die Feststellung von einigen Kenngrößen wie Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt und Aufbau aus Proteinuntereinheiten, aber schon für umfangreiche biochemische Versuche zur Ermittlung der Enzymkinetik des gereinigten Proteins oder gar zur Herstellung Mt1PDH-spezifischer Antikörper durch Kaninchenimmunisierung wäre eine größere Menge gereinigten Proteins notwendig.

4.2 Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii*

4.2.1 Ermittlung der Aminosäuresequenz

Nach der Reinigung der Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* sollte die Aminosäuresequenz des Proteins bestimmt werden, was wiederum Rückschlüsse auf die kodierende Gensequenz und die Ableitung spezifischer Primer zur Fischung dieser Sequenz ermöglichen würde. Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Ermittlung einiger Gensequenzen eingesetzt; beispielsweise für die Amplifizierung eines Beta-Lactam-Acylase-Gens aus dem Bakterium *Bacillus badius* (Rajendhran and Gunasekaran, 2007), eines Lektin-Gens aus der Garnele *Penaeus monodon* (Luo et al., 2006) oder eines Lipid-Transfer-Protein-Gens aus der Kuhbohne *Vigna unguiculata* (Carvalho et al., 2006). Nach der Identifizierung der Gensequenz der Mt1PDH könnten dann spezifische Primer für ein umfangreiches Screening verschiedener Rotalgen sowie anderer mannitolproduzierender Organismen auf das Vorhandensein dieses Gens entworfen werden. So könnte geklärt werden, ob alle Rotalgen die Gene für den Mannitolmetabolismus besitzen oder ob die

genetische Ausstattung dieses Stoffwechselweges in den Rhodophyta ausschliesslich in *Caloglossa*, *Rhodella* und *Dixoniella* auftritt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Wege zur Ermittlung der Aminosäuresequenz genutzt: der Edman-Abbau und die Massenspektroskopie (MALDI-TOF).

Beim Edman-Abbau erfolgt die Bestimmung der Aminosäuresequenz eines Proteins durch eine immer wiederkehrende Endgruppenbestimmung am N-Terminus, während die Peptidkette schrittweise abgebaut wird (Edman, 1950). Dafür wird die zu untersuchende Proteinprobe in einem basischen Milieu mit Phenylisothiocyanat (PITC) versetzt, was eine Markierung der N-terminalen Aminosäure bewirkt. Nach der Herstellung eines sauren Milieus wird die Peptidbindung hinter der markierten Aminosäure gespalten und das Abspaltungsprodukt chromatographisch erfasst. Danach wird der Vorgang fortlaufend wiederholt, was zur Abspaltung und Identifizierung der nächsten Aminosäure in der Peptidkette führt usw. Allerdings lassen sich auf diesem Weg nur ca. 30 – 40 Aminosäuren bestimmen, da der Anteil an Verunreinigungen durch bereits abgespaltene PITC-AS-Komplexe mit jedem durchlaufenen Zyklus zunimmt und eine korrekte Bestimmung früher oder später unmöglich macht.

Zur Bestimmung der Aminosäuresequenz nach dieser Methode wurde eine Probe der aufgereinigten Mt1PDH an die Firma SeqLab geschickt. Diese konnte allerdings in zwei voneinander unabhängigen Sequenzierungsläufen keine Aminosäuresequenz ermitteln. Dafür sind mehrere Gründe denkbar. Ist der N-Terminus des Zielproteins im nativen Zustand acetyliert oder durch einen Pyroglutaminsäurerest blockiert, dann kann PITC nicht binden und somit kann auch kein Edman-Abbau durchgeführt werden (Ribeiro et al., 2004; Belozersky et al., 2000). Das ist für Dehydrogenasen bereits beobachtet worden: die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase menschlicher Erythrozyten hat beispielsweise einen durch einen N-Acetyl-Alaninrest blockierten N-Terminus (Camardella et al., 1995). Die vor der Sequenzierung durchgeführte Färbung des Proteins mit Coomassie Brilliant Blau könnte ebenfalls für die Blockade des N-Terminus verantwortlich sein, da die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure Acetylierungen verursachen kann.

Um die Blockade des N-Terminus zu umgehen, könnte ein In-Gel-Verdau der Mt1PDH mit Hilfe von Endoproteinasen vorgenommen werden. Die resultierenden Peptide müssten anschliessend durch Umkehrphase-HPLC fraktioniert und dann erneut einem Edman-Abbau unterzogen werden. Mit Hilfe dieser Methode konnten bereits

Aminosäureteilsequenzen eines Fettsäure-Bindeproteins aus dem Gürteltier *Chaetophractus villosus* (Cavagnari et al., 1998) sowie Teilsequenzen eines Proteins des Lichtsammelkomplexes der Braunalge *Laminaria saccharina* erfolgreich bestimmt werden (Douady et al., 1994).

Eine weitere Möglichkeit der Ermittlung der Aminosäureabfolge der Mt1PDH könnte die Sequenzierung des Proteins vom C-Terminus her sein (Lin et al., 2001). Das Grundprinzip ist mit dem Edman-Abbau vergleichbar, zur Derivatisierung wird hierbei allerdings Tribenzylsilyl-Isothiocyanat (TBS-ITC) genutzt (Liu and Liang, 2001).

Als Alternative zur Sequenzierung bietet sich, v. a. bei der Untersuchung eines Proteins mit blockiertem N-Terminus, die Analyse mittels MALDI an (Vishwanath and McIntosh, 2006; Deraz et al., 2005; Ogino et al., 2004). MALDI steht dabei für *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation* und bezeichnet eine Methode der Massenspektrometrie, mit deren Hilfe die Struktur von Makromolekülen oder Molekülbruchstücken aufgeklärt werden kann (Koomen et al., 2005). Die Lösung mit dem zu untersuchenden Stoff wird dafür mit einer sogenannten Matrix-Lösung, deren Moleküle Energie in einem speziellen UV-Bereich absorbieren, vereint und auf einen Probenteller aufgetragen. Bei der Trocknung des Gemisches ko-kristallisieren dann die Moleküle der Matrix und der Probe. Dabei übertragen die sauren Matrix-Moleküle Protonen auf die Proteine und laden sie positiv auf. Die entstandenen Kristalle werden anschliessend im Hochvakuum des Massenspektrometers mit einem UV-Laser bestrahlt, was eine vaporisierte Matrixwolke verursacht und die zu analysierenden Moleküle als positiv geladene Ionen in die Gasphase bringt. Die Analyse dieser Ionen erfolgt oft durch Nutzung von Flugzeitanalysatoren (=TOF; von: *time of flight*) (Ma et al., 2006). Bei diesem Prinzip werden die Ionen vor dem Eintritt in den Analysator durch ein starkes elektrisches Feld beschleunigt, wobei auf jedes Ion die gleiche Energie pro Ladung übertragen wird. Die letztlich erreichte Geschwindigkeit hängt dann von dem Masse/Ladung-Verhältnis der Ionen ab. Am Ende des Flugrohres erreichen die Ionen den Detektor aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten auch zu unterschiedlichen Zeiten, was als Ergebnis ein Spektrum erzeugt, in dem die Höhe jedes Peaks proportional zur Anzahl der Ionen dieses speziellen Masse/Ladung-Verhältnisses ist. Die Spektren ermöglichen neben der Sequenzbestimmung auch die Ermittlung des Molekulargewichts von Proteinen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Proben der gereinigten Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* für die Sequenzanalyse mittels MALDI-TOF sowohl an die Firma SeqLab in Göttingen, als auch an das MPI in Golm geschickt (einen Kooperationspartner der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie der Uni Rostock). In beiden Fällen konnte allerdings keine Aminosäuresequenz ermittelt werden.

Ein Grund dafür könnte sein, dass der Erfolg dieser Methode immer noch stark von der verwendeten Matrix und der Probenvorbereitung abhängt. Durch unspezifische, chemische Proteinspaltungen während der Probenaufbereitung, die besonders unter leicht sauren Bedingungen auftreten (z.B. Coomassie-Färbung), können Protein- und Peptidartefakten entstehen, die eine Sequenzbestimmung unmöglich machen (Granvogl et al., 2007). Es besteht auch die Möglichkeit, dass aus der Matrix stammende Ionen die Peptidspektren teilweise überdecken und dadurch eine Auswertung der Daten verhindern (Godovac-Zimmermann and Brown, 2001). Erschwerend kommt hinzu, dass es bisher in den zur Identifizierung der Sequenzen notwendigen Datenbanken kaum Informationen über Algenproteine gibt. Eine Überprüfung der Online-Datenbank „BRENDA“ (<http://www.brenda-enzymes.info/>) ergibt für die Rotalgengattung *Caloglossa* beispielsweise nur 11 Treffer (für insgesamt 2 verschiedene Enzyme), für die Gattung *Catenella* sind es sogar nur 5 Treffer (für 3 verschiedene Enzyme). Dagegen stehen für bereits etablierte Modellorganismen wie *Arabidopsis thaliana* (671 Treffer) oder *Escherichia coli* (6200 Treffer) deutlich mehr Informationen zur Verfügung.

Zur Ermittlung der Aminosäuresequenz der Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* mittels MALDI-TOF müsste das Verfahren als Fazit also noch speziell für dieses Zielprotein optimiert werden.

4.2.2 Fischung der Gensequenz mit Hilfe von degenerierten Primern

Neben der Nutzung spezifischer, direkt aus der bekannten Aminosäuresequenz abgeleiteten Primer zur Fischung des korrespondierenden Gens gibt es auch die Möglichkeit, degenerierte Primer - also ein Gemisch aus einander ähnlichen, aber nicht identischen Primern - zu nutzen. Für deren Ableitung werden mittels eines BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; = Algorithmensammlung) bereits bekannte Sequenzen des Zielproteins aus anderen Organismen miteinander verglichen (McGinnis and Madden, 2004). Dies ermöglicht die Identifizierung konservierter Proteinbereiche, die mit einiger

Wahrscheinlichkeit in dieser oder leicht abgewandelter Form auch im Zielprotein vorkommen sollten und die daher als Ausgangssequenz für die Ableitung der Primer dienen (Korf et al., 2003). Nach diesem Prinzip konnte bereits das Gen einer Polyketid-Synthase aus einem Dinoflagellaten erfolgreich ermittelt werden (Kubota et al., 2006). Für den über NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführten BLAST standen bekannte Mt1PDH-Proteinsequenzen von Bakterien (*Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Buchnera* sp. APS, *Bacillus halodurans*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Enterococcus faecalis*, *Geobacillus stearothermophilus*) Mycoplasmen (*Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, *Mycoplasma pneumoniae*) und Pilzen (*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger*, *Paracoccidioides brasiliensis*) zur Verfügung. Die aus diesen Sequenzen abgeleiteten Primer (4 forward, 2 reverse) führten nachweislich zur Amplifikation eines Mt1PDH-Genfragments aus *E. coli* (durch Sequenzierung bestätigt), konnten aber im Verlauf der durchgeführten Arbeiten kein Genfragment aus *Caloglossa*-DNA/cDNA fischen. Das bedeutet nicht zwangsweise, dass die abgeleiteten Primer für *Caloglossa* gänzlich ungeeignet sind; durch Modifikationen des PCR-Programmes, der verwendeten Polymerase und evtl. durch Zufügen von *enhancer*-Lösungen könnte mit diesen Primern noch eine Amplifikation erreicht werden. Eine andere Möglichkeit wäre die Nutzung bereits erfolgreich eingesetzter, degenerierter Primer für das Mt1PDH-Gen aus anderen Organismen. Solche Primer wurden für den phytopathogenen Pilz *Alternaria alternata* (Velez et al., 2007) sowie den Austernseitling *Pleurotus ostreatus* (Chakraborty et al., 2004) beschrieben. Die dabei genutzten Primer und PCR-Strategien könnten in Zukunft auch bei *Caloglossa leprieurii* zum Erfolg führen.

