

**Physiologische und molekulare Vorgänge während des Übergangs von
Haematococcus pluvialis in das nicht-mobile, Astaxanthin-bildende
Zellstadium**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
(Biowissenschaften)
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,
vorgelegt
von Herrn Enrico Ehrhardt
geb. am 02.07.1994 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ingo Heilmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Prof. Dr. Reinhard Paschke (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
3. Prof. Dr. Ivo Feussner (Georg-August-Universität Göttingen)

Datum der Verteidigung: 14.02.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Eigenschaften und Nutzung von Mikroalgen.....	1
1.2 Kultivierung von Mikroalgen.....	1
1.2.1 Einfluss von Nährmedien bei der Mikroalgen-Kultivierung.....	2
1.2.2 Prozessparameter zur Induktion sekundärer Stoffwechselaktivitäten.....	2
1.3 Eigenschaften von <i>Haematococcus pluvialis</i> (<i>H. pluvialis</i>).....	3
1.3.1 Vorkommen und Verwendung von <i>H. pluvialis</i>	3
1.3.2 Lebenszyklus von <i>H. pluvialis</i>	3
1.4 Funktionen des Carotinoid-Stoffwechsels photoautotropher Organismen.....	4
1.4.1 Induktion und Biosynthese von Carotinoiden in <i>H. pluvialis</i>	5
1.4.2 Funktionen von Carotinoiden in <i>H. pluvialis</i>	6
1.5 Photosynthetische Aktivitätsparameter zur Analyse des zellulären Vitalitätsstatus.....	7
1.5.1 Untersuchung photosynthetischer Aktivitätsparameter von <i>H. pluvialis</i>	7
1.5.2 Ultrastruktur photosynthetischer Komplexe von <i>H. pluvialis</i>	7
1.6 Omic-Analysen zur Untersuchung der Carotinoid-Biosynthese von <i>H. pluvialis</i>	8
1.7 Zielstellung.....	8
2 Material und Methoden.....	9
2.1 Materialien.....	9
2.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen und Nährmedien.....	9
2.1.2 Enzyme und Kits.....	9
2.1.3 Größenstandards.....	9
2.1.4 Stämme.....	9
2.1.5 Primer.....	9
2.1.6 Geräte , Verbrauchsmaterialien und Software.....	9
2.2 Methoden.....	9
2.2.1 Kultivierung von <i>H. pluvialis</i> in Photobioreaktoren.....	9
2.2.1.1 Anzucht von Vorkulturen.....	9
2.2.1.2 Experimentalsreihen zur Induktion der Carotinoid-Biosynthese.....	10

2.2.2 Mikroskopische Untersuchungen morphologischer Variationen und Analyse von Wachstumsindikatoren.....	10
2.2.2.1 Bestimmung von Zellkonzentrationen.....	10
2.2.2.2 Zellfärbung zur Differenzierung lebender und toter Zellen.....	10
2.2.2.3 Analyse morphologischer Variationen und Kontaminationskontrolle.....	11
2.2.3 Bestimmung der GTS.....	11
2.2.4 Zellaufschluss.....	11
2.2.4.1 Zellaufschluss für Pigmentextraktionen.....	11
2.2.4.2 Zellaufschluss für Nukleinsäureisolationen.....	11
2.2.4.3 Zellaufschluss für Proteinisolationen.....	11
2.2.5 Pigmentisolation durch organische Extraktion.....	11
2.2.6 Trennung von Pigmentextrakten mittels Chromatografie.....	12
2.2.6.1 Trennung von Pigmentextrakten durch Dünnschichtchromatografie (DC).....	12
2.2.6.2 Identifikation von Ax-Derivaten in Pigmentextrakten durch <i>High performance liquid chromatography</i> (HPLC).....	12
2.2.7 Bestimmung von Pigmentkonzentrationen durch Spektrophotometrie.....	12
2.2.8 Berechnung photosynthetischer Aktivitätsparameter anhand von Chlorophyllfluoreszenzen unter Verwendung unterschiedlicher Messsysteme.....	13
2.2.8.1 <i>Imaging Pulse-Amplitude-Modulation</i> (Imaging-PAM) Fluorometer.....	13
2.2.8.2 FluorCam.....	14
2.2.9 Ermittlung von Sauerstoffbildungsraten (SBR) durch die Bestimmung von Gasbildungspotentialen.....	14
2.2.10 Isolation von genomischer DNA (gDNA).....	14
2.2.11 Isolation von RNA.....	14
2.2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	14
2.2.13 Entfernung gDNA aus RNA-Präparationen durch einen DNase I-Verdau.....	15
2.2.14 Synthese komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription von RNA.....	15
2.2.15 Etablierung spezifischer Primerpaare für Genexpressionsanalysen durch PCR.....	15
2.2.15.1 Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche durch PCR.....	15
2.2.16 Quantitative Genexpressionsanalysen unter Verwendung von qPCR.....	16
2.2.17 Trennung von DNA-Gemischen durch Agarosegelelektrophorese.....	17

2.2.18 Trennung von RNA-Gemischen durch Agarosegelelektrophorese.....	17
2.2.19 Isolation von Proteinen aus <i>H. pluvialis</i>	17
2.2.20 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	17
2.2.21 Analysen zur Untersuchung des Proteoms: Proteomics.....	18
2.2.21.1 Probenvorbereitung - Reduktion und Alkylierung.....	18
2.2.21.2 Probenvorbereitung - proteolytischer Verdau.....	18
2.2.21.3 Probenvorbereitung - Entsalzung.....	18
2.2.21.4 Flüssigchromatografie (LC) und Massenspektrometrie (MS).....	19
2.2.21.5 Peptididentifikation und quantitative Auswertung der MS-Daten.....	19
2.2.22 Statistik und bioinformatische Datenauswertung.....	20
2.2.22.1 Statistische Auswertung und Ergebnispräsentation.....	20
2.2.22.2 Statistische Analyse und Auswertung von Genexpressionsänderungen.....	20
2.2.22.3 Statistische Analyse und Auswertung von Proteomics-Experimenten.....	20
3 Ergebnisse.....	21
3.1 Kultivierungsstrategien zur Optimierung der Biomasse- und Ax-Produktion von <i>H. pluvialis</i>	21
3.2 Einfluss von Kultivierungsbedingungen auf das Wachstum und pigmentspezifische Variationen von <i>H. pluvialis</i>	21
3.2.1 Mikroskopische Analyse von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	21
3.2.2 Wachstumsindikatoren von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	24
3.2.3 Ax-, Chl- und Car-Konzentrationen von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	28
3.3 Photosynthetische Aktivitätsparameter von <i>H. pluvialis</i>	35
3.3.1 Photochemische Quantenausbeute nativer Flüssigkulturen von <i>H. pluvialis</i>	35
3.3.2 Nicht-photochemischer Quench nativer Flüssigkulturen von <i>H. pluvialis</i>	37
3.3.3 Gasbildungspotential nativer Flüssigkulturen von <i>H. pluvialis</i>	40
3.4 Genexpression von <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen.....	42
3.4.1 Identifikation von <i>housekeeping</i> -Genen in <i>H. pluvialis</i>	42
3.4.2 Relative Genexpression von <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen.....	43
3.5 Proteomics.....	56
3.5.1 Nicht-stadienspezifische Proteine drei zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i>	57

3.5.2 Stadienspezifische Proteine in der Schnittmenge zweier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i>	61
3.5.3 Stadienspezifische Proteine in individuellen zellulären Zustände von <i>H. pluvialis</i>	65
3.5.4 Vergleichende Analysen des Einflusses der Kultivierungsparameter auf Ebene des Proteoms und des Transkriptoms	68
3.5.5 Identifikation co-regulierter Proteine dreier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i>	69
4 Diskussion	71
4.1 Etablierung definierter Kultivierungsstrategien	71
4.2 Vitalitäts- und Pigmentanalysen	71
4.3 Photosynthetische Aktivitätsparameter zeigen einen physiologischen Übergang an	73
4.4 Änderung der Genexpression relevanter Stoffwechselwege beim physiologischen Übergang	76
4.5 Ungerichtete Proteom-Analyse zeigt Stoffwechselübergänge und unbekannte Proteine	80
5 Zusammenfassung und Ausblick	86
6 Summary and Outlook	87
7 Anhang	88
7.1 Anhang Abbildungen	88
7.2 Anhang Tabellen	96
7.2.1 Materialien und Geräte	96
8 Danksagung	102
9 Erklärung	103
10 Lebenslauf	104
10.1 Persönliche Daten	104
10.2 Ausbildung und beruflicher Werdegang	104
10.3 Studium und Schulausbildung	104
11 Publikationen und Vorträge	105
Literaturverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XVI
Tabellenverzeichnis	XIX

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung
ACP	Acyl-Carrier Protein
AGC	automatische Verstärkungsregelung
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Ax	Astaxanthin
BC	Biotin-Carboxylase
BKT	β -Carotin-Ketolase
BR	biologische Replikate
BSA	Bovines Serumalbumin
BTS	Biotrockensubstanz
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Car	Gesamtcarotinoid(e)
cDNA	komplementäre DNA
Chl	Chlorophyll _a
CHLB	<i>Light-independent protochlorophyllide reductase subunit B</i>
CHLL	<i>Light-independent protochlorophyllide reductase subunit L</i>
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
C _t	<i>cycle of threshold</i>
CRTR-B	β -Carotin-Hydroxylase
C- und N-Metabolismus	Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus
CYP-Enzym	Cytochrom-P450-Enzym
<i>C. zofingiensis</i>	<i>Chromochloris zofingiensis</i>
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektor
dC _t	Differenz der C _t -Werte
DDA	<i>Data-Dependent Acquisition</i>
ddC _t -Methode	Delta-Delta C _t -Methode
DEPC-Wasser	Diethyldicarbonat-behandeltes Wasser
DGAT	Diacylglycerol-Acyltransferasen
DGDG	Digalactosyl-Diacylglycerol
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpi	<i>days post inoculation</i>
dPQI	prozentuale Änderungsrate des PQI
dPQI _{int}	stadieninterne Veränderungsrate der Proteinabundanzen

dsDNA	doppelsträngige DNA
DXS	1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase
E	PCR-Effizienz
EB1	Extraktionspuffer 1
E ^{-ddCt}	relative Quantifikation von Genexpressionsänderungen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
F ₀	Chlorophyllfluoreszenz dunkeladaptierter Photosysteme
FATA	Acyl-ACP-Thioesterase A
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
F _M	maximale Chlorophyllfluoreszenz dunkeladaptierter Photosysteme
F _M '	maximale Chlorophyllfluoreszenz lichtadaptierter Photosysteme
F _S	variable Chlorophyllfluoreszenz im <i>steady-state</i>
F _V /F _M	maximale photochemische Quantenausbeute
F _V '/F _M ' (X μmol/m ² s)	effektive photochemische Quantenausbeute lichtadaptierter Photosysteme
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDH	Glutamatdehydrogenase
GOGAT	Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase
GOI	<i>gene of interest</i>
GS	Glutamin-Synthetase
GTS	Gesamtrockensubstanz
HCD	<i>Higher-energy collisional dissociation</i>
<i>H. lacustris</i>	<i>Haematococcus lacustris</i>
HOGP	<i>Haematococcus Oil Globule Protein</i>
<i>H. pluvialis</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>
Imaging-PAM	<i>Imaging Pulse-Amplitude-Modulation</i>
IPI	Isopentenylpyrophosphat-Isomerase
IPP	Isopentenylpyrophosphat
KAS	3-Ketoacyl-ACP-Synthase
LC	Flüssigchromatografie
LCYB	Lycopin-β-Cyklase
LEDs	<i>light-emitting diodes</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein-kinase</i> -Signalweg
MCTK	Malonyl-CoA-ACP-Transacylase
MDH	Malatdehydrogenase
MEP-Weg	Methylerythritolphosphatweg
MGDG	Monogalactosyl-Diacylglycerol
MM	Mastermix

MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPQ	nicht-photochemischer Quench
NPQ (X $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	Nicht-photochemischer Quench lichtadaptierter Photosysteme
NRT	<i>Non Reverse Transcriptase Control</i>
NTC	<i>Non Template Control</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDS	Phytoen-Desaturase
PETA	Cytochrom f
PETB	Cytochrom b ₆
PFD	Photonenflussdichte
PGK	3-Phosphoglyceratkinase
ppm	<i>parts per million</i>
PQ	Plastochinon
PQH ₂	Plastochinol
PQI	<i>Protein Quantification Index</i>
PS I und PS II	Photosystem I und II
PSBD	Photosystem II D2-Protein
PSBF	<i>Cytochrome b559 subunit beta</i>
PSBS	Photosystem II 22 kDa-Protein
PSMs	<i>Peptide Spectral Matches</i>
PSY	Phytoen-Synthase
PTOX	Plastidäre Terminale Oxidase
qPCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
RBCL	große Untereinheit von RuBisCO
resp.	respektive
RISCs	<i>RNA-induced-silencing-complexes</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SAD	Stearyl-ACP-Desaturase
SBP	Sauerstoffbildungspotential
SBR	Sauerstoffbildungsrate
spec.	<i>species</i>
ssRNA	einzelsträngige RNA

STAGE	<i>Stop and Go Extraction</i>
STAGE Tips	<i>Stop and Go Extraction C18-Tips</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEF2	Translations-Elongationsfaktor 2
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUBA	Alpha Tubulin
Tukey-HSD	<i>Honest Significant Difference-Test</i> von Tukey
UA	Harnstoff-Lösung
UAD	Reduktionslösung
UAI	Alkylierungslösung
UniProtKB	<i>UniProt Knowledgebase</i>
VDE	Violaxanthin-Deepoxidase
v/v	<i>volume per volume</i>
ZDS	<i>ζ-Carotin-Desaturase</i>
ZEP	Zeaxanthin-Epoxidase
Z/ml	Zellen/ml

1 Einleitung

1.1 Eigenschaften und Nutzung von Mikroalgen

Die Photosynthese ist Lebensgrundlage terrestrischer und aquatischer phototropher Organismen, welche an ein Leben an unterschiedlichen Standorten angepasst sind. Diesen Gruppen können bspw. die vielfältigen Gattungen von Makro- und Mikroalgen, Phytoplankton und Cyanobakterien zugeordnet werden. Die benannten Organismen sind an eine Existenz auf dem Wasser bzw. im Wasser spezialisiert und bilden die Grundlage des heutigen Lebens auf der Erde. Ein großer Teil atmosphärischen Kohlenstoffs wird durch die Algen- bzw. Planktonbestände der Ozeane und Weltmeere fixiert [Geider *et al.*, 2001]. Makro- und Mikroalgen unterscheiden sich grundsätzlich durch ihre Größe, den morphologischen Aufbau sowie ihre natürlichen Habitate [Ibañez *et al.*, 2012].

Mikroalgen sind einzellige, mikroskopisch kleine Organismen mit einer Größe von bis zu mehreren 100 µm. Sie unterscheiden sich von den Makroalgen insofern, als dass sie keine differenzierten Gewebestrukturen wie Blätter, Wurzeln oder Stämme ausbilden und andere Habitate (Brackwasser, Soda-Seen, Süßwasser) besiedeln. Es wird angenommen, dass ca. 200.000 - 800.000 Spezies existieren, von denen jedoch nur etwa 40.000 bekannt sind und beschrieben wurden [Khan *et al.*, 2018]. Die Diversität von Mikroalgen-Spezies zeigt sich in ihrem morphologischen Aufbau sowie in dem Gehalt und der Identität von Makro- und Mikronährstoffen. Mikroalgen verfügen über ein großes biotechnologisches Potential und werden weltweit für die Produktion hochwertiger Inhaltsstoffe kultiviert. Über 15.000 neue chemische Substanzen wurden bislang aus Mikroalgen isoliert und charakterisiert. Diesen Substanzen können individuelle biologische Wirkungsweisen und Potentiale zugeschrieben werden [Cardozo *et al.*, 2007]. Neben Peptiden, Fettsäuren und Polysacchariden kennzeichnen sich Mikroalgen ebenfalls durch Carotinoide, akzessorische Pigmente, Vitamine, aber auch Toxine und Sterole mit antioxidativen, antiinflammatorischen, antikanzerogenen und antimikrobiellen Wirkungspotentialen [Suganya *et al.*, 2016]. Während Primärmetabolite für die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen, des Wachstums und der Reproduktion der Zellen zuständig sind, wird die Biosynthese sekundärer Metabolite nur in Abhängigkeit definierter Stimuli induziert und dient der Stressantwort [Vuppaladadiyam *et al.*, 2018].

1.2 Kultivierung von Mikroalgen

Die Kultivierung von Mikroalgen kann durch prozesstechnische Variationen beeinflusst werden. Verschiedene Kultivierungssysteme werden für wissenschaftliche oder kommerzielle Zwecke verwendet und weisen individuelle Vor- und Nachteile auf. Im Allgemeinen werden die Bioreaktoren in offene und geschlossene Systeme untergliedert. Offene Kultivierungssysteme sind in der Handhabung vergleichsweise anspruchslos, weisen jedoch einen größeren Flächenbedarf als geschlossene Systeme auf. Die Systeme werden weitläufig als *Open-* oder *Raceway-Ponds* bezeichnet, wobei es sich im Allgemeinen um Flachbettbioreaktoren handelt. In den Reaktoren findet eine kontinuierliche Medienströmung statt, welche bspw. durch Schaufelräder umgesetzt wird. Die Kultivierung in offenen Systemen kann durch verschiedene Parameter kontrolliert werden (z.B. Temperatur, Medienkomposition, Begasung) und hängt zusätzlich von den Umgebungseinflüssen ab (Beleuchtungsintensität, Beleuchtungsdauer, Temperatur, Luftfeuchte u.a.).

Ein Nachteil der Kultivierung in offenen Systemen besteht darin, dass die Kulturen anfällig für Kontaminationen sind, welche die Produktqualität und Ausbeute reduzieren können. Aufgrund moderater Betriebskosten finden die Systeme dennoch häufig Anwendung und sind vereinzelt in Gewächshausaufstellungen in Europa zu finden (Sea & Sun Technologies in Kiel, Dr. Eberhard Bioenergie GmbH & Co. KG in Neustadt-Glewe). Großtechnische Anlagen sind häufiger im asiatischen (Vina Tao in Vietnam, Algatechnologies in Israel) und pazifischen (Nutrex in Hawaii) Raum zu finden, wo aufgrund der klimatischen Verhältnisse eine ganzjährige Produktion gewährleistet werden kann.

Geschlossene Reaktorsysteme haben den Vorteil, dass diese unter asexuellen Bedingungen, d.h. frei von mikrobieller Kontamination, betrieben werden können. Im industriellen Maßstab finden häufig Platten- bzw. Rohrreaktoren Anwendung. In den Systemen müssen Kultivierungsparameter wie bspw. die Beleuchtung, Begasung, Durchmischung, Medienkomposition und der pH-Wert reguliert und an die Anforderungen der Zielkultur angepasst werden. Die Produktion in geschlossenen Photobioreaktoren ist standortunabhängig und kann ganzjährig erfolgen (z.B. ALGAMO in Tschechien, AstaReal in Schweden, BDI-BioLife Science in Österreich). Die Kultivierung unter aseptischen Bedingungen zur Sicherstellung der Produktqualität sowie die Nutzung artifizieller Lichtquellen und Kühlanlagen bedingen hohe Produktionskosten. Diese können durch die Produktion hochwertiger Endprodukte kompensiert werden (z.B. Astaxanthin (Ax) aus *Haematococcus species* (spec.), β -Carotin aus *Dunaliella* spec., mehrfach ungesättigte Fettsäuren aus *Arthrospira* spec. und *Nannochloropsis* spec.) [Suganya et al., 2016].

1.2.1 Einfluss von Nährmedien bei der Mikroalgen-Kultivierung

Das Wachstumsverhalten und die Induktion spezifischer Stressantworten mit Bildung gewünschter Inhaltsstoffe wird durch das Nährstoffspektrum beeinflusst. Nährstoffrestriktionen von Nitrat oder Phosphat im Medium bedingen physiologische und molekulare Veränderungen [Boussiba und Vonshak, 1991; Boussiba et al., 1999]. Die Stimulation sekundärer Stoffwechselaktivitäten in Mikroalgen stellt einen entscheidenden Aspekt der „grünen“ Biotechnologie dar, da somit kommerziell verwertbare Metabolite generiert werden können [Cardozo et al., 2007]. Die Anteile der Elemente Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Kalium, Phosphor, Schwefel, Natrium und Calcium, aber auch die Spurenelemente Bor, Zink und Kupfer gelten als wichtige Medienkomponenten [Ilavarasi et al., 2011]. Aufgrund der variierenden Anforderungen an die Nährstoffverfügbarkeit im Medium, können die Fermentationen nicht kontinuierlich, sondern müssen in mehrstufigen Prozessen durchgeführt werden.

1.2.2 Prozessparameter zur Induktion sekundärer Stoffwechselaktivitäten

Die Bildung von Sekundärmetaboliten kann durch Stressfaktoren wie bspw. erhöhte Lichtintensitäten, Salzkonzentrationen und Temperaturen induziert werden [Paliwal et al., 2017; Minhas et al., 2016]. Die Prozessparameter müssen in Abhängigkeit des physiologischen Zellstatus spezifischen Anforderungen genügen, um eine effiziente Fermentation zu gewährleisten. Die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen sekundärer Stoffwechselaktivitäten sind jedoch zum Teil noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.3 Eigenschaften von *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*)

Die einzellige Süßwasser-Mikroalge *H. pluvialis* gilt als eine der wertvollsten natürlichen Quellen der biotechnologischen Industrie und wird zur Gewinnung des Keto-Carotinoids Ax (3,3'-Dihydroxy- β , β -carotin-4,4'-dion) verwendet [Lim *et al.*, 2017].

1.3.1 Vorkommen und Verwendung von *H. pluvialis*

H. pluvialis gehört zur phylogenetischen Klasse der Chlorophyceae (Ordnung: Chlamydomonadales) und wurde erstmals im Jahr 1844 von Julius von Flotow beschrieben [Flotow, 1844]. Die Grünalge kann in Abhängigkeit verschiedener Stressfaktoren bis zu 5,9 % der Biotrockenmasse (BTS) in Form von Ax akkumulieren [Do *et al.*, 2019]. Ax verfügt über eine Vielzahl gesundheitsfördernder Eigenschaften und ist aufgrund des hohen antioxidativen Potentials von Bedeutung für die Nahrungsergänzungsmittelindustrie [Guerin *et al.*, 2003]. Darüber hinaus wird Ax als Fleischfärbemittel in der Aquakulturtechnik, resp. der Lachszucht, verwendet [Lim *et al.*, 2017]. Neben *H. pluvialis* existieren weitere populäre Mikroalgen, welche sich durch unterschiedliche Wertstoffe auszeichnen. Aus biotechnologischer Sicht wird diesen ebenfalls ein hoher Stellenwert zugeordnet (z.B. *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*), *Dunaliella salina*). Phylogenetische Analysen konnten zeigen, dass die benannten Organismen eng miteinander verwandt sind und im Hinblick auf eine Vielzahl essentieller Proteine (bspw. Phytoen-Synthase (PSY) aus dem Carotinoid-Stoffwechsel) konservierte Sequenzbereiche aufweisen [Lao *et al.*, 2011].

1.3.2 Lebenszyklus von *H. pluvialis*

Der Lebenszyklus von *H. pluvialis* lässt sich in vier morphologische Zellstadien unterteilen, welche in einem Review von Shah *et al.* beschrieben wurden [Shah *et al.*, 2016]. In der Literatur existieren verschiedene Terminologien zur Bezeichnung der unterschiedlichen morphologischen Zustände [Zhang *et al.*, 2016]. Die einzelnen Zellstadien werden in zwei spezifische Gruppen (mobile und nicht-mobile Phase) unterteilt. In der mobilen Phase kennzeichnen sich die 5 - 30 μ m großen Zellen durch eine dünne Zellwand, welche über cytoplasmatische Stränge mit dem Protoplasten verbunden ist. Die Fortbewegung wird durch zwei isometrische Flagellen gewährleistet. Im Zentrum des Protoplasten befindet sich der Nukleus, welcher eng mit dem Augenfleck verbunden ist und vom Chloroplasten umgeben wird. Der Chloroplast weist eine becherähnliche Form auf und enthält eine grün gefärbte Pyrenoidstruktur (vgl. Abb. 1.1 mobile Zellen) [Zhang *et al.*, 2016]. Durch die Variation von Kultivierungsbedingungen kann ein Übergang der Zellen aus dem flagellierten, mobilen in ein nicht-mobiles Stadium induziert werden. In der nicht-mobilen Phase sind zwei Subformen unterscheidbar. Diese werden als nicht-mobiles Palmella-Stadium und nicht-mobile Zellen (Aplanosporen) bezeichnet. Die Größe der Zellen variiert zwischen 10 - 50 μ m. Durch den Verlust der Flagellen resultiert der Verlust zur Fähigkeit der aktiven Fortbewegung. Die kugelförmigen Zellen bilden eine verstärkte Zellwand und beginnen mit der Biosynthese von Ax [Zhang *et al.*, 2016]. Die Akkumulation des roten Farbstoffes kann zunächst im Zentrum der Zellen, nahe des Nukleus, beobachtet werden. Im Zuge der fortschreitenden Ax-Biosynthese und steigender intrazellulärer Ax-Konzentrationen kann eine Verteilung des Keto-Carotinoids bis in periphere Zellbereiche beobachtet werden [Lemoine und Schoefs, 2010]. Abb. 1.1 zeigt die morphologischen Umwandlungsprozesse von *H. pluvialis* in Abhängigkeit definierter Kultivierungsbedingungen.

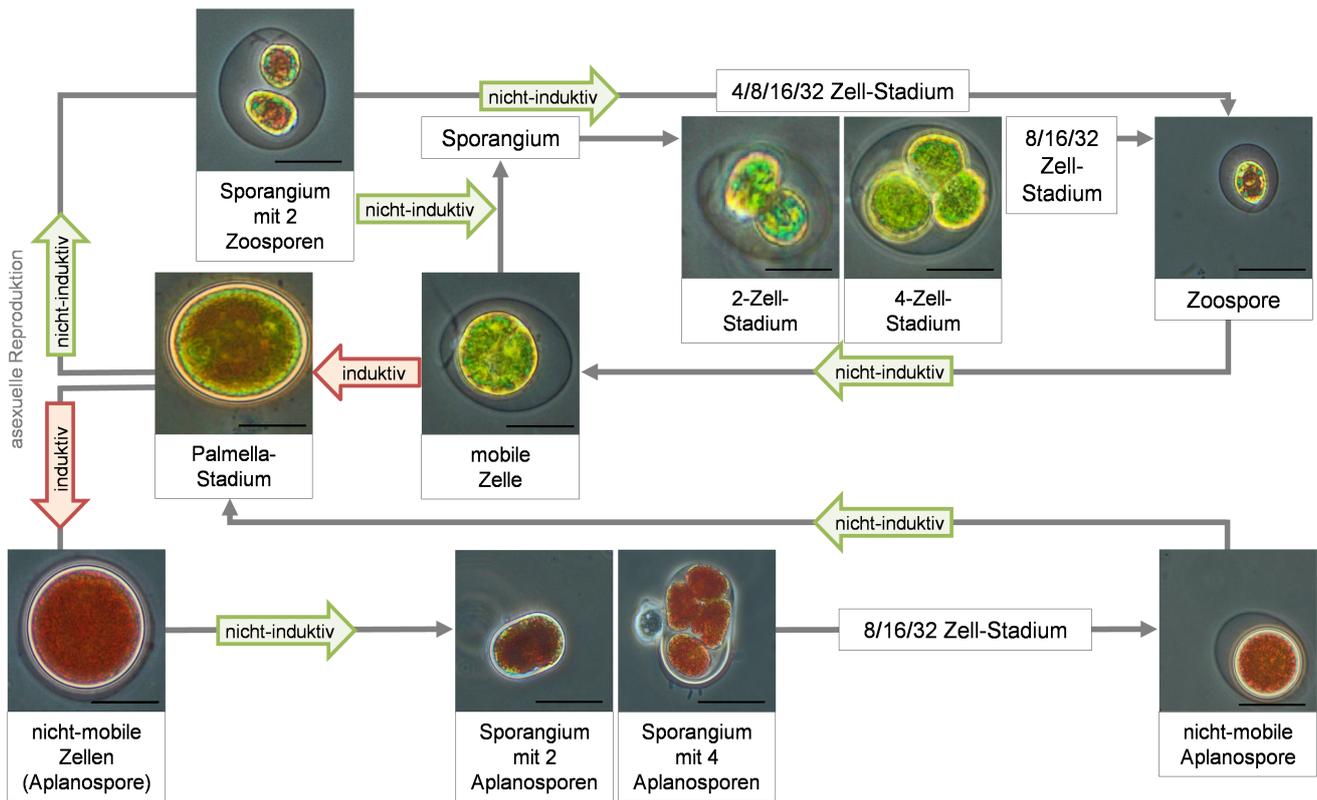


Abbildung 1.1: Lebenszyklus von *H. pluvialis* unter Berücksichtigung verschiedener Kultivierungsbedingungen

Ausgehend von einer mobilen Zelle kann eine Differenzierung in Abhängigkeit angegebener Kultivierungsbedingungen induziert werden. Nicht-induktive Bedingungen beinhalten die Kultivierung in einem nitrathaltigen Medium (z.B. 1 x BG-11-Medium) bei Beleuchtungsintensitäten $< 200 \mu E/m^2s$ unter Berücksichtigung eines zyklischen Tag-Nacht-Rhythmus. Induktive Kultivierungsbedingungen können durch Stressfaktoren ausgelöst werden, welche chemischen (z.B. Nitratmangel), physikalischen (Lichtstress) oder mechanischen (turbulente Durchmischung) Ursprungs sein können und den Übergang mobiler Zellen in ein nicht-mobiles Zellstadium bedingen. Maßstabsbalken 20 μm .