4.2.3 Kreuzreaktionstests mit Mt1PDH-Antikörpern aus *Eimeria tenella*

Antikörper sind globuläre Proteine, die sich nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an Makromoleküle binden; normalerweise geschieht dies im Rahmen der Immunabwehr eines Organismus'. Durch Immunisierung eines Kaninchens mit einem gereinigten Protein können gezielt Antikörper gegen dieses Eiweiß hergestellt werden, die dann für molekularbiologische Untersuchungen genutzt werden können. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen können Proteinproben verschiedener Gewebe eines Organismus' oder auch Proben verschiedener Organismen auf das Vorhandensein des Zielenzyms hin

untersucht werden. Im Verlauf der durchgeführten Arbeiten konnte aus *Caloglossa leprieurii* nicht ausreichend Mt1PDH für eine Kaninchenimmunisierung isoliert werden, jedoch existieren bereits spezifisch gegen die Mt1PDH aus dem Parasiten *Eimeria tenella* gerichtete Antikörper (Allocco et al., 2001). Bei strukturellen Homologien der Mt1PDH aus *Caloglossa* zu ihrem Gegenstück aus *Eimeria* könnte der Antikörper auch an das *Caloglossa*-Enzym binden; solch eine Kreuzreaktion wurde bereits für einen Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase-Antikörper aus *Pseudomonas testosteroni* gegen Gewebeproben verschiedener Vertebraten- und Invertebratenspezies beobachtet (Oppermann et al., 1992). Der Anti-Mt1PDH-Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. John J. Allocco (Department of Parasite Biochemistry and Cell Biology, Merck and Co., Rahway, New Jersey) zur Verfügung gestellt. Allerdings konnte im Verlauf der Untersuchungen keine Kreuzreaktion mit der gereinigten Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii* festgestellt werden. Eine Ursache dafür könnte eine Inaktivierung des Antikörpers während des Imports aus den USA sein. Möglicherweise sind die beiden Mt1PDH-Moleküle aber auch strukturell zu unterschiedlich. In *Caloglossa continua* handelt es sich um ein 53 kDa großes Monomer (Iwamoto et al., 2003), während für *Eimeria* ein Heterotrimer beschrieben wurde (Schmatz, 1997). Für umfangreiche Western-Blot Analysen Mannitol-produzierender Algen ist daher der Weg über die Proteinreinigung aus *Caloglossa*, *Rhodella* oder *Dixoniella* und eine anschließende Kaninchenimmunisierung zu empfehlen.

4.2.4 Bewertung der Eignung von *Caloglossa leprieurii* als Modellorganismus für molekularbiologische Untersuchungen

Im Verlauf der Arbeiten hat sich gezeigt, dass die Ermittlung der Gensequenz für die Mt1PDH über proteinbiochemische Methoden nur über einen hohen methodischen Aufwand und großen Biomasseeinsatz zu bewerkstelligen ist, dabei aber wahrscheinlich nur zur Ermittlung von Teilsequenzen führen wird. Daher scheint es für zukünftige Untersuchungen sinnvoller, auf molekularbiologische Methoden zurückzugreifen. Dazu könnte eine cDNA Bank von *Caloglossa leprieurii* erstellt werden. Grundlage dafür ist die Isolation der RNA aus der Alge, was in der vorliegenden Arbeit bereits erfolgreich ausgeführt werden konnte. Durch reverse Transkription der isolierten RNA in eine doppelsträngige cDNA und deren anschließende Insertion in einen Vektor stünden dann

nach der Vermehrung des Vektors über Phagen oder Bakterien alle transkribierten Gene für molekulargenetische Untersuchungen zur Verfügung.

Makroalgen sind generell vom genetischen Standpunkt aus bis zum heutigen Zeitpunkt nur sehr schlecht untersucht worden; beispielsweise wurde trotz ihrer großen ökologischen und ökonomischen Bedeutung bisher noch kein Genom einer Makroalge sequenziert. Lediglich EST-Untersuchungen für *Porphyra yeoensis* (Nikaido et al., 2000) und die Plastidengenomsequenz von *Gracilaria tenuistipitata* (Hagopian et al., 2004) sind in dieser Hinsicht bereits beschrieben worden. Waaland et al. (2004) haben daraufhin 2004 eine Liste mit Kriterien veröffentlicht, die Makroalgen als Kandidaten für eine Genomsequenzierung und somit auch allgemein für molekularbiologische Untersuchungen qualifizieren. Dabei wird als erster Punkt das Vorhandensein etablierter Laborkulturen angeführt. *Caloglossa leprieurii* erfüllt dieses Kriterium: in der vorliegenden Arbeit wurden solche Kulturen für die Untersuchungen genutzt; die Hälterung der Algen erfolgt bei normaler Raumtemperatur und Lichtklima. Als weiterer wichtiger Punkt wird das Vorhandensein zahlreicher genetischer Informationen durch bereits abgeschlossene Untersuchungen angeführt. Auch diese Vorgabe erfüllt *Caloglossa* voll und ganz: es gibt bereits Sequenzinformationen zu einzelnen Genen (Zuccarello et al., 2000) sowie phylogenetische Untersuchungen (Kamiya, 2004; Zuccarello et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnten aus *Caloglossa leprieurii* erfolgreich sowohl DNA, als auch RNA isoliert und für PCR-Untersuchungen genutzt werden. Alle diese Kriterien zusammen belegen, dass *Caloglossa leprieurii* gut als Modellorganismus für weitere molekularbiologische Untersuchungen zur Klärung der Evolution des Mannitolstoffwechsels in den Rhodophyta geeignet ist.

4.3 Biochemische Charakterisierung der Enzyme des Mannitolmetabolismus' in *Rhodella violacea*

Zu Beginn der Arbeiten war lediglich bekannt, dass die einzelligen Rotalgen *Rhodella violacea* und *Dixoniella grisea* Mannitol produzieren (Karsten et al., 1999); welche Enzyme in diesen Algen am Mannitolmetabolismus beteiligt sind, war völlig offen. Es gibt allerdings noch eine weitere Mannitol-produzierende Rotalge: die Makroalge *Caloglossa leprieurii* (Karsten et al., 1997a), für die bereits umfangreiche biochemische Untersuchungen zur Enzymcharakterisierung der am Mannitolzyklus beteiligten Enzyme

vorliegen (Karsten et al., 1997b). Ausgehend von diesen Daten wurde untersucht, ob die aus *Caloglossa* bekannten Enzyme auch in den beiden Mikrorotalgen nachweisbar sind. Im Verlauf der Arbeiten konnte festgestellt werden, dass sowohl *Rhodella violacea*, als auch *Dixoniella grisea* Aktivitäten aller vier am Mannitolzyklus beteiligten Enzyme aufweisen. Die genaue biochemische Charakterisierung der einzelnen Enzymreaktionen wurde für *Dixoniella grisea* anschliessend in eine von mir mitbetreute Diplomarbeit ausgelagert (Raimund, 2005); die Charakterisierung für *Rhodella violacea* wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Im Vergleich der bisher bekannten Daten aller drei mannitolproduzierenden Rotalgen zeigen sich einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede in der Substratspezifität der einzelnen Enzyme (Tab. 4.3).

Die Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase ist in *Caloglossa leprieurii* sowohl für die oxidative, als auch für die reduzierende Reaktion sehr spezifisch, andere Substrate werden kaum umgesetzt. Für *Dixoniella grisea* ergibt sich ein ähnliches Bild, wogegen *Rhodella violacea* anstelle von Fructose-6-Phosphat auch eine ganze Reihe anderer Substrate reduzieren kann. Dabei wird aber höchstens 25 % der Aktivität des Hauptsubstrates erreicht. Die Oxidationsreaktion ist auch in *Rhodella* sehr spezifisch.

In allen drei Algen ist die Mannitol-1-Phosphat-Phosphatase sehr unspezifisch: jedes in den Untersuchungen angebotene Substrat wurde auch umgesetzt, wobei die dabei erreichte Enzymaktivität oft ungefähr die Hälfte des vom Hauptsubstrat erreichten Wertes erreichte.

Für die Mannitoldehydrogenase zeigte sich für alle drei Mannitolbildner in der katalysierten Oxidationsreaktion, dass neben dem Hauptsubstrat auch eine Reihe anderer Polyole umgesetzt werden können. Die Rückreaktion ist für *Caloglossa* sehr substratspezifisch, für die beiden einzelligen Rotalgen wurden aber mit allen getesteten Zuckern Enzymreaktionen gemessen.

Bei der Charakterisierung der Hexokinase zeigte sich in *Caloglossa* und *Dixoniella*, dass die höchste Enzymaktivität nicht mit Fructose (dem aus dem Mannitolzyklus stammenden Substrat), sondern mit Glucose gemessen werden konnte; Fructose stand mit ungefähr halb so großer Enzymaktivität erst an zweiter Stelle. In *Rhodella* wurde dagegen Fructose mit Abstand als Hauptsubstrat identifiziert. Andere Zucker werden, wenn überhaupt, nur mit einer deutlich geringeren Aktivität umgesetzt.

Betrachtet man alle Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Substratspezifität der einzelnen Enzyme aller drei mannitolbildenden Algen, so lässt sich keine generelle

Tabelle 4.3: Substrat- und Nucleotidspezifitäten der Enzyme des Mannitolzyklus' in angereinigten Rohextrakten aus *Rhodella violacea*; Werte für *D. grisea* und *C. lepriurii* aus: ^a(Raimund, 2005), ^b(Karsten et al., 1997a). Die Hauptsubstrate des Mannitolzyklus sind fett markiert, die höchste Aktivität wurde 100 % gesetzt, die Aktivität der anderen Substrate wurde daraus berechnet. - bedeutet: keine Angaben; n=3

Enzym	Substrat	spez. EA [nkat/mg Protein]			<i>R. violac.</i>	<i>D. grisea</i> ^a	<i>C. lepr.</i> ^b
Mt1PDH (F-6-P Reduktion)	Fructose-6-P	0,084	0,187	0,867	100	100	100
	Glucose-6-P	0,040	0,095	0	25,6	10,5	15,2
	Mannitol-1-P	0,022	0,090	0	24,5	-	-
	Mannose-6-P	0	0,101	0	13,5	2,9	0
	Sorbitol-6-P	0,018	0,078	0	15,7	0	0
	Glycero-P	0	0,090	0	18,0	-	0
	NADPH	0,003	0	0,066	2,7	10,6	0
Mt1PDH (M-1-P Oxidation)	Fructose-6-P	0	0	0,009	1,2	-	-
	Glucose-6-P	0	0,010	0,022	4,0	7,9	0
	Mannitol-1-P	0,241	0,252	0,253	100	100	100
	Mannose-6-P	0	0	0	4,0	24,2	0
	Sorbitol-6-P	0	0	0	1,2	16,1	0
	Glycero-P	0	0,010	0,022	4,6	-	0
	NADP/Mt1P	0	0	0	0	0	3,1
Mt1Pase	Fructose-6-P	3,495	0,031	1,370	85,3	56,8	32,4
	Glucose-6-P	1,135	-	1,058	57,4	-	-
	Mannitol-1-P	2,238	0,032	3,465	100	100	100
	Mannose-6-P	0,630	0,009	0,747	24,2	11	9,9
	Sorbitol-6-P	1,355	0,019	1,038	40,1	35,7	5,0
	PNPP	16,392	0,142	5,955	392,1	-	8,0
	Glycero-P	0,252	0,006	0,021	4,9	-	1,0
MtDH (Mannitol Oxidation)	Arabitol	0,019	0	0,092	20,3	21,4	64,9
	Dulcitol	0	0,017	0,092	20,1	0	0
	Erythritol	0	0	0,032	9,1	-	9,2
	Mannitol	0,512	2,041	0,155	100	100	100
	Sorbitol	0,017	0,152	0,067	24,9	1,2	31
	Xylitol	0,069	0,067	0,118	30,5	2,6	24,8
	NADP/Mannitol	0	0	0	0	8,9	17,5
MtDH (Fructose Reduktion)	Fructose	1,492	0,294	0,721	100	100	100
	Galactose	0,009	0,053	0	6,2	10,8	0
	Glucose	0,012	0,097	0	11,2	14,7	0
	Lactose	0,014	0,035	-	6,4	14	0
	Mannose	0	0,071	0	8,0	17,3	7,1
	Sorbose	0,015	0,059	0,148	13,9	8,4	7,0
	NADPH/Fructose	0,006	0,045	0	3,9	38,5	67,7
HK	Fructose	0,120	0,164	0,167	100	38	42,2
	Galactose	0	0	0,011	2,2	3,3	32,2
	Glucose	0,028	0,006	0,017	11,2	100	100
	Lactose	0	0	0,003	0,7	-	-
	Mannose	0	0	0	0	1,6	22,0
	Sorbose	0	0	0	0	-	-

Übereinstimmung, aber auch kein genereller Unterschied feststellen: *R. violacea* hat eine sehr substratspezifische Hexokinase, *C. lepriurii* eine sehr spezifische Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase und die Werte für *D. grisea* sind in einigen Reaktionen mit den Ergebnissen für *Caloglossa* vergleichbar, in anderen Fällen mit denen von *Rhodella*. Das gleiche Bild ergibt sich bei einem Vergleich der enzymkinetischen Kenngrößen der einzelnen Enzyme aus den drei mannitolbildenden Algen (Tab. 4.4).

Die K_m - und V_{max} -Werte der F6P-Reduktion sind für *Rhodella* mit den aus der Literatur bekannten Daten von *Caloglossa* vergleichbar, während *Dixoniella* für dieses Enzym eine höhere Affinität zwischen Enzym und Substrat (geringerer K_m -Wert) sowie eine deutlich höhere Effizienz (höherer V_{max} -Wert) zeigt. Bei der Oxidation von M1P zeigen dagegen alle drei Algen große Unterschiede in den jeweiligen K_m - und V_{max} -Werten.

Die Untersuchung der Mt-Oxidationsreaktion erbrachte für die beiden Mikroalgen *Rhodella* und *Dixoniella* absolut vergleichbare Werte in der Enzymkinetik, während die Makroalge *Caloglossa* eine leicht höhere Substrataffinität und deutlich geringe Reaktionseffizienz aufweist. Für die entgegen gesetzte Fructosereduktion zeigen allerdings *Dixoniella* und *Caloglossa* vergleichbare K_m -Werte, während *Rhodella* eine deutlich höhere Substrataffinität zeigt. Die Enzymeffizienz differiert zwischen allen drei Algen sehr stark. Bei der Überprüfung der Hexokinase wurden für *Dixoniella* und *Caloglossa* vergleichbare K_m -Werte bestimmt, während der Wert in *Rhodella* ungefähr

Tab. 4.4: Enzymkinetische Kenngrößen Mt1PDH, Mt1Pase, MtDH, HK, aus *R. violacea* im Vergleich mit *D. grisea* und *C. lepriurii*; ^a(Raimund, 2005); ^b(Karsten et al., 1997a); K_m in mM, V_{max} in nkat/mg Protein; - bedeutet: keine Angaben

		<i>Rhodella violacea</i>	<i>Dixoniella grisea</i> ^a	<i>C. lepriurii</i> ^b
Mt1PDH (red)	K_m	1,94	0,41	1,40
	V_{max}	0,16	33,40	4,31
	pH	7,40	7,00	7,00
Mt1PDH (ox)	K_m	1,82	0,58	0,09
	V_{max}	0,44	19,30	1,40
	pH	8,50	kein Optimum	8,50
MtPase	K_m	-	5,20	1,20
	V_{max}	-	9,50	7,44
	pH	-	-	7,20
MtDH (ox)	K_m	2,60	3,43	7,90
	V_{max}	27,69	16,50	0,03
	pH	9,20	9,80	9,00
MtDH (red)	K_m	3,65	64,04	39,00
	V_{max}	133,53	5,20	0,03
	pH	7,00 - 7,40	7,90	7,00
HK	K_m	2,70	0,51	0,19
	V_{max}	4,83	6,90	-
	pH	-	kein Optimum	-

fünf mal höher ist. Die pH-Optima der einzelnen Enzymreaktionen fallen dagegen für alle drei Algen sehr ähnlich aus.

Obwohl alle drei mannitolproduzierenden Rotalgen prinzipiell die gleichen Enzymreaktionen zur Metabolisierung von Mannitol ausführen, konnten in Bezug auf die enzymkinetischen Kenndaten insgesamt keine augenscheinlichen Übereinstimmungen zwischen ihnen, oder auch nur zwischen den beiden Mikroalgen im Vergleich zur Makroalge festgestellt werden. Die Untersuchungen der Substratspezifität und Bestimmung der K_m -/ V_{max} -Werte sind allerdings für alle drei Algen mit durch Ammoniumsulfatfällung angereinigten Extrakten durchgeführt worden. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Extrakte für einzelne Reaktionen zusätzliche regulatorische Elemente (Aktivatoren oder Inhibitoren) enthielten, die das gemessene Ergebnis beeinflussten. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei der Aufreinigung der Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase aus *Caloglossa continua* im Verlaufe des Reinigungsprozesses die gemessene Mt1PDH-Gesamtaktivität des Extraktes in aufeinanderfolgenden Fraktionen deutlich anstieg, was nach Meinung der Autoren auf die Entfernung eines unbekannten Inhibitors aus der Proteinlösung durch den Reinigungsprozess zurückzuführen war (Iwamoto et al., 2003). Daneben sind auch Interferenzen von anderen Enzymen bei der Bestimmung der Enzymkinetiken denkbar. Das Enzym Mannitol-1-Phosphat-Phosphatase wurde bisher für zwei verschiedene *Caloglossa*-Arten charakterisiert: für *C. lepriurii* mit einem angereinigten Rohextrakt (Karsten et al., 1997a) und aus *C. continua* mit dem reinen Protein (Iwamoto et al., 2001). Obwohl es sich dabei um die gleiche Gattung handelt, sind doch deutliche Unterschiede in den Enzymcharakteristika erkennbar (Tab. 4.5), was auf das Vorhandensein unspezifischer Phosphatasen während der Enzymuntersuchungen für *C. lepriurii* zurückzuführen sein dürfte. Die Bestimmung der biochemischen Kenndaten der Enzyme des Mannitolmetabolismus aus *Rhodella violacea* sollte daher in zukünftigen Untersuchungen noch einmal mit gereinigten Proteinen wiederholt werden.

Tab. 4.5: Vergleich von Literaturdaten der enzymatischen Kenngrößen aus *Caloglossa lepriurii* und *Caloglossa continua*; K_m -Werte in mM; V_{max} -Werte in nkat/mg Protein; ^a(Karsten et al., 1997a); ^b(Iwamoto et al., 2001); Mt1P=Mannitol-1-Phosphat, Fruc6P=Fructose-6-Phosphat, Man6P=Mannose-6-Phosphat, PNPP=*p*-Nitrophenyl Phosphat; maximale Enzymaktivität wurde 100 % gesetzt, Enzymaktivitäten der anderen Substrate als Prozentsatz davon berechnet

	K_m -Wert	V_{max}	Mt1P	Fruc6P	Man6P	PNPP
<i>C. lepriurii</i> ^a	1,20	7,44	100 %	32,4 %	9,9 %	8,0 %
<i>C. continua</i> ^b	0,41	708,1	100 %	1,8 %	0,3 %	0 %

Die Wichtigkeit der genauen Kenntnisse über kinetische Daten der einzelnen Enzyme und Regulationsfaktoren des Mannitolstoffwechsels zeigt sich in der Vielzahl von Versuchen, einzelnen Gene dieser Proteine zur Verbesserung der Salz- bzw. Stressresistenz in andere Organismen einzubringen.

Mannitol wird allgemein als potentes organisches Osmolytikum angesehen (Erdmann and Hagemann, 2001) und spielt oft eine wichtige Rolle bei der Bewältigung von Umweltstress in den unterschiedlichsten Organismengruppen: Olivenbäume akkumulieren bei Trockenstress u.a. Mannitol (Sofo et al., 2008; Conde et al., 2007), verschiedene Pilze bewältigen Salzstress mit Hilfe von Mannitol (Bois et al., 2006), der Parasit *Eimeria tenella* nutzt Mannitol als Kohlenstoffquelle bei der Sporulation (Allocco et al., 1999), verschiedene Algen synthetisieren Mannitol als *compatible solute* (Mostaert et al., 1996; Hellebust, 1976; Reed et al., 1985), Mannitol fungiert als Antioxidans (Tandon et al., 2003; Jennings et al., 1998) und hat sich daneben auch als Kryoprotektor für Bakterien bereits bewährt (Ndoye et al., 2007).

Neueste Untersuchungen belegen, dass die Salzresistenz von transgenen Pflanzen durch die importierte Fähigkeit zur Mannitolsynthese erfolgreich verstärkt werden konnte; aus der Literatur sind Erfolge für die Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* (Sickler et al., 2007), die Weihrauchkiefer *Pinus taeda* (Tang et al., 2005), den Weichweizen *Triticum aestivum* (Abebe et al., 2003), die Silberpappel *Populus tomentosa* (Hu et al., 2005) oder den Basmatireis *Oryza sativa* var. *Basmati* (Pujni et al., 2007) bekannt. Die Herstellung solch transgener Pflanzen könnte in der Zukunft wirtschaftlich schlechter entwickelten Ländern wie Pakistan die Nutzung bisher brachliegender Salzböden ermöglichen (Sarwar et al., 2006; Rathinasabapathi, 2000) und hat damit eine enorme Bedeutung für die Ökonomie des jeweiligen Landes. Zur dauerhaften und stabilen Integration dieser Gene in den Zielorganismus werden Kenntnisse über die Kinetik und v.a. die Regulation des eingebrachten Enzyms unerlässlich sein, damit die Funktion des resultierenden Proteins in der transgenen Pflanze nicht unbeabsichtigt durch das Milieu des Zielgewebes unterdrückt wird, weil z.B. der pH-Wert oder die Ionenzusammensetzung eine Inhibierung des eingebrachten Proteins bewirken.

4.4 Ökophysiologische Charakterisierung von *Rhodella violacea*

Die Mikrorotalge *Rhodella violacea* wurde seit ihrer Erstbeschreibung (Wehrmeyer, 1971) bereits ausführlich bezüglich Morphologie (Wehrmeyer and Schneider, 1975; Reuter et al., 1990; Patrone et al., 1991), Struktur genutzter Speicherstoffe (Shimonaga et al., 2008), extrazellulärer Polysaccharide (Evans et al., 1974), Aufbau des Photosyntheseapparates (Desquilbet et al., 2003; Garnier et al., 1995; Reuter et al., 1990; Morschel et al., 1980) und Änderungen im Lichtsammelkomplex bei Eisenmangel (Doan et al., 2003; Marquardt et al., 1999) untersucht; eine genauere Bestimmung der ökophysiologischen Kenndaten fehlte allerdings bislang. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Untersuchungen zum Wachstum bei verschiedenen Salinitäten und Lichtintensitäten durch *in vivo*-Messungen der Chlorophyll a-Fluoreszenz an einem Fluorimeter durchgeführt. Diese Methode ist für benthische Algen bereits gut etabliert (Eggert et al., 2007; Karsten et al., 2006) und kombiniert zudem mehrere Vorteile: sie liefert reproduzierbare Ergebnisse bei geringem methodischen und zeitlichen Aufwand, muss nicht im Vorfeld kalibriert werden und ist nicht invasiv, was die Gefahr einer Kontamination während der Messung minimiert (Gustavs et al., *in press*).

Durch diese Untersuchungen wurde *Rhodella violacea* als euryhaliner Organismus (5-55 PSU) mit einem Wachstumsoptimum bei 25 PSU charakterisiert (Tab. 4.6). Das ist konsistent mit der Tatsache, dass bisher nur marine Fundorte dieser Alge beschrieben wurden (Athanasiadis, 1996; Scagel et al., 1989; Yoshida, 1998). Für *Dixoniella grisea* (die bisher einzig andere bekannte mannitolproduzierende Mikroalge) wurden dagegen

Tab 4.6: Vergleich der Wachstumsraten μ von *Rhodella violacea* (Daten entstammen der vorliegenden Arbeit) mit den bekannten Daten von *Dixoniella grisea*; ^a(Raimund, 2005), das jeweilige Optimum ist fett markiert

Salinität	μ in <i>Rhodella violacea</i>	μ in <i>Dixoniella grisea</i> ^a
10 PSU	0,33	0,63
15 PSU	0,39	0,55
20 PSU	0,41	0,49
25 PSU	0,43	0,46
30 PSU	0,27	-
33 PSU	0,25	0,30
35 PSU	0,20	-
40 PSU	0,28	0,15
45 PSU	0,22	0,18
50 PSU	0,21	
55 PSU	0,19	0,13 (52 PSU)

Brackwassersalinitäten (10 PSU) als Optimum beschrieben (Raimund, 2005). Aber auch *Dixoniella grisea* ist ein euryhaliner Organismus (Eggert et al., 2007), was die Autoren auf die Synthese von Mannitol als osmoprotektive Substanz zurückführen. Für *Rhodella violacea* ist ebenfalls bekannt, dass 72 h nach einem Salzschock bei gesteigerter Salinität bis zu 60 PSU auch proportional höhere Mannitolgehalte nachweisbar sind (U. Nitschke, Universität Rostock, pers. Mitteilung); für an hohe Salinitäten adaptierte Kulturen konnte dies in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht beobachtet werden. Bis zu einer Salinität von ca. 40 PSU wurden auch in diesen Kulturen steigende Mannitolgehalte gefunden, der Trend setzt sich dann aber mit weiter ansteigendem Salzgehalt nicht fort.

Von der Mikroalge *Dunaliella salina* ist bekannt, dass der Schutz bei Langzeit-Salzstress im Laufe der Zeit durch strukturelle Zellveränderungen (Bildung salzhaltiger Vakuolen) erfolgt (Stoynova-Bakalova and Toncheva-Panova, 2003). Darüber hinaus wurde bei Vertretern dieser Gattung ein deutlicher Anstieg antioxidativer Enzyme während Langzeit-Salzstress beobachtet (Jahnke and White, 2003), was nach Ansicht der Autoren ebenfalls zur Bewältigung des andauernden Salzstress beiträgt. Möglicherweise verlagert sich auch *Rhodella violacea* bei Adaptation an Salzstress auf strukturelle Änderungen zum Schutz der Zelle und verstärkt die Mannitolsynthese nur als kurzfristige Antwort (einige Tage nach Auftreten des Stressfaktors) auf eine erhöhte Salinität in der Umgebung; diese Variante sollte bei zukünftigen Untersuchungen überprüft werden.

Der Vergleich der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Anforderungen von *Rhodella violacea* an das Lichtklima mit den aus der Literatur bekannten Daten für *Dixoniella grisea* (Eggert et al., 2007) zeigt ebenfalls geringfügige Unterschiede: während *Rhodella* bei einer PFD von $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ am besten wächst, bevorzugt *Dixoniella* etwas höhere PFDs von ca. $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, wobei dieser Wert interaktiv auch von der Umgebungstemperatur und dem Salzgehalt beeinflusst wird.