Während der Zellteilung kann die Ausbildung eines Sporangiums, als Ursprung neuer Tochterzellen, beobachtet werden. Die Proliferation findet überwiegend durch asexuelle Zellteilung statt. Aus mobilen Ursprungszellen entstehen sogenannte Zoosporen, welche auch als flagellierte Tochterzellen bezeichnet werden. Andererseits kann durch die Zugabe von nitrathaltigem Medium zu einer Kultur nicht-mobiler Zellen die Bildung nicht-mobiler Aplanosporen und mobiler Zoosporen resultieren (nicht-induktive Bedingungen) [Kobayashi *et al.*, 1997].

1.4 Funktionen des Carotinoid-Stoffwechsels photoautotropher Organismen

Carotinoide sind wichtige Komponenten des Primär- bzw. Sekundärmetabolismus photoautotropher Organismen. Diese sind aktiv an der Lichtabsorption (Ausnutzung der Grünlücke von Chlorophyll durch primäre Carotinoide) beteiligt und weisen weiterhin protektive Funktionen auf (z.B. Xanthophyll-Zyklus bzw. nicht photochemischer Quench (NPQ)) [Goss und Jakob, 2010; Müller *et al.*, 2001]. Primäre Carotinoide sind überwiegend in den Photosystemen lokalisiert und erfüllen strukturelle bzw. lichtabsorbierende Funktionen. Sekundäre Carotinoide hingegen sind nicht im Chloroplasten lokalisiert und damit auch nicht aktiv an der Photosynthese beteiligt [Czygan, 1968]. Sie dienen bspw. als Kohlenstoffspeicher bzw. antioxidative Mittel zur Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [Lemoine und Schoefs, 2010].

1.4.1 Induktion und Biosynthese von Carotinoiden in *H. pluvialis*

Ausgehend von den isoprenoiden Grundkörpern (Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP)), welche vorwiegend im Plastiden von *H. pluvialis* über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) gebildet werden [Gwak *et al.*, 2014], entsteht über mehrere Hybridisierungsschritte ein Isopren-Intermediat mit einer Kettenlänge von 40 Kohlenstoffatomen (Phytoen) [Steinbrenner und Linden, 2003]. Der letzte Hybridisierungsschritt wird durch die enzymatische Aktivität von PSY, einem Schlüsselenzym des Carotinoid-Stoffwechsels, katalysiert [Gwak *et al.*, 2014]. Der synthetisierte C40-Grundkörper (Phytoen) wird weiterführend durch die enzymatische Aktivität der Phytoen-Desaturase (PDS) und ζ-Carotin-Desaturase (ZDS) zu Lycopin und weiterführend durch das Enzym Lycopin-β-Cyklase (LCYB) zu β-Carotin umgesetzt [Chen *et al.*, 2015].

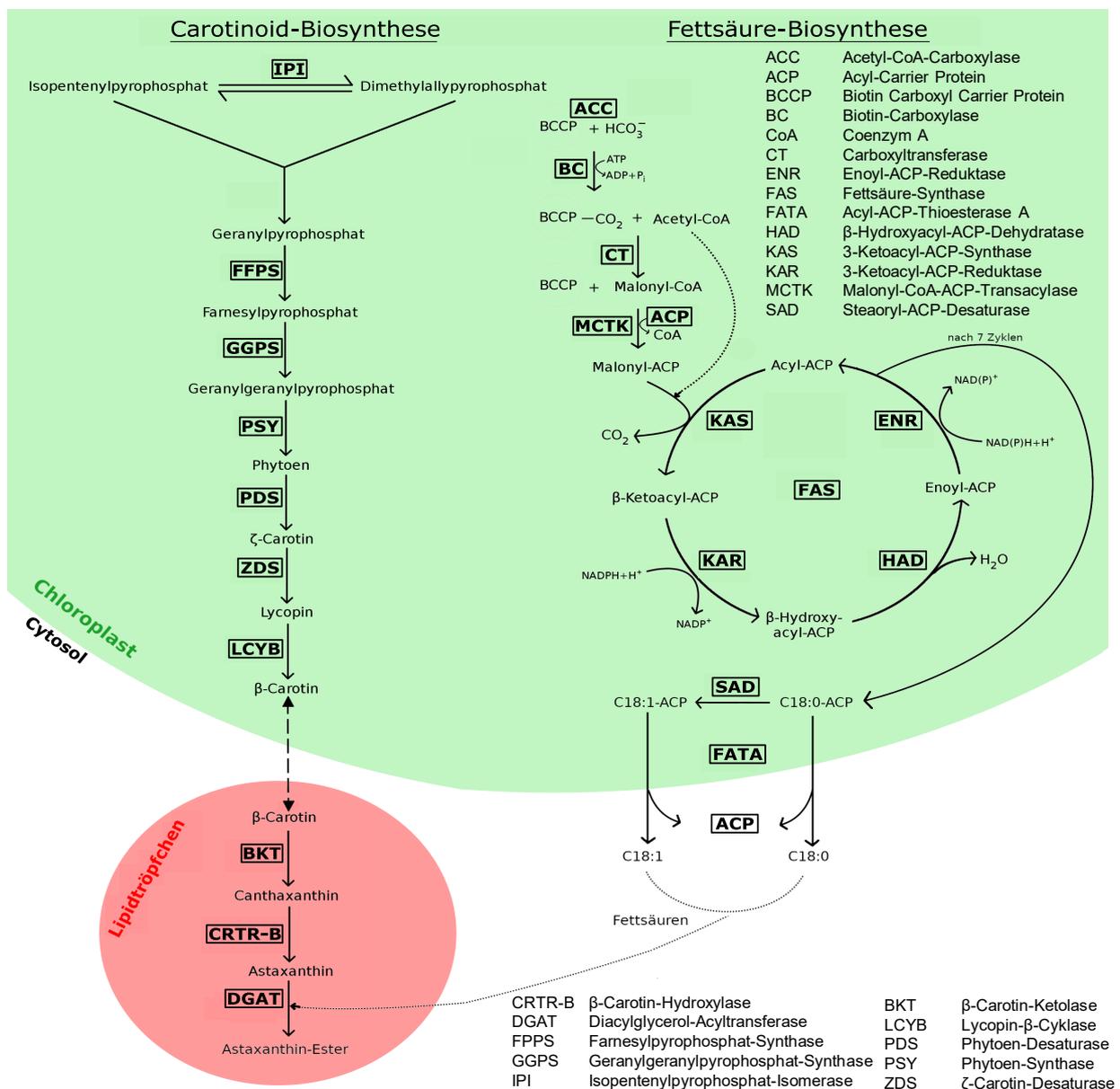


Abbildung 1.2: Übersicht der Ax- und Fettsäure-Biosynthese von *H. pluvialis*

Schematische Darstellung der zellulären Lokalisation von Enzymen und entstehender Intermediate der Ax- und Fettsäure-Biosynthese von *H. pluvialis*. Intermediate der Stoffwechselwege (β-Carotin und freie Fettsäuren) werden im Chloroplasten produziert und anschließend in das Cytosol bzw. in Lipidtröpfchen transportiert. Die Verknüpfung der Stoffwechselwege entsteht durch die Veresterung von Ax mit freien Fettsäuren in intrazellulären Lipidtröpfchen durch die Aktivität von DGAT.

Es wird angenommen, dass β -Carotin über einen unbekanntes Mechanismus aus dem Plastiden in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert wird. Anschließend erfolgt die weitere Umwandlung des Intermediates zu Cantaxanthin und final zu Ax. Die Umwandlungsprozesse werden durch die Enzyme β -Carotin-Ketolase (BKT) und β -Carotin-Hydroxylase (CRTR-B) katalysiert [Grünwald und Hagen, 2001]. Der gesamte Prozess wird auf der Produktebene reguliert, sodass ansteigende intrazelluläre Konzentrationen freier Ax-Monomere die fortschreitende Biosynthese inhibieren [Chen *et al.*, 2015]. Aus diesem Grund liegt der Großteil des im ER gebildeten Axs in Form von Mono- bzw. Diestern vor, welche den biologisch aktiven Zustand des Moleküls darstellen. Die Veresterung erfolgt mit gesättigten bzw. einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (C16:0, C18:1 Δ^9 , C18:2 $\Delta^{9,12}$), welche aus dem Plastiden in das ER transportiert werden [Zhekisheva *et al.*, 2005]. Das Schema in Abb. 1.2 veranschaulicht die Ax- und Fettsäure-Biosynthese in *H. pluvialis* unter Berücksichtigung zellulärer Kompartimente, Intermediate und katalysierender Enzyme. Untersuchungen der Fettsäurekomposition konnten zeigen, dass im Zuge der Ax-Produktion in *H. pluvialis* eine lineare Zunahme der Öl- und Palmitinsäure (C18:1 Δ^9 und C16:0) sowie von Triacylglyceriden zu verzeichnen ist [Zhekisheva *et al.*, 2002; Grünwald *et al.*, 2001]. Die Veresterung repräsentiert die Verknüpfung der Ax- mit der Fettsäure-Biosynthese und stellt einen wichtigen Regulationsprozess des Ax-Metabolismus dar. Der Prozess wird durch die Aktivität von Diacylglycerol-Acyltransferasen (DGAT) katalysiert. Die gebildeten Ax-Ester werden aus dem ER in entstehende Lipidtröpfchen eingelagert, in denen diese final akkumulieren [Chen *et al.*, 2015]. Hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Wayama *et al.* zeigten, dass der Volumenanteil von Ax in den Lipidtröpfchen von 0,2 % auf bis zu 52,2 % ansteigt, während eine Reduktion des Volumenanteils des Chloroplasten von 41,7 % auf 9,7 % zu verzeichnen ist. Weiterhin wurde im Verlauf der Ax-Biosynthese eine Abnahme an Stärkekörnern beobachtet, was auf den Prozess der Kohlenstoff-Partitionierung hindeuten könnte [Wayama *et al.*, 2013].

1.4.2 Funktionen von Carotinoiden in *H. pluvialis*

Bisher ist nicht endgültig aufgeklärt, welche Aufgabe die Ax-Ester in den Zellen besitzen. Aufgrund der lichtabsorbierenden Eigenschaften wird eine UV-protective Wirkung zum Schutz vor photodynamischen Schädigungen angenommen [Hagen *et al.*, 1993]. Die antioxidative Kapazität könnte ebenfalls protective Funktionen in Prozessen wie der Oxidation intrazellulärer Metabolite erfüllen [Sun *et al.*, 1998]. Zu diesen Aussagen existieren Annahmen und Spekulationen, welche zum Teil gegensätzlich sind und keine Festlegung zulassen [Scibilia *et al.*, 2015]. Die Annahme antioxidativer Funktionen kann dadurch bestätigt werden, dass bestimmte Intermediate des Xanthophyll-Zyklus nur in geringen Mengen in *H. pluvialis* nachgewiesen werden konnten [Gu *et al.*, 2013]. Es wurde postuliert, dass die vor oxidativem Stress schützenden Potentiale der Moleküle durch die Ax-Akkumulation in den Lipidtröpfchen kompensiert werden. Bisher ist nicht bekannt, welche regulatorischen Mechanismen die Ausbildung dieser begünstigen. Im Allgemeinen wird ein für Mikroalgen gültiges Modell angenommen, welches die Biogenese von Lipidtröpfchen durch die Interaktion des ERs mit den Plastiden der Zellen beschreibt [Goold *et al.*, 2015; Pick *et al.*, 2018]. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass spezifische Proteine an der Bildung der Lipidtröpfchen beteiligt sind (z.B. *Haematococcus Oil Globule Protein* (HOGP)) [Peled *et al.*, 2011].

Im Jahr 2018 konnte anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt werden, dass die Lipidtröpfchen frei beweglich sind und unter Stressbedingungen durch kleine plastidäre Kanäle aus dem Zentrum in periphere Zellbereiche gelangen [Ota *et al.*, 2018]. Der Mechanismus der Kompartimentbewegung konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden.

1.5 Photosynthetische Aktivitätsparameter zur Analyse des zellulären Vitalitätsstatus

Die Photosynthese findet in den Chloroplasten photoautotropher Organismen statt und wird durch die Aktivität der Photosysteme I und II (PS I und PS II) reguliert. Die während der lichtabhängigen Reaktion gebildeten Redox- und Energieäquivalente werden in der lichtunabhängigen Reaktion für die Fixierung anorganischen Kohlenstoffs benötigt [Johnson, 2016]. Die Aktivität der Photosysteme wird durch die Qualität und Quantität des Lichtes bestimmt und hängt ebenfalls vom physiologischen Zustand der Zellen ab. Der photosynthetische Status von *H. pluvialis* weist, abhängig von der Art applizierter Stressfaktoren, unterschiedliche Regulationsmuster auf [Scibilia *et al.*, 2015].