Überträgt man die von Waaland et al. (2004) aufgestellten Kriterien der Eignung von Makroalgen für genetische Untersuchungen auf Mikroalgen, so erscheinen sowohl *Rhodella violacea*, als auch *Dixoniella grisea* als Modellorganismen geeignet. Beide liegen in etablierten Laborkulturen vor und sind einfach zu kultivieren, da sie (wie oben stehend diskutiert) für optimales Wachstum an die Umgebungstemperatur und das Lichtklima keine aussergewöhnlichen Ansprüche stellen. Daneben existieren für *Rhodella violacea* bereits umfangreiche genetische Untersuchungen (Yokoyama et al., 2004;

Bernard et al., 1992; Lichtle et al., 1996; Richaud and Zabulon, 1997); für *Dixoniella grisea* steht sogar schon eine EST-Datenbank zu Verfügung, die zukünftig genetische Untersuchungen an Mikroalgen erleichtern soll (Shrestha et al., 2005).

Im Verlauf der Arbeiten zur Isolierung eines einzelnen Enzyms des Mannitolstoffwechsels aus der Makroalge *Caloglossa leprieurii* hat sich die Anzucht von ausreichend Biomasse immer wieder als limitierender Faktor herausgestellt. Da durch die vorliegende Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass auch die bisher bekannten mannitolproduzierenden Mikrorotalgen *Rhodella violacea* und *Dixoniella grisea* die gleiche enzymatische Ausstattung für diesen Metabolismus besitzen, eignen sich beide als Ausweichorganismen für zukünftige Untersuchungen. *Dixoniella* zeigt unter optimalen Bedingungen eine etwas höhere Wachstumsrate als *Rhodella* (Tab. 4.6), was erstgenannte Alge für die Produktion von ausreichend Biomasse im Zuge von umfangreichen biochemischen oder molekularbiologischen Untersuchungen als empfehlenswerter erscheinen lässt. Solche molekularbiologischen Analysen könnten sich nicht nur für die Aufklärung der Evolution des Mannitolmetabolismus in den Rhodophyta als wertvoll erweisen.

Neueste Untersuchungen zeigen, dass der Mannitolstoffwechsel in Pilzen trotz des Vorhandenseins aller dafür notwendigen Enzyme möglicherweise gar nicht zyklisch abläuft, wie seit vielen Jahren angenommen (Solomon et al., 2006). Die Autoren beschreiben *knock-out*-Mutanten des phytopathogenen Pilzes *Stagonospora nodorum* für die Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase und die Mannitol-Dehydrogenase, die trotz des Gendefektes unter bestimmten Voraussetzungen Mannitol synthetisieren. Dies führt die Autoren im weiteren Verlauf zu der Schlussfolgerung, dass in Pilzen über die Mannitoldehydrogenase und die Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase zwei einander ergänzende Synthesewege für Mannitol realisiert werden und der ursprünglich postulierte zyklische Weg (Hult and Gatenbeck, 1978) *in vivo* nicht zur Anwendung kommt. Nach der Etablierung von *Rhodella violacea* und *Dixoniella grisea* als Modellorganismen für die Untersuchung des Mannitolmetabolismus in Rotalgen sollten nach Möglichkeit ebenfalls *knock-out*-Mutanten genutzt werden, um die Bedeutung der einzelnen Enzyme für den Mannitolhaushalt und den Phänotyp der Alge bzw. deren Stressresistenz genauer zu bestimmen.

4.5 Beantwortung der Fragestellungen der Arbeit

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die in der Einleitung genannten Fragestellungen wie folgt beantwortet werden:

A Ermittlung der Gensequenz der Mt1PDH aus *Caloglossa leprieurii*, um Gensonden für die Überprüfung anderer Rhodophyta auf das Vorhandensein der Mannitolgene ableiten zu können

- 1 biochemisch: es konnte erfolgreich ein Protokoll zur Aufreinigung der Mt1PDH entwickelt werden, die Reinheit des isolierten Proteins wurde durch SDS-PAGE und 2D-Gelelektrophorese bestätigt. Die Ermittlung der AS-Sequenz war bisher weder über Edman-Abbau, noch mittels MALDI-TOF möglich.
- 2 molekularbiologisch: Protokolle zur Isolation von DNA und RNA konnten erfolgreich etabliert werden, die Amplifikation von Kontrollgensequenzen ist mit dem isolierten Material problemlos möglich. Teilsequenzen des Gens der Mt1PDH mit Hilfe degenerierter Primer konnten bisher nicht gefischt werden.

B Mannitolmetabolismus in *Rhodella violacea* und *Dixoniella grisea*:

Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die einzelligen Rotalgen *Rhodella violacea* und *Dixoniella grisea* alle vier Enzyme des von *Caloglossa leprieurii* bekannten Mannitolmetabolismus besitzen. Für *Rhodella violacea* wurde in der vorliegenden Arbeit eine biochemische Charakterisierung der enzymkinetischen Kenngrößen dieser Enzyme vorgenommen; für *Dixoniella grisea* wurden diese Untersuchungen in eine von mir mitbetreute Diplomarbeit ausgelagert (Raimund, 2005).

C Ökophysiologische Charakterisierung von *R. violacea* und *D. grisea*

Durch Wachstumsuntersuchen konnte *Rhodella violacea* in der vorliegenden Arbeit als euryhaliner Organismus mit einer Präferenz für moderatere Salzgehalte im umgebenden Milieu (15-25 PSU) charakterisiert werden. Dabei werden Schwachlichtstandorte (Optimum bei PFD von $30 \mu\text{mol Photonen/m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) bevorzugt. Die Charakterisierung von *D. grisea* erfolgte ebenfalls in der ausgelagerten Diplomarbeit (Raimund, 2005). Beide Mikrorotalgen sind leicht zu halten, ermöglichen die Produktion großer Biomassengrößen und liegen in etablierten Laborkulturen vor. Sie eignen sich damit hervorragend als Modellorganismen für weitere biochemische und molekularbiologische Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Aspekte des für Rotalgen ungewöhnlichen Mannitolmetabolismus an der Makroalge *Caloglossa leprieurii* und der Mikroalge *Rhodella violacea* untersucht.

Dabei konnte die Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase (das erste anabolische Enzym des Stoffwechselweges) nach der erfolgreichen Entwicklung und Etablierung eines Aufreinigungsprotokolles in nahezu reiner Form isoliert werden. Die gelelektrophoretische Überprüfung der Proteinreinigung erbrachte im eindimensionalen Gel nur eine einzige Bande, im 2D-Gel zwei einzelne Spots. Das Molekulargewicht des isolierten Proteins wurde durch diese Elektrophorese mit geringfügig > 50 kDa bestimmt; eine Elektrophorese im nativen Stärkegel zeigte, dass die Mt1PDH in *Caloglossa leprieurii* vermutlich mit nur einem Isoenzym vorliegt. Die Identität des isolierten Enzyms wurde durch die photometrische Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität sowie durch *in vivo*-Färbungen in einem nativen Elektrophoresegel bestätigt. Eine Bestimmung der Aminosäuresequenz des isolierten Proteins war weder durch Sequenzierung mittels Edman-Abbau, noch durch MALDI-TOF möglich. Die korrespondierende Gensequenz konnte mit Hilfe degenerierter Primer nicht gefischt werden.

Für die einzelligen Rotalgen *Rhodella violacea* und *Dixoniella grisea* (für die zu Beginn der Arbeiten lediglich bekannt war, dass sie Mannitol als organisches Osmolyt synthetisieren), konnten erstmals alle vier am Stoffwechselweg beteiligten Enzyme über die photometrische Bestimmung der jeweiligen spezifischen Enzymaktivität nachgewiesen werden; im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde aber nur *Rhodella violacea* weiter bearbeitet. Für alle vier Enzyme (zwei anabolische und zwei katabolische) wurden die jeweiligen kinetischen Eckdaten (Substratspezifität, K_m - und V_{max} -Wert) bestimmt. Daneben wurde für *Rhodella* erstmals eine grundlegende ökophysiologische Charakterisierung durch Bestimmung von Wachstumsraten bei verschiedenen Salinitäts- und Lichtstufen vorgenommen. Es konnte festgestellt werden, dass *Rhodella violacea* als Modellorganismus für die Aufklärung des Mannitolstoffwechsels in den Rhodophyta besser geeignet ist, als *Caloglossa leprieurii*, da mit der Mikroalge die benötigten Biomasse-mengen leichter und schneller herangezogen werden können.

6. Literaturverzeichnis

Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol* 131: 1748-1755.

Alban S, Blaschek W (2007) Kohlenhydrate II: Polysaccharide und Polysacchariddrogen. In: *Pharmakognosie — Phytopharmazie* (Hänsel R, Sticher O, eds), pp 515-653. Berlin, Heidelberg.

Albertsson PA (1986) *Partition of cell particles and macromolecules*. New York: John Wiley & Sons.

Allocco JJ, Nare B, Myers RW, Feiglin M, Schmatz DM, Profous-Juchelka H (2001) Nitrophenide (Megasul) blocks *Eimeria tenella* development by inhibiting the mannitol cycle enzyme mannitol-1-phosphate dehydrogenase. *J Parasitol* 87: 1441-1448.

Allocco JJ, Profous-Juchelka H, Myers RW, Nare B, Schmatz DM (1999) Biosynthesis and catabolism of mannitol is developmentally regulated in the protozoan parasite *Eimeria tenella*. *J Parasitol* 85: 167-173.

Ashton AR, Polya GM (1978) The specific interaction of cibacron and related dyes with cyclic nucleotide phosphodiesterase and lactate dehydrogenase. *Biochem J* 175: 501-506.

Athanasiadis A (1996) *Taxonomisk litteratur och biogeografi av Skandinaviska rödalger och brunalger*.

Atmeh RF, Massad TT, Kana'an BM, Abu-Alrob AA (2008) Separation of biomacromolecules by electrofiltration through gel layers. *Analytical Biochemistry* 373: 307-312.

Awise JC, Smith JJ, Ayala FJ (1975) Adaptive differentiation with little genic change between two native California minnows. *Evolution* 29: 411-426.

Baldwin RL (1996) How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J* 71: 2056-2063.

Bank U, Reinhold D, Ansorge S (1991) [Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method]. *Allerg Immunol (Leipz)* 37: 119-123.

Bella A, Sousa NM, Dehimi ML, Watts J, Beckers JF (2007) Western analyses of pregnancy-associated glycoprotein family (PAG) in placental extracts of various mammals. *Theriogenology* 68: 1055-1066.

Belozersky MA, Dunaevsky YE, Musolyamov AK, Egorov TA (2000) Complete amino acid sequence of the protease inhibitor BWI-4a from buckwheat seeds. *Biochemistry-Moscow* 65: 1140-1144.

Bernard C, Thomas JC, Mazel D, Mousseau A, Castets AM, Demarsac NT, Dubacq JP (1992) Characterization of the Genes Encoding Phycoerythrin in the Red Alga *Rhodella-Violacea* - Evidence for A Splitting of the Rpeb-Gene by An Intron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 9564-9568.

- Beydemir S, Ciftci M (2007) In Vitro effects of some drugs on the buffalo (*Bubalus bubalis*) erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase activity. *Revue de Medecine Veterinaire* 158: 431-436.
- Billington RA, Bak J, Martinez-Coscolla A, Debidida M, Genazzani AA (2004) Triazine dyes are agonists of the NAADP receptor. *Br J Pharmacol* 142: 1241-1246.
- Bisson MA, Kirst GO (1979) Osmotic Adaptation in the Marine Alga *Griffithsia monilis* (Rhodophyceae) - Role of Ions and Organic-Compounds. *Australian Journal of Plant Physiology* 6: 523-538.
- Bois G, Bertrand A, Piche Y, Fung M, Khasa DP (2006) Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. *Mycorrhiza* 16: 99-109.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brown AD, Simpson JR (1972) Water relations of sugat-tolerant yeast: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* 72: 589-591.
- Brugerolle G., Taylor F (1977) Taxonomy, cytology and evolution of the Mastigophora. In: *Proceedings of the Fifth International Congress of Protozoology* (Hutner SH, ed), pp 14-28. New York, USA: Pace University, New York.
- Buschmann AH, Correa JA, Westermeier R, Hernandez-Gonzalez MD, Norambuena R (2001) Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture* 194: 203-220.
- Butterfield NJ (2000) *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiology* 26: 386-404.
- Camardella L, Damonte G, Carratore V, Benatti U, Tonetti M, Moneti G (1995) Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase from Human Erythrocytes - Identification of N-Acetyl-Alanine at the N-Terminus of the Mature Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 207: 331-338.
- Carvalho AO, Souza GA, Ferreira BS, Branco AT, Araujo IS, Fernandes KVS, Retamal CA, Gomes VM (2006) Cloning and characterization of a cowpea seed lipid transfer protein cDNA: expression analysis during seed development and under fungal and cold stresses in seedlings' tissues. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 732-742.
- Cavagnari BM, Cordoba OL, Veerkamp JH, Santome JA, Affanni JM (1998) Presence of a fatty acid-binding protein in the armadillo Harderian gland. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30: 465-473.
- Cedillo-Rivera R, Ramirez A, Munoz O (1992) A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 23: 59-61.
- Chakraborty TK, Basu D, Das N, Sengupta S, Mukherjee M (2004) The mannitol cycle in *Pleurotus ostreatus* (Florida). *Fems Microbiology Letters* 236: 307-311.