1.5.1 Untersuchung photosynthetischer Aktivitätsparameter von *H. pluvialis*

Die photosynthetische Aktivität von *H. pluvialis* steigt in Abhängigkeit von Lichtstress und Nitratmangel meist vorübergehend an und geht mit morphologischen Veränderungen der Zellen (Übergang in nicht-mobiles Stadium) einher [Chekanov *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017]. Im nicht-mobilen Stadium konnte ein indirekter Zusammenhang zwischen der photosynthetischen Aktivität und der Ax-Biosynthese nachgewiesen werden [Zhang *et al.*, 2017]. Gu *et al.* zeigten zusätzlich, dass das quantitative Verhältnis der maximalen photochemischen Quantenausbeuten (F_v/F_m) zwischen PS I und PS II ansteigt. Die Ergebnisse weisen auf einen zyklischen Elektronentransport hin, welcher den im Zuge der Ax-Produktion entstehenden Energiebedarf durch eine protonengetriebene Produktion von Adenosintriphosphat (ATP), gewährleisten könnte [Gu *et al.*, 2013]. Zhang *et al.* bestätigten die These durch die Beobachtung, dass die Abundanz von PTOX während der Ax-Biosynthese zunahm, wohingegen der Elektronentransport im PS I erhalten blieb [Zhang *et al.*, 2017]. Die durch PTOX vermittelte Verwertung der Elektronen könnte somit die Entstehung von ROS eingrenzen und oxidativen Schädigungen vorbeugen.

1.5.2 Ultrastruktur photosynthetischer Komplexe von *H. pluvialis*

Gu *et al.* zeigten anhand elektronenmikroskopischer Analysen, dass im Zuge des Übergangs von *H. pluvialis* aus dem mobilen in das nicht-mobile Stadium ein Abbau der Thylakoidmembranen sowie eine Volumenzunahme der Lipidtröpfchen resultieren. Weiterhin konnten mittels chromatografischer Analysen Veränderungen in der Pigmentzusammensetzung nativer Thylakoidmembranen in Abhängigkeit des Zellstadiums nachgewiesen werden [Gu *et al.*, 2013]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich die Konzentrationsverhältnisse repräsentativer Galaktolipide der Thylakoidmembranen (Monogalactosyl-Diacylglycerol (MGDG), Digalactosyl-Diacylglycerol (DGDG), Sulfoquinovosyl-Diacylglycerol) unter diesen Bedingungen ändern [Grünwald *et al.*, 2001; Zhekisheva *et al.*, 2002; Gwak *et al.*, 2014]. Die Chloroplasten der Zellen nehmen eine netzartige Struktur an, welche die Zwischenräume der Lipidtröpfchen durchspannen [Wayama *et al.*, 2013]. Diese Ergebnisse könnten eine Begründung für die Reduktion des Anteils der Thylakoidmembranen darstellen und die verminderte photosynthetische Aktivitätsrate der Zellen erklären.

1.6 Omic-Analysen zur Untersuchung der Carotinoid-Biosynthese von *H. pluvialis*

Mit der Ax-Biosynthese einhergehende Veränderungen in *H. pluvialis* wurden in der Literatur auf Ebene der Genexpression dokumentiert. Eine erhöhte Expression von Genen der Carotinoid- und Fettsäure-Biosynthese sowie der oxidativen Stressantwort konnte nachgewiesen werden [Ma *et al.*, 2018; Gwak *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2018]. Zusätzlich zu veränderten Genexpressionsmustern existieren Mechanismen, welche auf posttranskriptioneller oder posttranslationaler Ebene die Aktivität von Genen bzw. Proteinen regulieren können. Neben Analysen des Transkriptoms wurden auch Proteom-Analysen spezifischer Zellbestandteile (Zellwand, Thylakoidmembran) von *H. pluvialis* durchgeführt [Wang *et al.*, 2004 (2); Gu *et al.*, 2014]. Enzymatische Aktivitätstests sowie die Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies von Ding *et al.* zielten darauf ab, Interaktionsnetzwerke und Signalkaskaden in den Zellen nachzuvollziehen und verdeutlichten dabei die Bedeutung der Metabolite in Assoziation zur Biosynthese von Ax [Ding *et al.*, 2018]. Zusätzlich war es durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren möglich, die Beteiligung des *mitogen-activated protein-kinase*-Signalweges (MAPK) sowie des sekundären Botenstoffs zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) für die Carotinoid- bzw. Fettsäure-Biosynthese nachzuweisen [Choi *et al.*, 2015]. Die Ergebnisse konnten unterschiedliche Sachverhalte in Bezug auf molekulare Veränderungen von *H. pluvialis* in Abhängigkeit von Stressfaktoren verdeutlichen. Allerdings existieren ungeklärte Fragestellungen, welche weiterer Analysen bedürfen.

1.7 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, stoffwechselfysiologische Veränderungen beim Übergang von *H. pluvialis* in das nicht-mobile, Ax-bildende Zellstadium detailliert darzustellen. Des Weiteren sollten parallel Veränderungen auf Ebene des Transkriptoms und des Proteoms untersucht werden. Die Experimentalarbeiten wurden in zwei wesentliche Abschnitte untergliedert.

Zunächst sollte die Ax-Biosynthese in *H. pluvialis* in Abhängigkeit der Kombination verschiedener Kultivierungsparameter (Beleuchtungsregime, Nitratverfügbarkeit im Nährmedium, CO₂-Begasung) reproduzierbar nachgestellt und ein geeigneter experimenteller Versuchsaufbau etabliert werden. Neben Zellkonzentration, tot-lebend-Verhältnis der Zellen, Gesamt- und Biotrockensubstanz (GTS und BTS) sollten Pigmentkonzentrationen (Chlorophyll_a (Chl), Gesamtcarotinoid (Car), Ax) sowie photosynthetische Aktivitätsparameter (F_v/F_M, NPQ, Sauerstoffbildungsraten (SBR)) analysiert werden, um die Auswirkungen der Kultivierungsbedingungen auf physiologische Veränderungen der Mikroalge zu beschreiben.

Im zweiten Abschnitt sollte überprüft werden, ob die ermittelten physiologischen Variationen mit molekularen Änderungen korreliert werden können. Eine gerichtete quantitative Analyse der Expressionsmuster relevanter Gene der Carotinoid- und Fettsäure-Biosynthese, der Photosynthese, des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus und der Stressantwort wurde durchgeführt und sollte anhand ungerichteter Proteom-Analysen erweitert werden. Die Analyse des Proteoms verschiedener zellulärer Zustände von *H. pluvialis* hatte dabei das Ziel, co-regulierte Proteine der Carotinoid-Biosynthese und anderer Stoffwechselprozesse zu charakterisieren und unbekannte Enzyme, Transporter oder andere Stoffwechselregulatoren zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen und Nährmedien

Für analytische, präparative und mikrobiologische Arbeiten wurden Chemikalien verwendet, welche in Tabelle 7.1 aufgelistet wurden. Weiterhin erfolgte die Herstellung von Puffern, Lösungen und Nährmedien gemäß der Angaben in Tabelle 7.2 und 7.3.

2.1.2 Enzyme und Kits

Für molekularbiologische Arbeiten wurden unterschiedliche Enzyme und Kits verwendet, deren Bezeichnung und Verwendung in Tabelle 7.4 und 7.5 aufgelistet wurden.

2.1.3 Größenstandards

Eine Auflistung der verwendeten Größen- und Molekülstandards für molekularbiologische bzw. analytische Zwecke erfolgte in der Tabelle 7.6.

2.1.4 Stämme

Kultivierungsexperimente erfolgten unter Verwendung des Stammes *Haematococcus pluvialis* SAG Nr. 34-1b aus der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen.

2.1.5 Primer

Eine Auflistung der verwendeten Primer inklusive der zugehörigen Sequenzinformationen und den ermittelten PCR-Effizienzen erfolgte in Tabelle 7.7.

2.1.6 Geräte , Verbrauchsmaterialien und Software

Die verwendeten Geräte und die zugehörigen Verbrauchs- bzw. Labormaterialien und Softwarepakete sowie deren Spezifikation und Herstellerangaben wurden in den Tabellen 7.8 - 7.10.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von *H. pluvialis* in Photobioreaktoren

Die Kultivierung von *H. pluvialis* wurde in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter und Systeme durchgeführt. Für alle Experimente wurden Zellen aus einer Vorkultur isoliert und in Abhängigkeit der geplanten Experimentalreihe weiterverarbeitet.

2.2.1.1 Anzucht von Vorkulturen

Von einer Emerskultur wurde mit einer Impföse unter sterilen Bedingungen eine Teilmenge des Ausgangsstammes auf 1 x BG-11-Agar überimpft bzw. in flüssiges 1 x BG-11-Medium überführt. Die primäre Flüssigkultur wurde in einer Zellkulturflasche mit Gasaustauschseptum unter kontinuierlicher Schwenkbewegung bei einer Photonenflussdichte (PFD) von 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (12 h täglich) kultiviert. Aus der primären Vorkultur wurde eine Teilmenge in sterile 250 ml bzw. 1 l-Schottflaschen überführt. Die Kultivierung der Zellen im nächst größeren Maßstab erfolgte unter kontinuierlicher Begasung mit Druckluft und CO_2 (1 % $\text{CO}_2(\text{v/v})$) bei einem Volumenstrom von 30 ml/min, einer Temperatur von 25 °C und einer PFD von 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (12 h täglich).

2.2.1.2 Experimentalreihen zur Induktion der Carotinoid-Biosynthese

Die Kultivierung von *H. pluvialis* erfolgte in unterschiedlichen Experimentalreihen, welche verschiedene analytische Zielstellungen verfolgten. Die Prozessparameter wurden gemäß folgender Tabelle festgelegt.

Tabelle 2.1: Übersicht angewendeter Kultivierungsparameter für Experimentalreihen

Kultivierungsparameter	Kulturmedium		Beleuchtungsregime		Gasgemisch ^{*3} (Volumenanteil CO ₂)	
	1x BG-11 (+NaNO ₃)	1x BG-11 (-NaNO ₃)	<i>low light</i> ^{*1}	<i>high light</i> ^{*2}	1,00 % CO ₂ (v/v)	0,03 % CO ₂ (v/v)
+N HL+C	x			x	x	
+N HL-C	x			x		x
-N HL+C		x		x	x	
-N HL-C		x		x		x
+N LL+C	x		x		x	
+N LL-C	x		x			x
-N LL+C		x	x		x	
-N LL-C		x	x			x

*1 PFD, Lichtspektrum: 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 2700 K; 71 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 660 nm; Tag-/Nachtzyklus: 16 h/8 h

*2 PFD, Lichtspektrum: 800 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 2700 K; 1065 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$; 450 nm; 724 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 470 nm; 24 h kontinuierlich

*3 Volumenstrom gesamt: 30 ml/min

Für die Versuche wurden steril Zellen aus der axenischen Vorkultur isoliert, mit einem Zentrifugationsschritt (10 min; 14.000 x g) separiert, mit destilliertem Wasser gewaschen (Zentrifugation 10 min; 14.000 x g) und anschließend in Medium aufgenommen. Die Zellkonzentration wurde auf ca. 250.000 Zellen/ml (Z/ml) eingestellt. Zellsuspensionen wurden unter aseptischen Bedingungen in sterile Kultivierungsgefäße überführt. Alle Probenahmen erfolgten unter aseptischen Bedingungen. Neben der Analyse physiologischer, molekularer und proteinbiochemischer Veränderungen der Zellen erfolgte eine Prozesskontrolle durch die Überprüfung der Zellkonzentration, BTS und GTS sowie der Pigmentkonzentrationen (Chl, Car, Ax) nach unterschiedlichen Zeitpunkten (*days post inoculation* (dpi)).

2.2.2 Mikroskopische Untersuchungen morphologischer Variationen und Analyse von Wachstumsindikatoren

Mikroskopische Analysen erfolgten zur Untersuchung morphologischer Variationen sowie der Bestimmung von Zellkonzentrationen und tot-lebend-Verhältnissen von *H. pluvialis*-Kulturen mit einem Durchlichtmikroskop (Olympus BX60, Software: cellSens Dimension) im Phasenkontrast und Hellfeld.

2.2.2.1 Bestimmung von Zellkonzentrationen

Die Bestimmung der Zellkonzentrationen erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer. Bei 100-facher Vergrößerung wurden acht Fotos aufgenommen (Fläche: 0,9 mm²). Anschließend erfolgte eine Zellzählung. Für die Berechnung der Zellkonzentration [Z/ μl] wurde der Mittelwert der Zellzahlen gebildet und durch das Volumen der Zählkammer (0,09 mm³) geteilt.

2.2.2.2 Zellfärbung zur Differenzierung lebender und toter Zellen

Methylenblau (nach Löffler) ist eine Färbelösung, welche in perforierte Membranstrukturen eindringen kann und eine Blaufärbung geschädigter Zellen bedingt. Für die Analyse des tot-lebend-Verhältnisses wurde diese in Zellsuspensionen pipettiert (Verhältnis 1:40). Die Quantifizierung lebender und toter Zellen erfolgte auf der Grundlage einer Zellkonzentrationsbestimmung gemäß der Angaben im Abschnitt 2.2.2.1.

2.2.2.3 Analyse morphologischer Variationen und Kontaminationskontrolle

Bei der mikroskopischen Analyse morphologischer Veränderungen wurde die Größe, Membranbeschaffenheit und Färbung sowie das Vorhandensein von Geißeln der Zellen bewertet. Weiterhin wurden die Proben auf Kontaminationen untersucht.

2.2.3 Bestimmung der GTS

Für die Bestimmung der GTS wurden mind. 6 ml einer Algensuspension isoliert, zentrifugiert (5 min; 17.000 x g) und in destilliertem Wasser aufgenommen. Nach der Zentrifugation (5 min; 17.000 x g) wurde das Pellet mit 2 ml destilliertem Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min; 17.000 x g) wurde das Pellet getrocknet (24 h; 100 °C) und das Gewicht bestimmt. Die Messwerte wurden für die Berechnung der GTS/ml Kulturvolumen verwendet und dienen zur Normalisierung von Pigmentgehalten.

2.2.4 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurde eine Kugelmühle (BeadBlaster™ 24R gekühlt, Benchmark Scientific) verwendet. Die benötigte Menge der aufzuschließenden Zellen wurde isoliert, mit destilliertem Wasser gewaschen und gemäß der Angaben in den folgenden Abschnitten weiterverarbeitet.

2.2.4.1 Zellaufschluss für Pigmentextraktionen

Für eine Pigmentextraktion wurde ein Zellpellet ($3 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ Zellen) mit Glaskugeln versetzt (25 - 50 x 0,4 - 0,6 mm; 1,7 - 2,0 mm) und in einer Kugelmühle aufgeschlossen (6,5 m/s; 45 s).

2.2.4.2 Zellaufschluss für Nukleinsäureisolationen

Für eine Nukleinsäureisolation wurden gefrorene Zellpellets ($3 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ Zellen) mit 150 µl eines Lysepuffers (Lysis Solution RL, innuSPEED Bacteria-Fungi RNA Kit, Analytik Jena) versetzt. Das Zellpellet wurde im Lysepuffer resuspendiert und in ein 2 ml-Schraubdeckelgefäß überführt, welches Zirconiumkügelchen (Triple-Pure™ High Impact Zirconium Beads, Ø: 1,5 mm) enthielt. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Kugelmühle (3 x 6,5 m/s; 45 s mit je 60 s Pause pro Zyklus).

2.2.4.3 Zellaufschluss für Proteinisolationen

Der Zellaufschluss zur Proteinisolation erfolgte unter Verwendung eines Mörsers und eines Pistills. Ein Zellpellet ($5 - 9 \times 10^7$ Zellen) wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in einen gekühlten Mörser überführt und mit einem ebenfalls gekühlten Pistill zu einem feinen Pulver verarbeitet.

2.2.5 Pigmentisolation durch organische Extraktion

Im Anschluss an den Zellaufschluss (Abschnitt 2.2.4.1) wurden die Proben mit 1 ml Lösungsmittel versetzt und mit einem Vortex homogenisiert. Für die Extraktion von Ax wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (25:75 (v/v)) eingesetzt, wohingegen für die Extraktion von Chl und der Car reines Methanol verwendet wurde. Die Pigmentextraktion erfolgte für 2 h bei 4 °C unter Ausschluss von Licht. Zur Konzentrationsbestimmung der Pigmente wurden die Überstände der Suspensionen isoliert (Zentrifugation 5 min; 17.000 x g) und photometrisch vermessen (Abschnitt 2.2.7).

2.2.6 Trennung von Pigmentextrakten mittels Chromatografie

Die Identifikation und Trennung von Pigmenten erfolgte mit Hilfe unterschiedlicher chromatografischer Methoden. Für die Durchführung einer Chromatografie wurden die Proben gemäß der Angaben vorheriger Abschnitte isoliert, gereinigt und aufgeschlossen. Die Extraktion der Pigmente erfolgte analog der beschriebenen Vorgehensweise im vorherigen Abschnitt mit einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Dichlormethan und Methanol (25:75 (v/v)).

2.2.6.1 Trennung von Pigmentextrakten durch Dünnschichtchromatografie (DC)

Für eine DC wurden erhitzte Aluminiumfolien (30 min; 110 °C) mit einer unmodifizierten Kieselgelschicht (Porendurchmesser: 60 Å) und DC-Kammern mit Laufmitteln vorbereitet. Es wurden 10 µl der Analyselösung auf die Platten aufgetragen und diese in die Laufmittelkammer überführt. Die Trennung der Pigmente erfolgte bis die Laufmittelfront einen Bereich kurz vor dem oberen Ende der stationären Phase erreichte. Die Auswertung erfolgte anhand von Standardlösungen sowie den Angaben aus der Literatur.

2.2.6.2 Identifikation von Ax-Derivaten in Pigmentextrakten durch *High performance liquid chromatography* (HPLC)

Zur eindeutigen Identifikation von Ax in Pigmentextrakten von *H. pluvialis* wurde eine HPLC-Analyse unter Verwendung eines Ax-Standards (SML0982, Sigma Aldrich) durchgeführt. Die Standardsubstanz wurde analog zu den Probenmaterialien in einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (25:75 (v/v)) aufgenommen und in definierten Konzentrationen in der Analyse verwendet. Im Vorfeld wurden 200 µl der Probenextrakte mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porendurchmesser: 0,45 µm) filtriert und in HPLC-Vials überführt. Die Vials wurden mit Septen und Schraubdeckeln verschlossen und in der Probenvorrichtung eines HPLC-Gerätes (1100 Series, Agilent) positioniert. Für die Auftrennung der Proben wurde eine Reversed-Phase C18-Säule (HPLC-Säule LiChrospher 100 RP-18 mit Vorsäule, Merck) sowie ein Laufmittel aus Methanol, 1-Propanol und Aceton (75:20:5 (v/v/v)) verwendet. Die Chromatografie erfolgte mit folgenden Parametern: Flussrate Lösungsmittel: 1,7 ml/min, Lösungsmittelgradient: isokratisch, Injektionsvolumen: 20 µl, Detektion: Diodenarray-Detektor (DAD) 450 nm. Die Auswertung erfolgte mit der Software ChemStation Edition for LC 3D Systems (B.04.02). Die Retentionszeit des Ax-Standards betrug unter Verwendung des angegebenen Protokolls 2,14 min.

2.2.7 Bestimmung von Pigmentkonzentrationen durch Spektrophotometrie

Für die Bestimmung von Pigmentkonzentrationen wurden Absorptionsmessungen an einem UV/Vis-Spektrophotometer (Agilent 8453 UV/VIS Photometer, Agilent Technologies) in einer Quarzglasküvette (d = 10 mm) durchgeführt. Die Verdünnungen der Analyselösungen wurden so gewählt, dass die Absorptionswerte im Messwertbereich 0,05 - 1,1 lagen. Als Blindwert wurde das zur Extraktion eingesetzte Lösungsmittel vermessen (Dichlormethan:Methanol 25:75 (v/v) für Ax, Methanol für Chl und Car). Die Berechnung der Ax-Konzentrationen [µg/ml] basierte auf Formel 2.1, welche mit einem Ax-Standard (SML0982) ermittelt wurde.

$$c(\text{Astaxanthin})[\mu\text{g/ml}] = 8,9359 \cdot (A_{520} - A_{575}) - 0,13711 \quad (2.1)$$

Für die Konzentrationsbestimmung von Chl und der Car [$\mu\text{g/ml}$] wurden die Formeln 2.2 und 2.3 gemäß der Publikation von Henriques und Rocha verwendet [Henriques und Rocha, 2007].

$$c(\text{Chlorophyll}_a)[\mu\text{g/ml}] = 15,65 \cdot (A_{666} - A_{750}) \quad (2.2)$$

$$c(\text{Gesamtcarotinoid})[\mu\text{g/ml}] = \frac{(1000 \cdot (A_{470} - A_{750}) - 44,76 \cdot (A_{666} - A_{750}))}{221} \quad (2.3)$$

2.2.8 Berechnung photosynthetischer Aktivitätsparameter anhand von Chlorophyllfluoreszenzen unter Verwendung unterschiedlicher Messsysteme

Die Berechnung photosynthetischer Aktivitätsparameter basierte auf Chlorophyllfluoreszenzmessungen. Zu Beginn der Messungen wurde die Chlorophyllfluoreszenz dunkeladaptierter PS bestimmt (F_0). Anschließend erfolgte ein sättigender Lichtimpuls, welcher die Messung der maximalen Chlorophyllfluoreszenz dunkeladaptierter PS (F_M) ermöglichte. Die variable Chlorophyllfluoreszenz im *steady-state* (F_S) wurde nach der Applikation definierter Lichtintensitäten ermittelt. Die maximale Chlorophyllfluoreszenz lichtadaptierter PS (F_M') wurde nach erneuter Applikation eines sättigenden Lichtimpulses gemessen. Anhand der Werte konnten photosynthetische Aktivitätsparameter gemäß folgender Formeln berechnet [Murchie und Lawson, 2013].

$$F_V / F_M = \frac{(F_M - F_0)}{F_M} \quad (2.4)$$

$$F_V' / F_M' = Y(II) = \frac{(F_M' - F_S)}{F_M'} \quad (2.5)$$

$$NPQ = \frac{(F_M - F_M')}{F_M'} \quad (2.6)$$

2.2.8.1 Imaging Pulse-Amplitude-Modulation (Imaging-PAM) Fluorometer

Für Chlorophyllfluoreszenzmessungen mit dem Imaging-PAM Fluorometer (Walz) erfolgte eine Immobilisierung von Zellen auf einer Nitrocellulose-Filtermembran (Porengröße: $0,45 \mu\text{m}$). Die Membranen wurden auf einer Vakuumfiltrationsapparatur eingespannt und mit destilliertem Wasser versetzt. Anschließend wurde eine Zellsuspension (3 ml ; $3 \times 10^5 \text{ Z/ml}$) aufgetragen und Vakuum angelegt. Die Membran wurde auf eine mit destilliertem Wasser benetzte $1 \times \text{BG-11-Agarplatte}$ überführt. Vor der Messung wurden die Proben für 30 min bei Raumtemperatur dunkeladaptiert. Im Anschluss wurde in der Gerätesoftware (ImagingWin V2.41a) der Analysebereich der Proben definiert und die Licht- bzw. Signalintensität festgelegt (Signalintensität: $0,09 - 0,15$). Die Messungen wurden in Abhängigkeit definierter Lichtintensitäten und Beleuchtungsintervalle durchgeführt (40 s Beleuchtung mit $0, 14, 33, 52, 73, 102, 132, 170, 217, 285, 360, 458, 580, 745, 950, 1.200 \mu\text{E/m}^2\text{s}$), welche von einem Modul mit $96 \text{ light-emitting diodes}$ (LEDs) (470 nm) erzeugt wurden. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde während der Applikation eines Messlichtes (470 nm) bestimmt. Die Analysebereiche wurden manuell markiert. Die Berechnung der Analyseparameter (F_V/F_M , F_V'/F_M' , NPQ) erfolgte auf Grundlage der Formeln 2.4 - 2.6.

2.2.8.2 FluorCam

Für Chlorophyllfluoreszenzmessungen mit dem Gerät FluorCam (Photon System Instruments) wurden Zellsuspensionen isoliert und für 30 min bei Raumtemperatur dunkeladaptiert. Es wurden acht Kavitäten einer 12-Well Platte mit 1 ml nativer Flüssigkulturen befüllt, welche im gleichen Abstand zu einem definierten Mittelpunkt lagen. Der Messwertbereich wurde in der Analysesoftware (FluorCam 7) eingestellt (maximale Signalintensität: 500). Die Messungen wurden in Abhängigkeit definierter Lichtintensitäten und Beleuchtungsintervalle durchgeführt (40 s Beleuchtung mit 0, 1, 3, 35, 86, 171, 403 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$), welche von einem LED-Panel (130 x 130 mm, kaltweiße LED) erzeugt wurden. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde während der Applikation eines Messlichtes (617 nm) bestimmt. Nach der Messung wurden die Analysebereiche markiert und das Hintergrundsignal auf einen Schwellenwert von 200 festgelegt. Die Berechnung der Analyseparameter (F_v/F_m , F_v'/F_m' , NPQ) erfolgte auf Grundlage der Formeln 2.4 - 2.6.

2.2.9 Ermittlung von Sauerstoffbildungsraten (SBR) durch die Bestimmung von Gasbildungspotentialen

Zur Bestimmung von Gasbildungspotentialen wurden 80 ml einer Zellsuspension (5×10^4 Z/ml) unter aseptischen Bedingungen in 100 ml-Schottflaschen überführt und druckdicht verschlossen (Schraubverschluss mit integriertem Drucksensor und Datenübertragungskabel). Die Proben wurden während der Messung unter kontinuierlicher Durchmischung bei 25 °C inkubiert. Die Druck- und Temperaturprofile wurden in Abhängigkeit periodischer Beleuchtungsintervalle aufgezeichnet (LED 2.700 K; 171 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$; 3 x 3 h). Die Ermittlung der Gasbildungsrate erfolgte in einem Intervall von 60 min nach Beginn der Beleuchtungsphase. In dem ausgewählten Bereich wurde eine lineare Regression der Daten durchgeführt, welche unter Berücksichtigung des idealen Gasgesetzes die Berechnung einer Gasbildungsrate [mmol/min] ermöglichte. Unter der Modellannahme, dass in den Systemen nur Sauerstoff produziert wird, kann die Gasbildungsrate in die SBR pro Zelle [$\text{pg O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{Zelle}^{-1}$] umgerechnet werden.

2.2.10 Isolation von genomischer DNA (gDNA)

Zur Isolation von gDNA aus *H. pluvialis* wurde ein Zellaufschluss gemäß der Angaben im Abschnitt 2.2.4.2 durchgeführt. Für die gDNA-Isolation wurde ein Isolationskit (innuPREP Bacteria DNA Kit, Analytik Jena) gemäß der Vorgaben des Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte mit 50 μl RNase-freiem Wasser

2.2.11 Isolation von RNA

Zur Isolation von RNA aus *H. pluvialis* wurde ein Zellaufschluss gemäß der Angaben im Abschnitt 2.2.4.2 durchgeführt. Es wurde ein RNA-Isolationskit (innuSPEED Bacteria-Fungi RNA Kit, Analytik Jena) gemäß der Vorgaben des Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte mit 50 μl RNase-freiem Wasser.

2.2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mit einem NanoPhotometerTMNP80-Touch mobil (Implen). Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz auf Grundlage der Absorptionswert bei 260 nm. Der Quotient der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm bzw. 230 nm wurde als Qualitätsmerkmal berücksichtigt.

2.2.13 Entfernung gDNA aus RNA-Präparationen durch einen DNase I-Verdau

Für einen DNase I-Verdau wurden 4 µl DNase I (RNase-frei) (ThermoFisher Scientific, 1 U/µl) mit 4 µl Reaktionspuffer (ThermoFisher Scientific) sowie 4 µg einer RNA-Präparation versetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit nukleasefreiem Wasser auf 40 µl aufgefüllt, vorsichtig homogenisiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 8 µl DNase Removal Reagent (ThermoFisher Scientific) versetzt und für 2 min bei 25 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Proben zentrifugiert (1 min; 800 x g) und die Überstände in RNase-freie Reaktionsgefäße überführt. Die vollständige Entfernung der gDNA wurde mit einer quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktions-Analyse (qPCR-Analyse) überprüft (*Non Reverse Transcriptase Control* (NRT)).