- Chen JP (1992) Partitioning and Separation of Alpha-Lactalbumin and Beta-Lactoglobulin in Peg Potassium Phosphate Aqueous 2-Phase Systems. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73: 140-147.
- Cheng YP, Hwang SY, Chiou WL, Lin TP (2006) Allozyme variation of populations of *Castanopsis carlesii* (Fagaceae) revealing the diversity centres and areas of the greatest divergence in Taiwan. *Ann Bot (Lond)* 98: 601-608.
- Chicz RM, Regnier FE (1990) High-performance liquid chromatography: effective protein purification by various chromatographic modes. *Methods Enzymol* 182: 392-421.
- Chiovitti A, KRAFT GT, Bacic A, Liao ML (2001) Gelling polysaccharide from Australian seaweeds: research and potential. *Marine and Freshwater Research* 52: 917-935.
- Chu CY, Huang R, Ling LP (2006) Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 33: 967-973.
- Clayton JW, Tretiak DN (1972) Amine-Citrat buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *J Fish Res Bd Can* 29: 1169-1172.
- Clonis YD, Labrou NE, Kotsira VP, Mazitsos C, Melissis S, Gogolas G (2000) Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification. *J Chromatogr A* 891: 33-44.
- Coban TA, Senturk M, Ciftci M, Kufrevioglu OI (2007) Effects of some metal ions on human erythrocyte glutathione reductase: An in vitro study. *Protein and Peptide Letters* 14: 1027-1030.
- Conde C, Silva P, Agasse A, Lemoine R, Delrot S, Tavares R, Geros H (2007) Utilization and transport of mannitol in *Olea europaea* and implications for salt stress tolerance. *Plant and Cell Physiology* 48: 42-53.
- Crab A, Noppe W, Pelicaen C, Van Hoorelbeke K, Deckmyn H (2002) The parasitic hematophagous worm *Haemonchus contortus* inhibits human platelet aggregation and adhesion: Partial purification of a platelet inhibitor. *Thrombosis and Haemostasis* 87: 899-904.
- Deraz SF, Karlsson EN, Hedstrom M, Andersson MM, Mattiasson B (2005) Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology* 117: 343-354.
- Desquilbet TE, Duval JC, Robert B, Houmard J, Thomas JC (2003) In the unicellular red alga *Rhodella violacea* iron deficiency induces an accumulation of uncoupled LHC. *Plant Cell Physiol* 44: 1141-1151.
- Doan JM, Schoefs B, Ruban AV, Etienne AL (2003) Changes in the LHCI aggregation state during iron repletion in the unicellular red alga *Rhodella violacea*. *Febs Letters* 533: 59-62.
- Dogan S, Salman U (2007) Partial characterization of lettuce (*Lactuca sativa* L.) polyphenol oxidase. *European Food Research and Technology* 226: 93-103.

- Douady D, Rousseau B, Caron L (1994) Fucoxanthin Chlorophyll A/C Light-Harvesting Complexes of *Laminaria saccharina* - Partial Amino-Acid-Sequences and Arrangement in Thylakoid Membranes. *Biochemistry* 33: 3165-3170.
- Durisova V, Vrbanova A, Ziegelhoffer A, Breier A (1990) Interaction of Cibacron Blue 3GA and Remazol Brilliant Blue R with the nucleotide binding site of lactate dehydrogenase and (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *Gen Physiol Biophys* 9: 519-528.
- Edman PV (1950) A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Acta Chem Scand* 4: 277-282.
- Eggert A, Raimund S, Michalik D, West J, Karsten U (2007) Ecophysiological performance of the primitive red alga *Dixoniella grisea* (Rhodellophyceae) to irradiance, temperature and salinity stress: growth responses and the osmotic role of mannitol. *Phycologia* 46: 22-28.
- Englard S, Seifter S (1990) Precipitation Techniques. *Methods in Enzymology* 182: 285-300.
- Erdmann N, Hagemann M (2001) Salt acclimation of algae and cyanobacteria: A comparison. In: *Algal adaptation to environmental stress: physiological, biochemical and molecular mechanisms* (Rai LC, Gaur JP, eds), pp 324-361. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Ershov YV, Dmitrovskii AA, Bykhovskii VY (1993) Properties of Beta-Carotene 15,15'-Dioxygenase Stabilized by Lutein and Dithiothreitol During Isolation. *Biochemistry-Moscow* 58: 263-269.
- Evans LV, Callow ME, Percival E, Fareed V (1974) Studies on Synthesis and Composition of Extracellular Mucilage in Unicellular Red Alga *Rhodella*. *Journal of Cell Science* 16: 1-21.
- Fischer H (1984) Turgor Regulation in *Caloglossa leprieurii* (Montagne) J-Agardh (Delesseriaceae, Rhodophyta). *J Exp Mar Biol Ecol* 81: 235-239.
- Flint KP, Hopton JW (1977) Substrate-Specificity and Ion Inhibition of Bacterial and Particle Associated Alkaline-Phosphatases of Waters and Sewage Sludges. *European Journal of Applied Microbiology* 4: 195-204.
- Gang W, Friser A, ter Kuile B, Sali A, Müller M (1999) Convergent evolution of *Trichomonas vaginalis* lactate dehydrogenase from malate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6285-6290.
- Garg N, Galaev IY, Mattiasson B (1996) Dye-affinity techniques for bioprocessing: recent developments. *J Mol Recognit* 9: 259-274.
- Garnier F, Bernard C, Thomas JC (1995) Photoregulation of the Architecture and Pigment Composition of Phycobilisome in *Spirula maxima* (Cyanobacteria) and *Rhodella violacea* (Rhodophyceae). *Cryptogamie Algologie* 16: 140-141.
- Gerlach E, Deuticke B (1963) [A simple method for microdetermination of phosphate in paper chromatography]. *Biochem Z* 337: 477-479.

- Ghoshal D, Mach D, Agarwal M, Goyal A, Goyal A (2002) Osmoregulatory isoform of dihydroxyacetone phosphate reductase from *Dunaliella tertiolecta*: Purification and characterization. *Protein Expression and Purification* 24: 404-411.
- Gisch D, Reid T (1988) Rapid analytical and preparative affinity chromatography using resin-bound cibacron blue F3G-A. *Journal of High Resolution Chromatography* 11: 666-668.
- Godovac-Zimmermann J, Brown LR (2001) Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrometry Reviews* 20: 1-57.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751-766.
- Granvogl B, Ploscher M, Eichacker LA (2007) Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 991-1002.
- Guiry MD (1997) Benthic red, brown and green algae. In: *The Species Directory of the Marine Fauna and Flora of the British Isles and Surrounding Seas* (Howson CM, Picton BE, eds), pp 341-367. Belfast & Ross-on-Wye.
- Hagemann M (1998) Molekulare Mechanismen der Salzanpassung von Cyanobakterien. *Biospektrum* 4/98: 47-48.
- Hagopian JC, Reis M, Kitajima JP, Bhattacharya D, de Oliveira MC (2004) Comparative analysis of the complete plastid genome sequence of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* provides insights into the evolution of rhodoplasts and their relationship to other plastids. *Journal of Molecular Evolution* 59: 464-477.
- Hanes CS (1932) Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochemical Journal* 26: 1406-1421.
- Hegnauer R (1962) *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Basel: Birkhäuser.
- Hellebust JA (1976) Effect of Salinity on Photosynthesis and Mannitol Synthesis in Green Flagellate *Platymonas suecica*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 54: 1735-1741.
- Hernandez I, Fernandez-Engo MA, Perez-Llorens JL, Vergara JJ (2005) Integrated outdoor culture of two estuarine macroalgae as biofilters for dissolved nutrients from *Sparus auratus* waste waters. *Journal of Applied Phycology* 17: 557-567.
- Hidayat C, Nakajima M, Takagi M, Yoshida T (2003) Development of new dye-metal agarose-coated alumina matrix and elution strategy for purification of alcohol dehydrogenase. *J Biosci Bioeng* 95: 133-138.
- Hori H, Osawa S (1987) Origin and Evolution of Organisms As Deduced from 5S Ribosomal-RNA Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 4: 445-472.

- Hu L, Lu H, Liu QL, Chen XM, Jiang XN (2005) Overexpression of *mtlD* gene in transgenic *Populus tomentosa* improves salt tolerance through accumulation of mannitol. *Tree Physiology* 25: 1273-1281.
- Hult K, Gatenbeck S (1978) Production of NADPH in the mannitol cycle and its relation to polyketide formation in *Alternaria alternata*. *Eur J Biochem* 88: 607-612.
- Hult K, Gatenbeck S (1979) Enzyme-Activities of the Mannitol Cycle and Some Connected Pathways in *Alternaria alternata*, with Comments on the Regulation of the Cycle. *Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry and Biochemistry* 33: 239-243.
- Ikawa T, Watanabe T, Nisizawa K (1972) Enzymes involved in the last steps of the biosynthesis of mannitol in brown algae. *Plant and Cell Physiol* 13: 1017-1029.
- Isaacson T, Damasceno CMB, Saravanan RS, He Y, Catala C, Saladie M, Rose JKC (2006) Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature Protocols* 1: 769-774.
- Iwamoto K, Kawanobe H, Ikawa T, Shiraiwa Y (2003) Characterization of salt-regulated mannitol-1-phosphate dehydrogenase in the red alga *Caloglossa continua*. *Plant Physiol* 133: 893-900.
- Iwamoto K, Kawanobe H, Shiraiwa Y, Ikawa T (2001) Purification and characterization of mannitol-1-phosphatase in the red alga *Caloglossa continua* (Ceramiales, Rhodophyta). *Marine Biotechnology* 3: 493-500.
- Iwamoto K, Shiraiwa Y (2005) Technical improvement in the purification of enzymes from red algae using an aqueous two-phase partitioning system. *Phycological Research* 53: 164-168.
- Iwamoto K, Suzuki K, Ikawa T (1996) Purification and characterization of glycolate oxidase from the brown alga *Spatoglossum pacificum* (Phaeophyta). *Journal of Phycology* 32: 790-798.
- Jahnke LS, White AL (2003) Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *J Plant Physiol* 160: 1193-1202.
- Jennings DB, Ehrenshaft M, Pharr DM, Williamson JD (1998) Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 15129-15133.
- Kakita H, Fukuoka S, Obika H, Kamishima H (1999) Isolation and characterisation of a fourth hemagglutinin from the red alga, *Gracilaria verrucosa*, from Japan. *Journal of Applied Phycology* 11: 49-56.
- Kamiya M (2004) Speciation and biogeography of the *Caloglossa leprieurii* complex (Delesseriaceae, Rhodophyta). *Journal of Plant Research* 117: 421-428.
- Karsten, U. *Biologie von Mangrovenalgen*. 1-43. 1997. Universität Bremen.
Ref Type: Thesis/Dissertation

- Karsten U, Barrow KD, Mostaert AS, King RJ (1995) The osmotic significance of the heteroside floridoside in the mangrove alga *Catenella nipae* (Rhodophyta: Gigartinales) in eastern Australia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 40: 239-247.
- Karsten U, Barrow KD, Nixdorf O, West JA, King RJ (1997a/b) Characterization of mannitol metabolism in the mangrove red alga *Caloglossa leprieurii* (Montagne) J. Agardh. *Planta* 201: 173-178.
- Karsten U, Barrow KD, West JA, King RJ (1997c) Mannitol metabolism in the intertidal mangrove red alga *Caloglossa leprieurii*: salinity effects on enzymatic activity. *Phycologia* 36: 150-156.
- Karsten U, King RJ, Kirst GO (1990) The distribution of D-Sorbitol and D-Dulcitol in the red alga genera *Bostrychia* and *Stictosiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) - a re-evaluation. *Br phycol J* 25: 363-366.
- Karsten U, Kirst GO (1989) Incomplete turgor pressure regulation in the "terrestrial" red alga *Bostrychia scorpioides* (Huds.) Mont. *Plant Science* 61: 29-36.
- Karsten U, Klimant I, Holst G (1996) A new in vivo fluorimetric technique to measure growth of adhering phototrophic microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 62: 237-243.
- Karsten U, Schumann R, Rothe S, Jung I, Medlin L (2006) Temperature and light requirements for growth of two diatom species (Bacillariophyceae) isolated from an Arctic macroalga. *Polar Biology* 29: 476-486.
- Karsten U, West JA, Mostaert AS, King RJ, Barrow KD, Kirst GO (1992a) Mannitol in the red algal genus *Caloglossa* (Harvey) J. Agardh. *J Plant Physiol* 140: 292-297.
- Karsten U, West JA, Zuccarello G (1992b) Polyol content of *Bostychia* and *Stictosiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from field and culture. *Bot Mar* 35: 11-19.
- Karsten U, West JA, Zuccarello GC, Engbrodt R, Yokoyama A, Yoshiaki H, Brodie J (2003) Low molecular weight carbohydrates of the Bangiophycideae (Rhodophyta). *J Phycol* 39: 584-589.
- Karsten U, West JA, Zuccarello GC, Nixdorf O, Barrow KD, King RJ (1999) Low molecular weight carbohydrate patterns in the Bangiophyceae (Rhodophyta). *J Phycol* 35: 967-976.
- Keats DW, Knight MA, Pueschel CM (1997) Antifouling effects of epithallial shedding in three crustose coralline algae (Rhodophyta, Corallinales) on a coral reef. *J Exp Mar Biol Ecol* 213: 281-293.
- Keeling PJ (2004) Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *American Journal of Botany* 91: 1481-1493.
- Kim JD, Lee CG (2007) Purification and characterization of extracellular beta-glucosidase from *Sinorhizobium kostiense* AFK-13 and its algal lytic effect on *Anabaena flos-aquae* (Retracted article. See vol 17, pg 1908, 2007). *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 745-752.

- King RJ, Puttock CF (1994) Macroalgae associated with mangroves in Australia. *Bot Mar* 37: 181-191.
- Kirchberger J, Seidel H, Kopperschlager G (1987) Interaction of procion red HE-3B and other reactive dyes with alkaline phosphatase: a study by means of kinetic, difference spectroscopic and chromatographic methods. *Biomed Biochim Acta* 46: 653-663.
- Kirst GO, Bisson MA (1979) Regulation of Turgor Pressure in Marine-Algae - Ions and Low-Molecular-Weight Organic-Compounds. *Australian Journal of Plant Physiology* 6: 539-556.
- Kiser RC, Niehaus Jr. WG (1981) Purification and Kinetic Characterization of Mannitol-1-Phosphate Dehydrogenase from *Aspergillus niger*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 211: 613-621.
- Kjelleberg S, Steinberg P (2001) Surface warfare in the sea. *Microbiology Today* 28: 134-135.
- Klis FM, de Jong M, Brul S, de Groot PWJ (2007) Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. *Yeast* 24: 253-258.
- Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik* 26: 231-243.
- Koomen J, Hawke D, Kobayashi R (2005) Developing an understanding an introduction to biological of proteomics: Mass spectrometry. *Cancer Investigation* 23: 47-59.
- Koopdonk-Kool JM, Van Noorden CJ (1995) A novel quantitative histochemical assay to measure endogenous substrate concentrations in tissue sections. *Fundamental aspects. Acta Histochem* 97: 409-419.
- Korf I, Yandell M, Bedell J (2003) BLAST. O'Reilly Media.
- Kornberg A (1990) Why purify enzymes? *Methods in Enzymology* 182: 1-5.
- Krastanov A (2000) Removal of phenols from mixtures by co-immobilized laccase/tyrosinase and Polyclar adsorption. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 24: 383-388.
- Kremer BP (1976) ¹⁴C-assimilate pattern and kinetics of photosynthetic ¹⁴CO₂-assimilation of the marine red alga *Bostrychia scorpioides*. *Planta* 129: 63-67.
- Kremer BP, Vogl R (1975) Zur chemotaxonomischen Bedeutung des [¹⁴C]-Markierungsmusters bei Rhodophyceen. *Phytochemistry* 14: 1309-1314.
- Kubota T, Iinuma Y, Kobayashi J (2006) Cloning of polyketide synthase genes from amphidinolide-producing, dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29: 1314-1318.
- Labrou NE (2000) Improved purification of *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *Bioseparation* 9: 99-104.

- Labrou NE, Clonis YD (1996) Biomimetic-dye affinity chromatography for the purification of mitochondrial L-malate dehydrogenase from bovine heart. *J Biotechnol* 45: 185-194.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leitet C, Riemann L, Hagstrom A (2006) Plasmids and prophages in Baltic Sea bacterioplankton isolates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86: 567-575.
- Lichtle C, Garnier F, Bernard C, Zabulon G, Spilar A, Thomas JC, Etienne AL (1996) Differential transcription of phycobiliprotein components in *Rhodella violacea* - Light and nitrogen effects on the 33-kilodalton phycoerythrin rod linker polypeptide, phycocyanin, and phycoerythrin transcripts. *Plant Physiology* 112: 1045-1054.
- Lin T, Payne AH, Glish GL (2001) Dissociation pathways of alkali-cationized peptides: Opportunities for C-terminal peptide sequencing. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12: 497-504.
- Lineweaver H, Burk D (1932) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society* 56: 658-666.
- Linnemayr K, Rizzi A, Josic D, Allmaier G (1998) Comparison of microscale cleaning procedures for (Glyco) proteins prior to positive ion matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 372: 187-199.
- Littler MM (1973) Distribution, Abundance, and Communities of Deep-Water Hawaiian-Crustose-Corallinaceae (Rhodophyta, Cryptonemiales). *Pacific Science* 27: 281-289.
- Littler MM, Littler DS, Blair SM, Norris JN (1985) Deepest Known Plant Life Discovered on An Uncharted Seamount. *Science* 227: 57-59.
- Liu Y, Liang S (2001) Chemical carboxyl-terminal sequence analysis of peptides and proteins using tribenzylsilyl isothiocyanate. *J Protein Chem* 20: 535-541.
- Lopes PF, de Oliveira MC, Colepicolo P (2002) Characterization and daily variation of nitrate reductase in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295: 50-54.
- Lottspeich F, Zorbas H (1998) *Bioanalytik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *The journal of biological chemistry* 193: 265-275.
- Lozano JM, Giraldo GI, Romero CM (2008) An improved method for isolation of beta-lactoglobulin. *International Dairy Journal* 18: 55-63.
- Luder UH, Wiencke C, Knoetzel J (2002) Acclimation of photosynthesis and pigments during and after six months of darkness in *Palmaria decipiens* (Rhodophyta): A study to simulate Antarctic winter sea ice cover. *J Phycol* 38: 904-913.

- Luo T, Yang HJ, Li F, Zhang XB, Xu X (2006) Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology* 30: 607-617.
- Ma SG, Chowdhury SK, Alton KB (2006) Application of mass spectrometry for metabolite identification. *Current Drug Metabolism* 7: 503-523.
- Marquardt J, Schultze A, Rosenkranz V, Wehrmeyer W (1999) Ultrastructure and photosynthetic apparatus of *Rhodella violacea* (Porphyridiales, Rhodophyta) grown under iron-deficient conditions. *Phycologia* 38: 418-427.
- Marshall T, Williams KM (1991) Drug interference in the Bradford and 2,2'-bicinchoninic acid protein assays. *Anal Biochem* 198: 352-354.
- Martin S, Castets MD, Clavier J (2006) Primary production, respiration and calcification of the temperate free-living coralline alga *Lithothamnion corallioides*. *Aquatic Botany* 85: 121-128.
- McFadden GI, Roos DS (1999) Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends in Microbiology* 7: 328-333.
- McGinnis S, Madden TL (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* 32: W20-W25.
- Michaelis L, Menten M (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* 49: 333-369.
- Mohr P, Pommerening K (1986) Affinity chromatography - Practical and Theoretical aspects. New York.
- Mohr P, Pommerening K, Kühn M (1980) Molecular aspects of affinity chromatography. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia* 68: 109-119.
- Morschel E, Wehrmeyer W, Koller KE (1980) The Phycobilisome of *Rhodella violacea* - Ultrastructure and Biochemistry of A Light Harvesting Center. *European Journal of Cell Biology* 22: 281.
- Mostaert AS, Karsten U, King RJ (1995a) Inorganic ions and mannitol in the red alga *Caloglossa leprieurii* (Ceramiales, Rhodophyta): Response to salinity change. *Phycologia* 34: 501-507.
- Mostaert AS, Karsten U, King RJ (1995b) Physiological responses of *Caloglossa leprieurii* (Ceramiales, Rhodophyta) to salinity stress. *Phycological Research* 43: 215-222.
- Mostaert AS, Orlovich DA, King RJ (1996) Ion compartmentation in the red alga *Caloglossa leprieurii* in response to salinity changes: Freeze-substitution and X-ray microanalysis. *New Phytol* 132: 513-519.
- Müller KM, Ellenor DW, Sherwood AR, Sheath RG, Cannone JJ, Gutell RR (2005) Evidence for lateral transfer of an IE intron between fungal and red algal small subunit rRNA genes. *Journal of Phycology* 41: 380-390.

- Nakamura Y, Ikawa T (1993) Purification and Properties of NADH - Nitrate Reductase from the Red Alga *Porphyra yezoensis*. *Plant and Cell Physiology* 34: 1239-1249.
- Ndoye B, Weekers F, Diawara B, Guiro AT, Thonart P (2007) Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Subsaharan Africa. *Journal of Food Engineering* 79: 1374-1382.
- Neuhoff V, Arnold N, Taube D, Ehrhard W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262.
- Nikaido I, Asamizu E, Nakajima M, Nakamura Y, Saga N, Tabata S (2000) Generation of 10,154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red alga, *Porphyra yezoensis*. *DNA Research* 7: 223-227.
- Ogino T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Kohara M, Nomoto A (2004) Membrane binding properties and terminal residues of the mature hepatitis C virus capsid protein in insect cells. *Journal of Virology* 78: 11766-11777.
- Oliveira MC, Bhattacharya D (2000) Phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the secondary endosymbiotic origin of algal plastids. *American Journal of Botany* 87: 482-492.
- Oppermann UCT, Maser E, Hermans JJR, Koolman J, Netter KJ (1992) Homologies Between Enzymes Involved in Steroid and Xenobiotic Carbonyl Reduction in Vertebrates, Invertebrates and Procaryotes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43: 665-675.
- Ostrove S (1990) Affinity chromatography: general methods. *Methods Enzymol* 182: 357-371.
- Ozsoy ED (2007) Distinct electrophoretic polymorphism pattern at alcohol dehydrogenase (Adh) locus of *Drosophila melanogaster* natural populations from Turkey. *Genetika* 43: 189-193.
- O'Farrell PH (1975) High Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-4021.
- Pacaud-Mercier K, Blaghen M, Lee KM, Tritsch D, Biellmann JF (2007) Electron transfer from NADH bound to horse liver alcohol dehydrogenase (NAD⁺ dependent dehydrogenase): visualisation of the activity in the enzyme crystals and adsorption of formazan derivatives by these crystals. *Bioorg Chem* 35: 59-67.
- Palekar AA, Vasudevan PT, Yan S (2000) Purification of lipase: A review. *Biocatalysis and Biotransformation* 18: 177-200.
- Palermo JA, Flower PB, Seldes AM (1992) Chondriamide-A and Chondriamide-B, New Indolic Metabolites from the Red Alga *Chondria* sp. *Tetrahedron Letters* 33: 3097-3100.
- Patrone LM, Broadwater ST, Scott JL (1991) Ultrastructure of Vegetative and Dividing Cells of the Unicellular Red Algae *Rhodella violacea* and *Rhodella maculata*. *J Phycol* 27: 742-753.

- Pauling L (1948) La Structure des Complexes et Linfluence de Cette Structure Sur les Reactions Dechange. Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique 45: 142-146.
- Pedersen M, Collen J, Abrahamsson K, Ekdahl A (1996) Production of halocarbons from seaweeds: An oxidative stress reaction? Scientia Marina 60: 257-263.
- Piedras P, Munoz A, Aguilar M, Pineda M (2000) Allantoate amidinohydrolase (allantoicase) from *Chlamydomonas reinhardtii*: Its purification and catalytic and molecular characterization. Archives of Biochemistry and Biophysics 378: 340-348.
- Post E (1964) Bostrychietum aus dem Nationalpark von Melbourne. Rev Algol 7: 242-255.
- Prasankok P, Ota H, Toda M, Panha S (2007) Allozyme variation in the camaenid tree snails *Amphidromus atricallosus* (Gould, 1843) and *A. inversus* (Muller, 1774). Zoolog Sci 24: 189-197.
- Pujni D, Chaudhary A, Rajam MV (2007) Increased tolerance to salinity and drought in transgenic indica rice by mannitol accumulation. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 16: 1-7.
- Ragan MK, Bird CJ, Rice EL, Gutell RR, Murphy CA, Singh RK (1994) A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. Proc Nat Acad Science U S A 91: 7276-7280.
- Raimund, S. Ökophysiologische Charakterisierung ausgewählter Vertreter primitiver Rotalgen (Bangiophyceen). 2005. Universität Rostock.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Rajendhran J, Gunasekaran P (2007) Molecular cloning and characterization of thermostable beta-lactam acylase with broad substrate specificity from *Bacillus badius*. Journal of Bioscience and Bioengineering 103: 457-463.
- Ramesh KS, Appaji RN (1980) Inhibition of monkey liver serine hydroxymethyltransferase by Cibacron Blue 3G-A. Biochem J 187: 249-252.
- Rathinasabapathi B (2000) Metabolic engineering for stress tolerance: Installing osmoprotectant synthesis pathways. Annals of Botany 86: 709-716.
- Read SM, Northcote DH (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. Anal Biochem 116: 53-64.
- Reed RH, Davison IR, Chudek JA, Foster R (1985) The osmotic role of mannitol in the Phaeophyta: an appraisal. Phycologia 24: 35-47.
- Renn D (1997) Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: Status, needs and prospects. Trends in Biotechnology 15: 9-14.
- Reuter W, Nickel C, Wehrmeyer W (1990) Isolation of Allophycocyanin-B from *Rhodella violacea* Results in A Model of the Core from Hemidiscoidal Phycobilisomes of Rhodophyceae. Febs Letters 273: 155-158.