2.2.14 Synthese komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription von RNA

Für die Synthese von cDNA wurde ein Kitsystem (FastGene Scriptase Basic cDNA Kit, Nippon Genetics) verwendet. Zunächst wurden 500 ng RNA mit 1 µl Oligo-dT-Primer (80 µM) versetzt und die Ansätze mit Diethyldicarbonat-behandeltem Wasser (DEPC-Wasser) auf 14,5 µl aufgefüllt. Die Proben wurden im Anschluss in einem Heizblock inkubiert (5 min; 42 °C), nachfolgend in ein Eisbad überführt und mit je 5,5 µl eines MM versetzt, welcher Komponenten gemäß der Angaben in der folgenden Tabelle beinhaltet.

Tabelle 2.2: Komposition des MM zur Durchführung einer reversen Transkriptionsreaktion

Komponente	c(final)/Ansatz	Volumen für 1x 5,5 µl MM
10x FastGene Scriptase Basic Puffer	1x	2,0 µl
10 mM dNTPmix	0,2 mM (alle)	2,0 µl
FastGene Scriptase Basic (200 U/µl)	200 U	1,0 µl
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	20 U	0,5 µl

Die Proben wurden durchmischt und erneut in einem Heizblock inkubiert (60 min; 42 °C). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionen durch eine Temperaturerhöhung abgestoppt (5 min; 90 °C).

2.2.15 Etablierung spezifischer Primerpaare für Genexpressionsanalysen durch PCR

Für die Experimente wurden Primerpaare für unterschiedliche Gensequenzen mit der Software Primer3web (V4.1.0) generiert bzw. den Angaben aus der Literatur entnommen [Lei *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2019]. Eine Übersicht der Primer ist der Tabelle 7.7 zu entnehmen.

2.2.15.1 Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche durch PCR

Für PCR-Experimente wurden 10 µl eines MM (Tabelle 2.3) in 0,2 ml PCR-Gefäße aliquotiert und mit 10 pg - 1 µg einer Template-DNA versetzt. Die Ansätze wurden zentrifugiert (30 s; 4.000 *rounds per minute* (rpm)) und gemäß des Protokolls in Tabelle 2.4 in einen Thermocycler (Analytik Jena) inkubiert.

Tabelle 2.3: Komposition des MM zur Durchführung einer PCR-Reaktion

Komponente	c(final)/Ansatz	Volumen für 1x 12,5 µl MM
10x DreamTaqPuffer	1x	1,25 µl
10 mM dNTPmix	0,2 mM (alle)	0,25 µl
10 µM <i>forward</i> Primer	0,2 µM	0,25 µl
10 µM <i>reverse</i> Primer	0,2 µM	0,25 µl
Template-DNA	10 pg - 1 µg	2,50 µl
DreamTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3125 U	0,0625 µl
DEPC-H ₂ O		ad 12,5 µl

Die Auswertung der PCR-Analyse erfolgte mit einer Agarosegelelektrophorese für DNA (Abschnitt 2.2.17).

Tabelle 2.4: Temperaturprotokoll zur Durchführung einer PCR-Reaktion

Programm	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	30	35
Primerhybridisierung	60/65	30	
Extension	72	60 s/kb	
Finale Extension	72	300	1
Stopp	4	~	

2.2.16 Quantitative Genexpressionsanalysen unter Verwendung von qPCR

Für qPCR-Experimente wurden 7,5 µl eines MM (Tabelle 2.5) sowie 2,5 µl eines cDNA-Templates bzw. Kontrollen (NRT bzw. DEPC-Wasser) in die Kavitäten weißer 96-Well-Platten pipettiert. Die Platten wurden mit einer adhäsiven Folie versiegelt und zentrifugiert (30 s; 2.200 rpm; Plattenzentrifuge, neoLab).

Tabelle 2.5: Komposition des MM zur Durchführung einer qPCR-Reaktion

Komponente	c(final)/Ansatz	Volumen für 1x 10,0 µl MM
2x qPCR SyGreen Blue Mix	1x	5,00 µl
10 µM <i>forward</i> Primer	400 nM	0,40 µl
10 µM <i>reverse</i> Primer	400 nM	0,40 µl
Template	1,5 ng/µl	2,50 µl
DEPC-H ₂ O		ad 10,0 µl

Im Anschluss wurden die Platten gemäß der Angaben des Protokolls in Tabelle 2.6 in einem Thermocycler (qTower3[®] touch, Analytik Jena) inkubiert. Zusätzlich wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Tabelle 2.6: Temperaturprotokoll zur Durchführung einer qPCR-Reaktion

Programm	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	1
Denaturierung	95	20	35
Primerhybridisierung	60/65	15	
Extension* ¹	72	10	
Schmelzkurve	60-95	15 s/K	1

*¹ Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte im Anschluss an jeden erfolgten Extensionsschritt im SYBR-Kanal des verwendeten qPCR-Gerätes.

Es wurden primerspezifische Standardgeraden mit cDNA-Verdünnungen generiert. Aus den Werten des *cycle of threshold* (C_t) der Verdünnungsstufen wurde mittels einer linearen Regression die Steigung der Funktion (m) ermittelt und anhand der Formel 2.7 [Meijerink *et al.*, 2001] für die Berechnung der PCR-Effizienzen verwendet. Die PCR-Effizienzen sind der Tabelle 7.7 zu entnehmen.

$$PCR - \text{Effizienz} = 10^{\frac{-1}{m}} - 1 \quad (2.7)$$

Für die Auswertung der qPCR-Experimente wurde eine relative Quantifizierung auf der Grundlage der Delta-Delta C_t -Methode (dd C_t -Methode) unter Berücksichtigung einer Effizienz-Korrektur durchgeführt. Hierbei wird die relative Genexpression eines *gene of interest* (GOI), unter Berücksichtigung der PCR-Effizienz, aus der Differenz der Expressionsdaten des GOIs in einer Kontrolle und der Probe in Bezug zu Referenzgenen berechnet. Die Berechnung erfolgte anhand der folgenden Formel [Pfaffl, 2001].

$$\text{relative } x - \text{fache Genexpressionsveränderung} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{(C_t_{\text{Kalibrator}} - C_t_{\text{Probe}})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{(C_t_{\text{Kalibrator}} - C_t_{\text{Probe}})}} \quad (2.8)$$

In den Analysen wurden die C_r -Werte der GOIs und Referenzgene (große Untereinheit Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (*RBCL*) und *UBIQUITIN*) einer unter nicht-induktiven Bedingungen kultivierten Kontrolle (+N LL+C) als die Expressionsdaten des Kalibrators in Gleichung 2.8 berücksichtigt.

2.2.17 Trennung von DNA-Gemischen durch Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Analyse von DNA-Proben erfolgte mit 1,5 - 2 %-igen Agarosegelen. Für die Herstellung wurde Agarose in 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) erhitzt und mit 5 μ l eines in DNA interkalierenden Farbstoffes (Midori Green Advance DNA stain, Nippon Genetics) versetzt. Nachfolgend wurde die Agaroselösung in eine Gelkammer gegossen. Anschließend wurde das Gel in eine Elektrophoreseapparatur überführt, welche 1 x TAE-Puffer beinhaltet. Die Proben wurden mit einem DNA-Ladepuffer (Nippon Genetics) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Es wurden Größenstandards als Referenz verwendet (GeneRuler™ 50 bzw. 100 bp DNA Ladder, ThermoFisher Scientific). Die Auftrennung der Nukleinsäuren im Agarosegel erfolgte bei 100 - 120 V für ca. 45 min. Die Auswertung der DNA-Fragmente erfolgte mit einem Geldokumentationssystem (UVP GelSolo, Analytik Jena).

2.2.18 Trennung von RNA-Gemischen durch Agarosegelelektrophorese

Die Qualität einer RNA-Präparation wurde mit einer Agarosegelelektrophorese analysiert. Hierfür wurde eine 1,5 %-ige Agaroselösung mit 1 x TAE-Puffer hergestellt und erhitzt. Die Lösung wurde mit 6 μ l eines interkalierenden Farbstoffes (Midori Green Xtra, Nippon Genetics) versetzt. Für die Analyse wurden 750 ng RNA verwendet. Die Proben wurden mit DEPC-Wasser auf 20 μ l aufgefüllt, mit Ladepuffer (Nippon Genetics) versetzt und anschließend zuerst in einem Heizblock inkubiert (10 min; 65 °C) und nachfolgend auf Eis überführt. Die Proben wurden zentrifugiert (30 s; 4.000 rpm) und in die Kavitäten des Agarosegels pipettiert. Zusätzlich wurde ein Größenstandard (1kb Plus DNA Ladder, Fermentas) auf das Gel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte für 90 min bei 100 - 120 V. Die RNA-Fragmente wurden mit einem Geldokumentationssystem (UVP GelSolo, Analytik Jena) analysiert.

2.2.19 Isolation von Proteinen aus *H. pluvialis*

Zur Isolation von Proteinen aus *H. pluvialis* wurden Puffer gemäß der Angaben in Tabelle 7.2 hergestellt. Extraktionspuffer 1 (EB1) wurde mit 1,5 % einer Protease-Inhibitor Lösung für Pflanzen (Sigma Aldrich) versetzt und auf 95 °C erhitzt. Nach dem Zellaufschluss (Abschnitt 2.2.4.3) wurden die Proben mit zwei Volumen der EB1-Lösung versetzt. Die Ansätze wurden homogenisiert, 10 min bei 95 °C und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 min; 16.000 x g; 10 °C), die Überstände in 1,5 ml-Ultrazentrifugationsgefäße (Beckman Coulter) überführt, erneut zentrifugiert (30 min; 20.000 x g; 10 °C) und für eine Proteinkonzentrationsmessung (2.2.20) vorbereitet

2.2.20 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das Kit 2-D Quant (Sigma Aldrich) gemäß des vom Hersteller angegebenen Protokolls verwendet. Zur Bestimmung einer Standardgeraden wurde eine Verdünnungsreihe (0 - 50 μ g) mit einer Stammlösung aus bovinem Serumalbumin (BSA) (2 mg/ml) hergestellt. Anschließend erfolgte eine Absorptionsmessung der Standards sowie der Proben bei 480 nm an einem UV/Vis-Spektrophotometer (Beckman Coulter).

2.2.21 Analysen zur Untersuchung des Proteoms: Proteomics

Für die Analyse erfolgte ein Zellaufschluss und eine Proteinisolation gemäß Abschnitt 2.2.4.3 bzw. 2.2.19.

2.2.21.1 Probenvorbereitung - Reduktion und Alkylierung

Die Probenvorbereitung erfolgte unter Verwendung von Filtereinheiten (Amicon Ultra 30K Filter, Merck), welche für 16 h in einer 5 %-igen Tween-20-Lösung inkubiert und anschließend dreimal für 30 min in destilliertem Wasser gewaschen wurden. Es wurden 100 µg des Gesamtproteins verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 14.000 x g für 10 min durchgeführt. Die Proben wurden mit Harnstoff-Lösung (UA) auf 200 µl ergänzt und auf die Filtermembranen pipettiert, anschließend zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Filter wurden mit 200 µl UA versetzt, zentrifugiert und die Überstände entfernt. Die Abfolge wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Membranen mit 100 µl Reduktionslösung (UAD) versetzt und schüttelnd inkubiert (1 h; 22 °C). Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände verworfen. Der Prozess wurde unter Verwendung von 100 µl Alkylierungslösung (UAI) wiederholt, wobei die Inkubation im Dunkeln erfolgte (1 h; 22 °C). Die Filter wurden zweimal mit 200 µl UA gewaschen. Nach Entfernung der Überstände wurden die Filter durch die zweifache Zugabe von 100 µl Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (ABC) für eine proteolytischen Verdau equilibriert.

2.2.21.2 Probenvorbereitung - proteolytischer Verdau

Für die Behandlung der Proben mit der Endoproteinase Lys-C wurden 50 µl der ABC-Lösung mit 0,5 µg Lys-C (Enzym zu Proteinverhältnis 1:200) versetzt und zu den Proben hinzugefügt. Die Ansätze wurden inkubiert (4 h; 37 °C) und anschließend mit 2 µg Trypsin (Enzym zu Proteinverhältnis 1:50) versetzt. Nach der Zugabe des Trypsins erfolgte eine Inkubation in einem Heizblock (12 h; 37 °C). Im nächsten Schritt wurden die Filtereinheiten in neue Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert und die Überstände separiert. Die Filter wurden mit 40 µl der ABC-Lösung versetzt und zentrifugiert. Der Schritt wurde wiederholt und die Überstände vereint. Die Peptide wurden anschließend mit einem Vakuumkonzentrator (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen) getrocknet (1.300 rpm; 40 °C).

2.2.21.3 Probenvorbereitung - Entsalzung

Die Peptide wurden einem Entsalzungsprotokoll mit *Stop and Go Extraion C18-Tips* (STAGE Tips) unterzogen. Zur Konditionierung wurden diese in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, mit 100 µl 80 %-igen Acetonitril und 0,1 % Methanol (v/v) versetzt und zentrifugiert (2 min; 1.500 x g). Die Equilibrierung der STAGE Tips erfolgte durch die zweimalige Zugabe von 100 µl 0,1 %-igem Methanol gefolgt von einer Zentrifugation (2 min; 1.500 x g). Im Anschluss wurden 100 µl der Peptidproben auf die STAGE Tips pipettiert und zentrifugiert (2 min; 1.500 x g). Die Überstände wurden entfernt, die STAGE Tips mit 100 µl 0,1 %-igem Methanol versetzt und zentrifugiert (2 min; 1.500 x g). Der Prozess wurde wiederholt und die Tips in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Elution der Peptide erfolgte mit 50 µl 80 % Acetonitril (0,1 % Methanol (v/v)) und anschließender Zentrifugation (1 min; 1.500 x g). Der Elutionsschritt wurde wiederholt. Zuletzt wurden die Überstände in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und die entsalzten Peptide in einem Vakuumkonzentrator (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen) getrocknet (1.300 rpm; 40 °C).