- Ribeiro SP, Mendes MA, dos Santos LD, de Souza BM, Marques MR, de Azevedo WF, Palma MS (2004) Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* 25: 2069-2078.
- Richaud C, Zabulon G (1997) The heme oxygenase gene (pbsA) in the red alga *Rhodella violacea* is discontinuous and transcriptionally activated during iron limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11736-11741.
- Rolland D, Raymond F, Gauthier M, Fournier C, Chaffier JP, Jolivet M, Dantigny P (2008) Strategies for improving production and purification of a recombinant protein: rP30 of *Toxoplasma gondii* expressed in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 861: 186-195.
- Rossomando EF (1990) Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol* 182: 309-317.
- Roy I, Mondal K, Gupta MN (2007) Leveraging protein purification strategies in proteomics. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 849: 32-42.
- Sarwar N, Yousaf S, Jamil FF (2006) Induction of salt tolerance in chickpea by using simple and safe chemicals. *Pakistan Journal of Botany* 38: 325-329.
- Saunders GW, Hommersand MH (2004) Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *American Journal of Botany* 91: 1494-1507.
- Scagel RF, Gabrielson PW, Garbary DJ, Golden L, Hawkes MW, Lindstrom SC, Oliveira JC, Widdowson TB (1989) A synopsis of the benthic marine algae of British Columbia, southeast Alaska, Washington and Oregon.
- Schmatz DM (1997) The mannitol cycle in *Eimeria*. *Parasitology* 114: S81-S89.
- Schneider K, Pinkwart M, Jochim K (1983) Purification of hydrogenases by affinity chromatography on Procion Red-agarose. *Biochem J* 213: 391-398.
- Schopf JW (1970) Precambrian Micro-Organisms and Evolutionary Events Prior to Origin of Vascular Plants. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 45: 319-&.
- Schwarz K, Fiedler T, Fischer RJ, Bahl H (2007) A Standard Operating Procedure (SOP) for the preparation of intra- and extracellular proteins of *Clostridium acetobutylicum* for proteome analysis. *Journal of Microbiological Methods* 68: 396-402.
- Shaw CR, Prasad R (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. *Biochem Genet* 4: 297-330.
- Shimonaga T, Konishi M, Oyama Y, Fujiwara S, Satoh A, Fujita N, Colleoni C, Buleon A, Putaux JL, Ball SG, Yokoyama A, Hara Y, Nakamura Y, Tsuzuki M (2008) Variation in Storage alpha-glucans of the Porphyridiales (Rhodophyta). *Plant Cell Physiol* 49: 103-116.

- Shrestha RP, Lapidot M, Chalifa-Caspi V, Arad S, Weinstein Y (2005) Comparative genomics of the red microalgae *Porphyridium sp* and *Dixoniella grisea* (Rhodophyta). *Journal of Biotechnology* 118: S18-S19.
- Sickler CM, Edwards GE, Kiirats O, Gao ZF, Loescher W (2007) Response of mannitol-producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. *Functional Plant Biology* 34: 382-391.
- Simpson RJ (2004) Purifying Proteins for Proteomics: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- Singh S, Rogers PJ (1993) Isolation and characterization of Mannitol-1-Phosphate Dehydrogenase from *Brochothrix thermosphacta*. *J Gen Appl Microbiol* 39: 327-337.
- Smit AJ (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology* 16: 245-262.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
- Smithies O (1955) Zone Electrophoresis in Starch Gels - Group Variations in the Serum Proteins of Normal Human Adults. *Biochemical Journal* 61: 629-641.
- Sofo A, Manfreda S, Fiorentino M, Dichio B, Xiloyannis C (2008) The olive tree: a paradigm for drought tolerance in Mediterranean climates. *Hydrology and Earth System Sciences* 12: 293-301.
- Sogin ML (1991) Early evolution and the origin of eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development* 1: 457-463.
- Solomon PS, Waters ODC, Jorgens CI, Lowe RGT, Rechberger J, Trengove RD, Oliver RP (2006) Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch). *Biochemical Journal* 399: 231-239.
- Stellwagen E (1990) Gel filtration. *Methods Enzymol* 182: 317-328.
- Stoyanova-Bakalova E, Toncheva-Panova T (2003) Subcellular adaptation to salinity and irradiance in *Dunaliella salina*. *Biologia Plantarum* 47: 233-236.
- Su X, Gibor A (1988) A Method for RNA Isolation from Marine Macro-Algae. *Analytical Biochemistry* 174: 650-657.
- Subramanian S, Kaufman BT (1980) Dihydrofolate reductases from chicken liver and *Lactobacillus casei* bind Cibacron blue F3GA in different modes and at different sites. *J Biol Chem* 255: 10587-10590.
- Suvarna K, Bartiss A, Wong B (2000) Mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans* is a zinc-containing long-chain alcohol/polyol dehydrogenase. *Microbiology* 146 (Pt 10): 2705-2713.
- Tandon SK, Singh S, Prasad S, Khandekar K, Dwivedi VK, Chatterjee A, Mathur N (2003) Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicology Letters* 145: 211-217.

- Tang W, Peng XX, Newton RJ (2005) Enhanced tolerance to salt stress in transgenic loblolly pine simultaneously expressing two genes encoding mannitol-1-phosphate dehydrogenase and glucitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 139-146.
- Thompson ST, Cass KH, Stellwagen E (1975) Blue Dextran Sepharose - Affinity Column for Dinucleotide Fold in Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 669-672.
- Turker AR (2007) New sorbents for solid-phase extraction for metal enrichment. *Clean-Soil Air Water* 35: 548-557.
- Van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM (1995) *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Velez H, Glassbrook NJ, Daub ME (2007) Mannitol metabolism in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics and Biology* 44: 258-268.
- Verdel EF, Kline PC, Wani S, Woods AE (2000) Purification and partial characterization of haloperoxidase from fresh water algae *Cladophora glomerata*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 125: 179-187.
- Vishwanath VA, McIntosh JM (2006) Synthesis of fluorescent analogs of alpha-conotoxin MII. *Bioconjugate Chemistry* 17: 1612-1617.
- Waaland JR, Stiller JW, Cheney DP (2004) Macroalgal candidates for genomics. *Journal of Phycology* 40: 26-33.
- Watson DH, Harvey MJ, Dean PD (1978) The selective retardation of NADP+-dependent dehydrogenases by immobilized procion red HE-3B. *Biochem J* 173: 591-596.
- Wattier RA, Prodohl PA, Maggs CA (2000) DNA isolation protocol for red seaweed (rhodophyta). *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 275-281.
- Wehrmeyer W (1971) Electron Microscopic Study on Fine Structure of *Porphyridium violaceum* Kornmann with Remarks on Its Taxonomic Position. *Archiv für Mikrobiologie* 75: 121-139.
- Wehrmeyer W, Schneider H (1975) Electron-Microscopic Studies on Reversible Changes of Chloroplast Fine-Structure of *Rhodella violacea* Following Nitrogen Deficiency. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 168: 519-532.
- Wendel JF, Weeden NF (1989) Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. In: *Isozymes in Plant Biology* (Soltis PS, ed), pp 5-45. Dioscorides Press.
- Westermeier R, Gronau-Czybulka S, Habeck C, Schickle HP, Theßeling G, Wiesner P (1990) *Elektrophorese-Praktikum*. Weinheim, New York, Basel, Cambridge: Wiley-VCH.
- Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175: 231-237.

- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19.
- Winkler U, Saftel W, Stabenau H (2003) A new type of a multifunctional beta-oxidation enzyme in *euglena*. *Plant Physiology* 131: 753-762.
- Witvrouw M, Este JA, Mateu MQ, Reyman D, Andrei G, Snoeck R, Ikeda S, Pauwels R, Bianchini NV, Desmyter J, Declercq E (1994) Activity of A Sulfated Polysaccharide Extracted from the Red Seaweed *Aghardhiella tenera* Against Human-Immunodeficiency-Virus and Other Enveloped Viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 5: 297-303.
- Wolff JB, Kaplan NO (1955) Hexose Phosphate and Hexose Reductase. *Methods in Enzymology* 1: 346-350.
- Yokoyama A, Sato K, Hara Y (2004) The generic delimitation of *Rhodella* (Porphyridiales, Rhodophyta) with emphasis on ultrastructure and molecular phylogeny. *Hydrobiologia* 512: 177-183.
- Yoon HS, Muller KM, Sheath RG, Ott FD, Bhattacharya D (2006) Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 42: 482-492.
- Yoshida T (1998) Marine algae of Japan. Tokio: Uchida Rokakuho Publishing.
- Zhang S, Sun Y (2001) Further studies on the contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to protein adsorption on dye-ligand adsorbents. *Biotechnol Bioeng* 75: 710-717.
- Zhang S, Sun Y (2004) A model for the salt effect on adsorption equilibrium of basic protein to dye-ligand affinity adsorbent. *Biotechnol Prog* 20: 207-214.
- Zuccarello GC, Bartlett J, Yeates PH (2000) Differentiation of *Caloglossa leprieurii* (Rhodophyta) populations in northern and eastern Australia using plastid haplotypes. *European Journal of Phycology* 35: 357-363.
- Zuccarello GC, Yeates PH, Wright JT, Bartlett J (2001) Population structure and physiological differentiation of haplotypes of *Caloglossa leprieurii* (Rhodophyta) in a mangrove intertidal zone. *J Phycol* 37: 235-244.

7. Anhang

7.1 Proteinsequenzen Mt1PDH verschiedener Organismen

Zur Ableitung degenerierter Primer wurde ein BLAST der bekannten, nachfolgend aufgeführten Aminosäuresequenzen der Mt1PDH durchgeführt.

Klebsiella pneumoniae

MKALHFGAGNIGRGGFIGKLLADAGIELTFADVNTVLDALNARHSYQVHVVGGEN
EQVDTVSGVNAVSSIGDEVVDLIAEVDVTTAVGPVALERIAPAIAKGLAQRKAQ
GTERPLNIIACENMVRGTTQLKGHVFNALAEEDKAWVEAHIGFVDSAVIDRIVPPS
ASATHDPLEVTVETFEWIVDKTQFKGALPTIPGMELTDNLMAFVERKLFTLNTG
HAITAYLGKLAGHQITRDAILDKKIRAVVQGAMEESGAVLIKRYAFDPQKHAAYI
QKILGRFENPYLKDDVERVGRQPLRKLSAGDRLIKPLLGTLEYGLPHRNLVKGIA
AAMHFRSEDDPQAQELAALIADKGPQAALAQISGLDAASDVVAEAVNDYNAEK

Streptococcus mutans

MKKAVHFGAGNIGRGGFIGQILFENGFAIDFVDVNDKIINALNERHSYDIEIAEDGK
RHITVSNVAGINNKENPQAVIDAVAETELITTAIGPNILPFIAQLIAKGIKRRESQN
QTPLDIIACENMIGGSAFLWQEVQKYLSDGLAFADYIGFPNAAVDRIVPAQVH
KDPLFVVVEPFSEWVVETAAMKNPDLKLSSVHYEENLEPFIERKLFSVNSGHATT
AYTGAYFGAKTVLEALKDQQVKEQVKAVLGEIRQLLMKWQFKENDLKVYHD
IISRFEENPYIVDDVTRVARTPIRKLGYDERFIRPIRELKDRGLSYEYLLQTVAYVFH
YKDSNDEQSVQLKMLLQEKSLKAVVKEVTGLTDAALIEEIVTSVESLD

Cryptococcus neoformans

MSTLSNFTIPKTQTAADVVKTTGAELAIEKEHPVKQASELGPGQCLVKISHTGVCH
TDLHAKSGDWPVPPSHPLIGGHEGVGIIAIGDHTAASPVKLGDRVGKWLADSC
LSCEYCRRGYEMNCPNVKLSGYTTDGTSEYVVSFVNHVTPIPESLDSAGAASIL
CAGVTITYKALKVSNTKVGDWVALPGAGGGLGHLAVQYAKAMGLKVIAIDSGA
AKEKLVKSLGADAWVDFKTSKDIVADIKAAATGGDGPAAAVVTAANKTGYAQAI
EYLKPSGTLVAVGMPDAEMGANVFWTVFKSIRIQGSYVGNRQDAIEALDIAASG
QVKVVFEKGLDSLKGVFEDLEAGKIAGRVLKVSDE