2.2.21.4 Flüssigchromatografie (LC) und Massenspektrometrie (MS)

Die Peptidpräparationen wurden in 10 µl 5 %-igem Acetonitril mit 0,1 % Methanol (v/v) gelöst und in einem QExactive Plus Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific) mit EASY nanoLC-1000 Flüssigchromatographiesystem (ThermoFisher Scientific) analysiert. Die Flussrate während der Chromatografie wurde auf 250 nl/min eingestellt. Die Peptide wurden auf einer analytischen Reversed-Phase C18-Säule (Easy Spray Reversed-Phase C18-Säule (ES803A), ThermoFisher Scientific) separiert (Laufmittelgradient 5 % - 40 % (Acetonitril in 0,1 % Methanol); 3 h). Anschließend erfolgte eine Elektronenspray-Ionisierung der Peptide (Sprühspannung: 1,9 kV; Kapillartemperatur: 275 °C; Z-Linsen Spannung: 240 V). Für die MS-Analyse wurde eine Top10 *Data-Dependent Acquisition* (DDA) Scanstrategie mit *higher-energy collisional dissociation* (HCD)-Fragmentierung angewendet, welche einen vollständigen MS-Scan, gefolgt von bis zu zehn MS/MS-Scans der Produkt-Ionen der zehn häufigsten Vorläufer-Ionen vorsah. Der vollständige MS-Scan wurde unter Verwendung folgender Parameter durchgeführt: chromatografische Peakweite: 15 s; Auflösung: > 70.000; automatische Verstärkungsregelung (AGC): 3E+06; maximale Injektionszeit: 100 ms. Hierbei wurden MS-Scans mit einem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) von 400 - 1.300 berücksichtigt. Die MS/MS-Analyse erfolgte mit folgenden Parametern: Auflösung: > 17.500; AGC: 5E+04; maximale Injektionszeit: 50 ms; Isolationsbreite: 1,6 m/z; normalisierte Kollisionsenergie: 28; Unterfüllungsgrad: 3 %; Intensitätsschwellenwert: 3E+04; dynamische Ausschlussdauer: 20 s.

2.2.21.5 Peptididentifikation und quantitative Auswertung der MS-Daten

Die Peptididentifikation erfolgte mit der Software Mascot Search Engine V2.5.1 (Matrix Science) und Proteome Discoverer V2.1 (ThermoFisher Scientific). Anhand der MS-Rohdaten erfolgte die Zuordnung der Peptide zu *in-silico* generierten Peptid-Ionen (identisches m/z) und der während des MS/MS-Scans erzeugten Spektrenliste. Als Vergleichsdatenbank wurde ein Referenzproteom des Stammes *H. lacustris* NIES-144 (Proteom-Identifikationsnummer UP000485058: 28.121 Proteine) verwendet [Morimoto *et al.*, 2020]. Als Protease wurde Trypsin angegeben (*missed cleavage tolerance*: 2). Im Rahmen des Datenbankabgleiches wurde eine Fehlertoleranz des m/z der Vorläufer-Ionen von 5 ppm und bei der Masse der Fragment-Ionen von 0,02 Da toleriert. Als Aminosäuremodifikation wurde die Carbamidomethylierung von Cysteinresten festgelegt. Die Oxidation von Methionin wurde als variable Modifikation angenommen. Die Identifikation der *False Discovery Rates* (FDR) der *Peptide Spectral Matches* (PSMs) sowie der Peptid- und Proteinlevel erfolgte mit einem *target-decoy database search*-Modell. Für die Signifikanz der PSMs und Peptidlevel wurde ein Schwellenwert von $\alpha = 0,01$ bzw. $\alpha = 0,05$ für die Proteinlevel toleriert. Weiterführende Analysen erfolgten mit Proteinen, welche auf Grundlage softwareinterner Algorithmen als Master-Proteine identifiziert wurden. Es wurde ein Ranking-Score von Proteinen einer Kategorie nach folgenden Kriterien berechnet: Anzahl der Peptidsequenzen, Anzahl der PSMs, Protein-Score und Sequenzübereinstimmung. Die Proteine mit dem höchsten Score wurden als Master-Protein charakterisiert. Um die Abundanzlevel von Master-Proteinen vergleichen zu können, erfolgte die Berechnung eines *Protein Quantification Index* (PQI). Hierzu wurden die Rohdatensätze der PSMs einzelner Master-Proteine im relativen Bezug zur Summe aller PSMs der Probe dargestellt.

2.2.22 Statistik und bioinformatische Datenauswertung

Die Analysen statistischer Unterschiede zwischen mehreren Proben bzw. Variablen sowie die Darstellung der Ergebnisse (p-Werte) erfolgte auf Grundlage einer ein- bzw. zweifaktoriellen *analysis of variance* (ANOVA) mit der Software RStudio (V4.1.0) unter Verwendung folgender Erweiterungspakete: „*plyr*“, „*EnvStats*“, „*ggplot2*“, „*multcompView*“, „*tidyr*“, „*BiocManager*“ [Team R Core, 2020]. Im Anschluss an die einfaktorielle ANOVA wurde ein *Honest Significant Difference-Test* von Tukey (Tukey-HSD) als Post-hoc-Test durchgeführt. Korrigierte p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

2.2.22.1 Statistische Auswertung und Ergebnispräsentation

Die statistische Analyse der Ergebnisse von Wachstumsindikatoren, Pigmentkonzentrationen und photosynthetischer Aktivitätsparameter erfolgte unter Berücksichtigung der Angaben im Abschnitt 2.2.22. In den Balkendiagrammen im Abschnitt 3.2.2 und 3.3 erfolgte die Angabe signifikanter Unterschiede (* für $p \leq 0,05$) in Bezug zu den Kontrollproben (0 bzw. 1 dpi). Die Analysen der Ergebnisse im Abschnitt 3.2.3 zielten darauf ab, signifikante Unterschiede zwischen den Proben am zehnten Tag der Experimente darzustellen. Die Proben wurden auf der Grundlage signifikanter Unterschiede (* $p \leq 0,05$) in Konfidenzgruppen eingeteilt, welche durch Buchstaben gekennzeichnet wurden. Für eine vollständige statistische Bewertung wurden die Datenreihen separat in Abhängigkeit des Faktors der Zeit oder des Behandlungsregimes analysiert (einfaktorielle ANOVA). Weiterhin erfolgte ein Vergleich signifikanter Unterschiede in Abhängigkeit beider Faktoren (zweifaktorielle ANOVA). Die Gesamtheit der Signifikanzniveaus (p-Werte) sind Kapitel 1 und 2 des statistischen Anhangs (Teil B) zu entnehmen.

2.2.22.2 Statistische Analyse und Auswertung von Genexpressionsänderungen

Die statistische Analyse von Genexpressionsunterschieden erfolgte unter Berücksichtigung der Angaben im Abschnitt 2.2.22. In den dargestellten Balkendiagrammen im Abschnitt 3.4.2 erfolgte die Angabe statistisch signifikanter Unterschiede (* für $p \leq 0,05$) in Bezug zu einer Kontrollprobe (+N LL+C). Für eine vollständige statistische Bewertung der Proben wurden die Datenreihen teilweise in Abhängigkeit der Zeit oder des Behandlungsregimes analysiert (einfaktorielle ANOVA). Weiterhin erfolgte ein Vergleich signifikanter Unterschiede in Abhängigkeit der Zeit und des Behandlungsregimes (zweifaktorielle ANOVA). Die Gesamtheit der Signifikanzniveaus (p-Werte) sind dem Kapitel 3 des statistischen Anhangs (Teil B) zu entnehmen. Die Datenmatrizes der Experimente wurden mit dem Programm Perseus (V1.6.6.0) ausgewertet [Tyanova *et al.*, 2016]. Die Daten wurden mit einem Z-Scoring normalisiert und einem hierarchischen Clustering unterzogen bei dem die Distanzmessung der Reihen (Gene) bzw. Spalten (Kultivierungsbedingungen und Zeitpunkte) mit einer Pearson- bzw. Spearman-Korrelation erfolgte.

2.2.22.3 Statistische Analyse und Auswertung von Proteomics-Experimenten

Die Datenmatrizes der Proteine aus *H. pluvialis*-Zellen wurden mit dem Programm Perseus (V1.6.6.0) ausgewertet [Tyanova *et al.*, 2016]. Die Analyse erfolgte auf qualitativer und quantitativer Ebene. Bei der Auswertung wurden Filterkriterien gemäß Abschnitt 2.2.21.5 angewendet. Die Daten wurden mit einem Z-Scoring normalisiert und einem hierarchischen Clustering unterzogen. Distanzmessung der Reihen (Proteine) bzw. Spalten (zelluläre Zustände) erfolgte mit einer Pearson- bzw. Spearman-Korrelation.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierungsstrategien zur Optimierung der Biomasse- und Ax-Produktion von *H. pluvialis*

Die ersten Experimentalreihen zielten darauf ab, die Kultivierung von *H. pluvialis* zu charakterisieren und den Einfluss einzelner Prozessparameter zu untersuchen. Für die Bewertung des Einflusses der Parametervariationen wurden Analysen bezüglich der Zellzahl, der Ax- sowie der Chl- und Car-Konzentrationen durchgeführt. Initial erfolgte eine chromatografische Analyse der unterschiedlichen Proben, um Ax in den Extrakten eindeutig nachzuweisen. Die Identität des Moleküls konnte auf Grundlage eines analytischen Standards anhand zweier chromatografischer Methoden (vgl. Abb. 7.1) bestätigt werden. Fortlaufend wurden Pigmentkonzentrationen auf Grundlage spektrophotometrischer Messungen gemäß der Angaben in Abschnitt 2.2.7 ermittelt. Aus Vorversuchen wurden Kultivierungsbedingungen abgeleitet, mit denen die Grenzzustände der Kultivierung von *H. pluvialis* (mobile Phase, hohes Maß an Zellteilung, geringes Maß an Ax-Produktion vs. nicht-mobile Phase, geringes Maß an Zellteilung, hohes Maß an Ax-Produktion) reproduzierbar abgebildet werden konnten. Die zellulären Zustände (mobile Phase bzw. nicht-mobile Phase) wurden durch die Anwendung nicht-induktiver (+N LL+C: Nitrat-anwesenheit, periodische Applikation niedriger Lichtintensität (LL)) bzw. induktiver Bedingungen (-N HL+C: Nitratmangel, kontinuierliche Beleuchtung mit hoher Lichtintensität (HL)) erreicht (vgl. Tabelle 2.1). In den folgenden Experimenten wurden die Ansätze bei induktiven und nicht-induktiven Bedingungen stets als Kontrollen mitgeführt, wodurch jede Experimentalreihe hinsichtlich der Reproduzierbarkeit validiert werden konnte.

3.2 Einfluss von Kultivierungsbedingungen auf das Wachstum und pigmentspezifische Variationen von *H. pluvialis*

Im Rahmen der Experimentalreihen sollte der Einfluss der kombinierten Variation der Kultivierungsparameter: Licht, CO₂-Begasung und Nitratanwesenheit im Kulturmedium auf physiologische und molekulare Reaktionen von *H. pluvialis* untersucht werden. Neben den spezifischen Analysen ausgewählter Parameter erfolgte die Bestimmung weiterer Versuchsgrößen (Zellkonzentration, GTS, BTS, pH-Wert, Ax-, Chl- und Car-Konzentration) zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 7, 10 dpi. Für die Experimente wurden acht Parameterkombinationen angewendet, welche den Angaben in Tabelle 2.1 zu entnehmen sind. Aus den Daten der Kultivierungsexperimente konnten wichtige Erkenntnisse abgeleitet werden, welche die Physiologie der Zellen beschreiben und in den folgenden Abschnitten dargestellt werden. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Befunde der folgenden Abschnitte erfolgte in Abb. 3.13.

3.2.1 Mikroskopische Analyse von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

Im zeitlichen Verlauf (1, 3, 7, 10 dpi) der Experimente ändert sich die morphologische Erscheinung der Zellen im Vergleich zu den unter nicht-induktiven Bedingungen kultivierten Kontrollansätzen (+N LL+C). Bei der Auswertung wurde die Zellform, Membranbeschaffenheit, Färbung sowie die Anwesenheit von Geißelstrukturen bewertet. Der morphologische Zustand der Kontrollansätze (+N LL+C) blieb über den Verlauf der Kultivierung aufrechterhalten (mobile Zellen).

Der morphologische Zustand jedes repräsentativen Zelltyps der Kultivierungsansätze ist in Abb. 3.1 dargestellt. Die mikroskopischen Analysen am ersten Tag der Kultivierung zeigten, dass mit Ausnahme der Kultivierungsbedingung +N LL-C alle Zellen der analysierten Proben Geißelstrukturen und eine Gallertschicht aufwiesen.

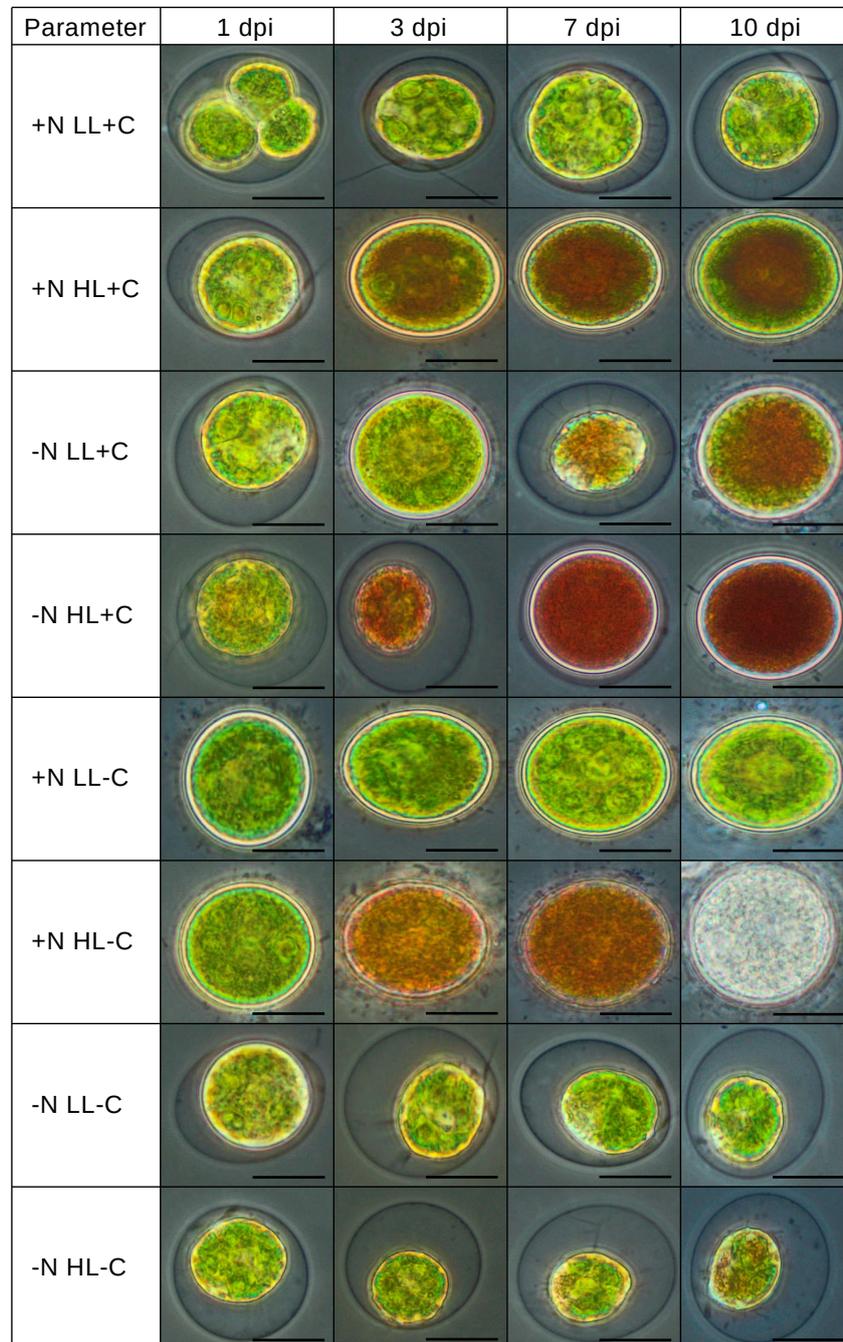


Abbildung 3.1: Mikroskopische Analyse von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi)

Morphologische Veränderungen wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) untersucht. Mikroskopische Analysen wurden bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Maßstabsbalken 20 µm.