Buchnera sp. APS

MKALQFGAGNIGRGGFIGKTLSESGFSVIFSDVNQNIVDAINYNREYFVKIIGSNQN
KTVNIKRVSAINSNDSNIKKIISVDLITTAVGPTALEKIALIITQGIIFKIKNQFTKPL
NIIACENKIKSSSFLKQVVLKNLPIKYHDYLNKYIGFIDCSIDTIIPAINNKDDLFTV
EEFKEWIVNINQFKGAVPKIVDMKFSNNLDAFIERKLFTLNTGHAIAAYLGLIKNY
KTIQDAISDKKIRVIVRSAMEESGSVLIKRYNFNKNDHLDYIEKIFLRFENPFLSDK
LERIGRNPLQKLRRERLIKPLGAFEYNLPYSNLAKGIAAAFYHNKNDLESIEL
SSSIKKQGLESTIIKICDLPVNSKEVYSIILEYNLIKKIIR

Bacillus halodurans

MKAIHFGAGNIGRGGFIGALLSKANYEVVFDVNAQVIDRLNEQRSYTVLTADED
NEENVIHNVRLNSRTQMEQVLAEIATADLVTTAVGPSVLPHLAHPIGQGLLQRN
GAPIQVIACENAIGASSMLQEYTKASLSEEWKSVDRVTGFPNATVDRIVPAQDH
ADPLTVSVEPFYEWVIETKSMKGEPPTIDGVTYVEDLTPYIERKLFTVNTGHAMV
AYLGFQKGLMTIKEAISDQTIAEKTRQALAETKGLLVHKYNFSPEAHDEYIEKIFK
RYNNPYLSRDRVERVGRNPIRKLGYNERLVKPARQLLDLGHQPTALLAGIQAAFA
FFVEDDQESMELQEKRVQGLEQTVVEVTGLPAVHPLVQMIVGNN

Bacillus subtilis

MIALHFGAGNIGRGGFIGALLHHSYGVDVVFADVNETMVSLLEKKEYTVELAEEG
 RSSEIIGPVSAINSGSQTEELYRLMNEAALITTAVGPNVLKLIAPSAEGLRRRNTA
 NTLNIIACENMIGGSSFLKKEIYSHLTEAEQKSVSETLGFPNSAVDRIVPIQHHEDP
 LKVSVEPFFFEWVIDESGFKGKTPVINGALFVDDLTPYIERKLFTVNTGHAVTAYV
 GYQRGLKTVKEAIDHPEIRRVVHSALLETGDYLVKSYGFKQTEHEQYIKNQRSLL
 KSFHFGRC DPRSEVTSQKTGRKCRLVGPAKKIKEPNALAEGLAAALRFDFTGDPE
 AVELQALIEEKDTAAYFKRCAAFSPMNRCTPSF

Clostridium acetobutylicum

MKALHFGAGNIGRGGFIGYLLYKSNYETTFVDIFDKVDDINKYKRYTVITLSTSK
 NKEKVENVRVAVNLKDSVALEKEVLEADLITSLGLNNLKSTGELLRGFLKKRSEI
 NDKPLDIIACENALFASDVLLKAILDGADEELKKYLEKSVGFPNCTVDRIVPNVDI
 EKELPIDVAVEDFYEWIEKNKVKINNKIIGA EYVEKLDPYLERKLFLNGAHATI
 AYLGYLKG YKYIHEAIKDKEINKIIVGFHSEAVQALSEKHKIDIQILKEYSNKLLKR
 FENEYLKDDVSRVGRDPMRKLSSNDRLITPLKLCDDLKIDFTNILFGVASGYLFNY
 KEDEKAQGIQNIITKEGIKKAISNVSQIKEGDYLNMIAYKYEELKKQN

Enterococcus faecalis

MNAVHFGAGNIGRGGFIGEILAKTGFI LPFVDVNGNHHQALKERKSYTIELADASH
 QQINVENTGLNNMTEPEKVVEAIAEADLVTTAIGPNILPRIAELIAQGIDARAEA
 NCQNGPLDIIACENMIGGSTFLAEEVAIIFEKPSLSEQWIGFPDAAVDRIVPLQKHK
 DPLFVQVEPFCEWVIDDTNRKAKEIQLEGVITCRLEPYIERKLFSVTSGHATVAYT
 GALLGYQTIDEAMQDALVVAQLKSVLQETGKLLVAKWNFDEQEHAAYIEKIINR
 FQNKYISDAITRVARTPIRKLGAQERFIRPIRELQERNLVSAAFIAMIGIVFN YHDPE
 DEQSRQLQEMLDQESVDTVDR

Mycoplasma mycoides subsp. mycoides, small colony type

IKNNQKLIIMCCENGIRVSSLFKSYFSNLNNNIYFVDVLVDRIVSNKNILNDYLECE
 DYYLWIVDKTQLPRDFKQVPNLTYTTSLDIQITKKIYMLNALHCSLAWFVFNFS
 FNKYLYVYQALKNDKVVEFVN NYLNEVILVLNHKYNINLDELNNYKNQIIKRLN
 SNFIKDDLKRLARNTLKL SKNERILTILDYAKDNNLKH DILLLSYQNGLEYLKN
 NK

Geobacillus stearothermophilus

MLAVHFGAGNIGRGGFIGSLLSQSGYEVVFDINDELVRLLKEKQEFTYRVIIADEN
 RQELLIRNVSAVNSQTEREKVIDYITKAHLITTA VGPHILPAIATILAE GFTLQKRIT
 INKTPLHIIACENMIGGSDVLKSHVFEEKISEADKPLFEKYYGFLNCAVDRIVPFTNQ
 KHDDPLSVVVEPFFFEWVIEKRNIIGAIPPIQGAHFVDDLKPYIERKLFTVNTGHAIA
 FTSYLGYYKKLQTIQEAMCDQEIRSDVEKALHESGAVLVKKYGWNENEHQSYIQ
 KIIQRFIFTNPSISDEVVRVARSPIRKL GANDRLIGPATQYYDLFGQVPHGLVKGIA
 ALLFDYENDEFTEAVALQKTIQETGVEGALYQYSQLEKDHPLVIAIKDQWQHL
 K

Mycoplasma pneumoniae

MKRINVLFHFGAGNIGRGVILPIYQQNDFSIDLVELNQNTVNELQKFTQKQYQVHY
 LDCDQSQLVND FNTWNLKDEAKI IELMERADVISTSIGAKNLASLKT LFDKFTAK
 FHKRAIVLCFENGFRISSNFKNILQLNNTQVNFVDVVIDTIAPNFEKKANFLDIYCE
 FTKYSEIYAETFPLEIKGVNQKNSLDRFIKKLLL VNALHSVIGLLGFQQKLKYVH
 ETLQVFTKSNLTFVEKLAQQIIDALCAEYPEFNKNLLSYGKNNLVRFANPKIQD

LNTRLIREPLRFTKLNQNERFYAIYKLFKKNKIALNNILQVYLMVLKTNITDDTES
QQIAKLINEKAWTELAFTKLSSLEESEWNLIKQELSREITKK

Aspergillus niger

MGKKAIQFGGGNIGRGFVAEFLHKAGYEVVFDVMDKMVEALQQNKSYKVTE
VSEEGEHTTTITNYRAINSKTHESDVIQEIATADVVTCAVGPHILKFIAPVIAKGID
ARTESKPVAVIACENAIGATDTLHGFIKQHTSQDRVESLYDRAQFANSAIDRIVPQ
QAPNSGLDVRIEKFYEWAVEKTPFGSVGHPDIPAIHWVDNLEPYIERKLFTVNTS
HATTAYFGHFGRGKKMIADALEDEEIRGLVHKVLEETASLIVAKHDISEEEQKEYV
KKIVSRISNPYLEDKVERVGRAPLRKLSRKERFIGPASQLAERGMKYDSLMDAVE
MALRFQNVPGDDESAELANILNEQRAEDATIHILTGLDEEHPLYPAVLERVVRKVQ
QGTK

Paracoccidioides brasiliensis

MGKKAHVFGGGNIGRGFVGEFLHESGYEVVFDVMDSVIDALQKASSYTVTEIS
GEGEHKKVIENYRAINSKHNLDVVIKEISTADVVTCAVGPNILKFIAPPIAKGIDIR
TQPKPLAVIACENAIGATDTLHGFIKDNTDESRRDSLPSRAQFANSAIDRIVPTQDP
NSGLDVKIEKFYEWVVEKTPFGDVGHDPDIKAIHWVDNLEPYIERKLFTVNTGHAT
AAYFGYNAGKPTIHDALKDERIRSQVNAVLAETSALIVEKHHIPAEQHDYVQKII
TRISNPYLEDDVVQRVGRAPLRKLSRKERFIGPAAQLAERGQQVDALMGAVEEAL
KFQNVPDDEESFELHKILKELSAADATTKLTDLEPDHPLYPRVLEKVTKVQSETK

7.2 Sequenz der großen Untereinheit der RubisCo in *Caloglossa leprieui*

Die Sequenzbereiche, welche als Primer für die Positiv-Kontrollen für die verschiedenen PCR-Untersuchungen genutzt wurden, sind fett markiert.

```

1   gaaactgatg ttttagcatt atttcgtgtt agtccacagc ctggtgtga ccctattgaa
61   gcagcagcag cagttgcagg agaatttca acggctactt ggactgtagt gtggacggac
121  ttattaacag catgtgattt atatcgcgct aaagcttata aagttgatgc tgttccaaat
181  acatcagacc aatatattgc atatattgct tatgatattg atttattga agaaggatct
241  attgctaatt taacagcttc tattattgga aacgtattcg gttttaaagc tgtaaggtct
301  ttaaggttag aagatatgcg tattcctgta gcatacttaa aaacattca agggcctgca
361  actggtctta ttgtagaacg tgaacgtatg gataaattcg gtcgtccatt ttaggcgca
421  acagtaaaac ctaagttagg ttatctggtg aaaaactatg gaagagtagt ttatgaaggc
481  taaaaggtg gattagactt tctaaaagat gatgaaaata tcaactctca accattcatg
541  cgctggaaaag aaagattttt atattcaatg gaggctgtta atcggtctat tgcagctaca
601  ggagaagtaa aaggtcatta tatgaacgtg acagctgcta caatggaaga tatgtatgaa
661  agagcagaat tcgcaaaaca attaggtaca gttattataa tgattgatct agtaattggt
721  tatactgcaa ttaaaactat ggcaatttgg gctcgtgata atgatatgat ttacactta
781  catcgtgcgg gtaattcaac ttattctcgc caaaaaattc atggaatgaa tttcagggtg
841  atttgtaaat ggatgcgtat gtctggtgta gatcatatcc atgcaggtagc ggtagtagga
901  aagctagaag gtgatccatt aatgataagg ggctttata atacattact aatgccttat
961  ctatagatta atttacctca aggaatatat ttccaacaag attgggcttc ttacgtaaa
1021 gtaacaccag tagcttcagg cggtatccac tgcggacaaa tgcaccaatt actagattat
1081 ttaggtaacg atgtgtactt caatttgggt ggtggtacaa ttggacatcc agatggaatt
1141 caagcaggtg caacagcgaa ccgtgtagct ttagaatcaa tgtaattgc tagaaatgaa
1201 ggctgcgatt atgttcgaga aggaccgcaa attttacgcg atgcagcaaa aacatgtggc
1261 cctttacaaa cagcactaga tttgtggaaa gatattacgt tcaac

```


Danksagung

Bei Prof. Dr. Ulf Karsten bedanke ich mich für die Betreuung während all der Jahre, die vielen wissenschaftlichen Impulse für meine Arbeit und die immerwährende Geduld während des langwierigen Schreib-Prozesses.

Bei Prof. Dr. Hermann Bauwe bedanke ich mich für die Betreuung während der molekularbiologischen Phase der Arbeit.

Danke, dass ihr „auf mich eingeredet“ habt, als ich aufgeben wollte.

Ich bedanke mich auch bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Angewandte Ökologie, Pflanzenphysiologie und aller anderen Arbeitsgruppen des Institutes, die mir immer wieder Hilfe und Unterstützung bei kleineren und größeren Problemchen des Laboralltags gewährten; angefangen vom Stopfen diverser HPLC-Lecks über geduldiges Überprüfen zahlloser Berechnungen bis hin zum rechtzeitigen Anschalten/Warmlaufen-lassen des Fluorimeters.

Ein großes DANKE geht an meine Freunde und ganz besonders bedanke ich mich bei meinen „Provinzlern“ - meinen Eltern sowie meiner Schwester und ihrer Familie: für die bedingungslose Unterstützung; all das Vertrauen und die Liebe, die ihr mir entgegen bringt und dafür, dass ihr auch meine zweite „Schreibattacke“ verkraftet habt.