Darüber hinaus wiesen die Zellen der Proben -N HL+C und +N HL+C ab dem dritten Tag der Kultivierung eine Rotfärbung auf. Ab dem dritten Tag wurde weiterhin eine zunehmende Differenzierung der morphologischen Zelleigenschaften beobachtet.

Die Kulturen -N LL-C, -N HL-C und -N HL+C wiesen analog zu den Kontrollansätzen (+N LL+C) einen Phänotyp im mobilen Stadium auf. Die Zellen der Kulturen -N LL+C, +N LL-C, +N HL-C sowie +N HL+C kennzeichneten sich hingegen durch eine stabilere Art der Zellwand sowie den Verlust der Gallertschicht und Geißelstrukturen. Insbesondere die Zellen der Kultivierungsbedingung +N HL-C wiesen morphologische Besonderheiten (degradierte Membranstrukturen bzw. Entfärbungen) auf, welche auf ein Absterben der Kulturen hindeuten könnten. Die Entwicklungsverläufe der Kulturen in Abhängigkeit des Behandlungsregimes am siebten bzw. zehnten Tag konnten die Beobachtungen zum überwiegenden Teil bestätigen. Zusammenfassend war es auf der Grundlage der Ergebnisse möglich, den Einfluss des Beleuchtungsregimes, der zusätzlichen CO₂-Begasung sowie der Nitratverfügbarkeit im Kulturmedium separat und untereinander kombiniert zu untersuchen. Im Allgemeinen wurde hierbei festgestellt, dass die zusätzliche Begasung der Zellen mit CO₂ einen positiven Einfluss auf die Vitalität und die Ax- bzw. Carotinoid-Bildung (resp. Rotfärbung) ausüben konnte. Auf Grundlage der Pigmentanalysen in Abschnitt 3.2.3 wurde nachgewiesen, dass die beobachtete Rotfärbung auf eine erhöhte Ax- bzw. Carotinoid-Biosynthese zurückgeführt werden konnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass der kombinatorische Einfluss von Nitratmangel und Lichtstress (HL) in Anwesenheit von CO₂ (vgl. Abb. 3.1 -N HL+C) einen stärkeren induktiven Effekt auf die morphologischen Veränderungen der Zellen bewirkte, als die separate Applikation genannter Stressparameter (vgl. Abb. 3.1 -N LL+C bzw. +N HL+C). Weitere wichtige Erkenntnisse konnten aus den Beobachtungen der Ansätze +N HL-C abgeleitet werden. Die Vitalität der Kulturen reduzierte sich über den Zeitraum des Experimentes, wodurch ein gesteigertes Maß an abgestorbenen Zellen resultierte. Um das Zellsterben eindeutig quantifizieren zu können, wurden tot-lebend-Zellfärbungen durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden exemplarisch dargestellt werden.

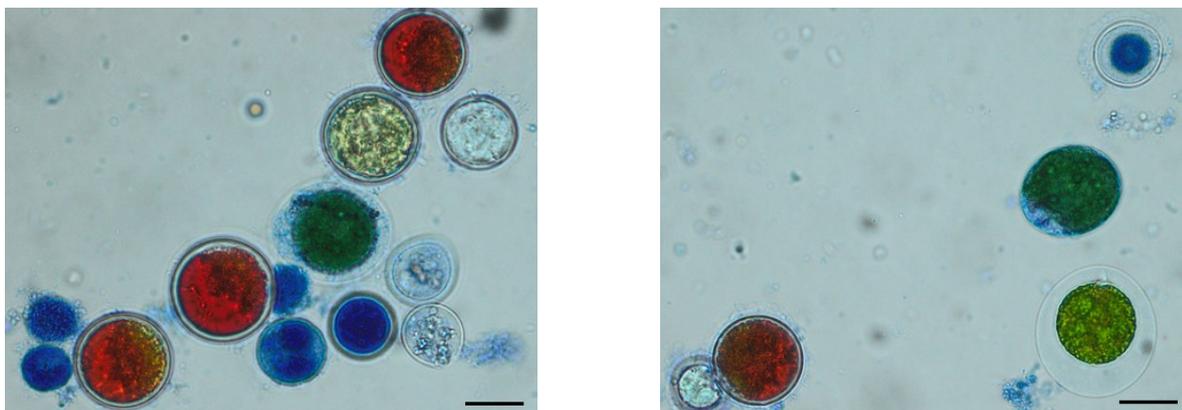


Abbildung 3.2: Mikroskopische Analyse von *H. pluvialis* zur Differenzierung toter und lebender Zellen

Hellfeldaufnahmen von *H. pluvialis*-Zellen in unterschiedlichen zellulären Zuständen, angefärbt mit Methylenblau zur Differenzierung lebender und toter Zellen. 100-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 20 µm.

Die Analysen zeigten, dass unter Verwendung der im Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Methodik eine Differenzierung toter und lebender Zellen von *H. pluvialis* gewährleistet werden konnte. In Abhängigkeit der Prozessparameter resultieren strukturelle Änderungen in den Membranstrukturen, welche mit einer Zunahme der Porosität einhergehen können und das Eindringen des verwendeten Farbstoffes bedingen. Die Etablierung der Methode ermöglichte eine Überprüfung der Zellvitalität. Die Ergebnisse wurden prozentual ausgewertet und für die Umrechnung der GTS in die BTS von Kulturen verwendet.

3.2.2 Wachstumsindikatoren von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

Die Bewertung mikrobiologischer Kultivierungsvorgänge erfolgte anhand repräsentativer Indikatoren (z.B. Zellkonzentration, GTS, BTS). Die Bestimmung der Zellkonzentration und des Verhältnisses toter und lebender Zellen von *H. pluvialis*-Kulturen erfolgte gemäß Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.2.2. Für die Auswertung der Experimente des Abschnitts 3.2.2 wurde eine vollständige Analyse statistisch signifikanter Unterschiede aller Proben gemäß Abschnitt 2.2.22.1 durchgeführt. Die Konfidenzintervalle (p -Werte) können Abschnitt 1.1.1 - 1.1.5 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden. Um eine vereinfachte Darstellung statistischer Unterschiede in folgenden Diagrammen zu gewährleisten, wurde auch eine einfaktorielle ANOVA (Tukey-HSD; $* p \leq 0,05$) durchgeführt. Die Proben der Behandlungen zum Zeitpunkt 0 dpi dienten als Bezugswerte. Die folgenden Diagramme verdeutlichen den Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsparameter auf die Veränderung repräsentativer Wachstumsindikatoren.

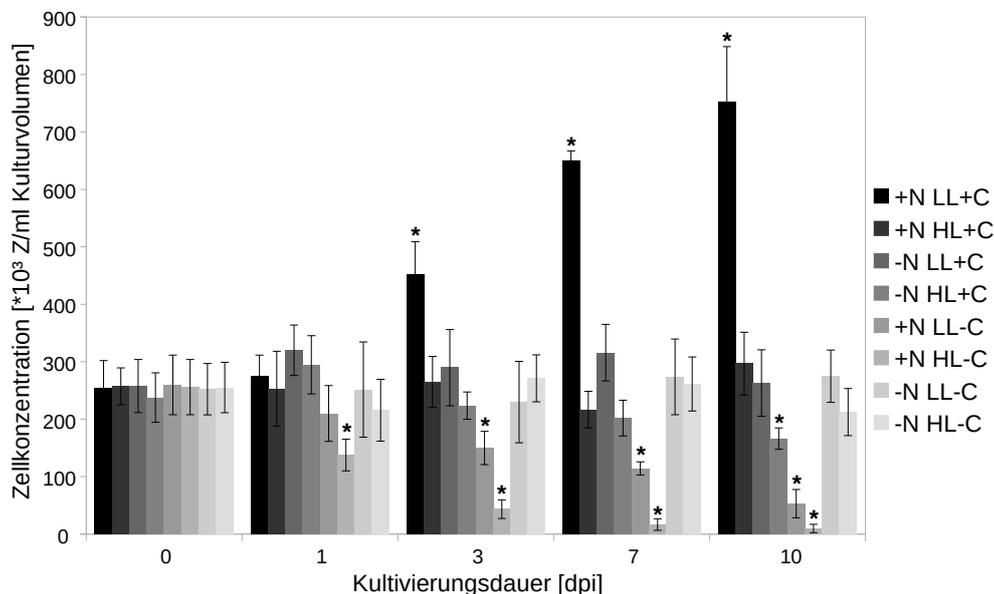


Abbildung 3.3: Zellkonzentration von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

Zellkonzentrationen wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus sechs BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; $* p \leq 0,05$), wobei die individuellen Proben zum Zeitpunkt 0 dpi als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 1.1.1 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Die Ergebnisse in Abb. 3.3 zeigten, dass in den Kulturen +N HL+C, -N LL+C, -N LL-C und -N HL-C im Verlauf der Experimente keine signifikante Veränderung der Zellkonzentration zu verzeichnen war (vgl. Abb. 3.3 +N HL+C, -N LL+C, -N LL-C, -N HL-C, Abschnitt 1.1.1 Teil B). Die Beobachtungen weisen darauf hin, dass ein Nitratmangel im Kulturmedium zu einer Stagnation der Zellkonzentration beitragen konnte. Die zusätzliche Applikation von Lichtstress (HL) führte in Kulturen, welche eine kontinuierliche CO₂-Begasung erhielten, zu einer signifikanten Reduktion der Zellkonzentration am zehnten Tag (vgl. Abb. 3.3 -N HL+C, Abschnitt 1.1.1 Teil B). In den Kontrollansätzen (+N LL+C) wurde ab dem dritten Tag ein signifikanter Anstieg der Zellkonzentration gegenüber den übrigen Kulturen nachgewiesen.

Weiterhin war zu erkennen, dass bei ausbleibender CO₂-Begasung ein signifikanter Rückgang der Zellkonzentration in jenen Proben beobachtet werden konnte, welche über Nitrat im Kulturmedium verfügten (vgl. Abb. 3.3 +N LL-C und +N HL-C, Abschnitt 1.1.1 Teil B). Vergleichbare Ergebnisse konnten bei der GTS-Analyse der Kulturen beobachtet werden (vgl. Abb. 3.4).

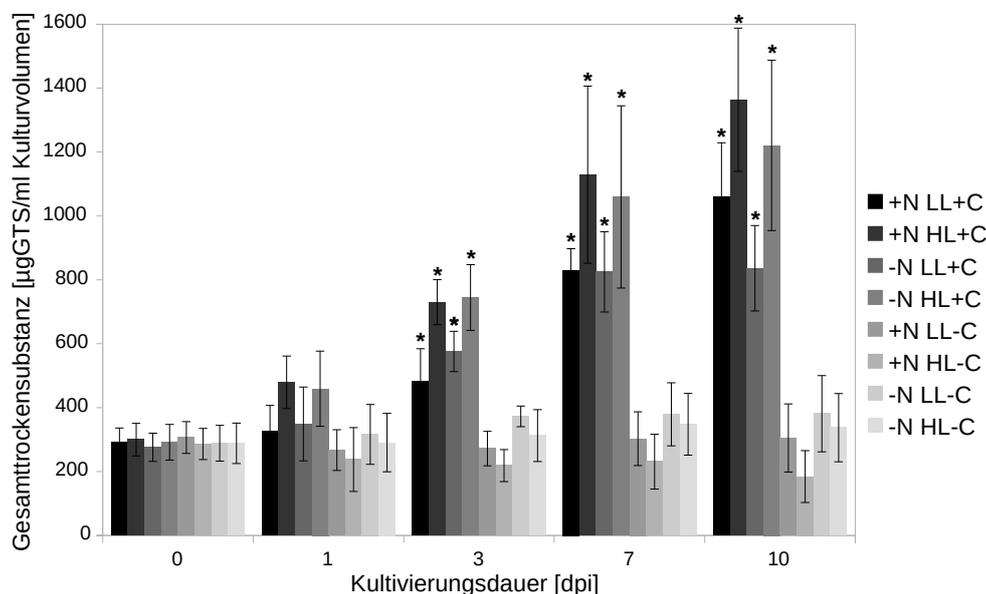


Abbildung 3.4: GTS von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

GTS wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus acht BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die individuellen Proben zum Zeitpunkt 0 dpi als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 1.1.2 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Bei der Analyse der GTS wurde eine signifikante Zunahme (in den Datenreihen von 0 - 7 dpi) in allen Proben beobachtet, welche in Abhängigkeit einer kontinuierlichen CO₂-Begasung kultiviert wurden (vgl. Abb. 3.4 Proben: „+C“). Der in Abb. 3.3 gezeigte Rückgang der Zellkonzentration in jenen Proben, welche ohne CO₂-Begasung in nitrathaltigem Medium kultiviert wurden, konnte im Rahmen der GTS-Analyse nicht bestätigt werden (vgl. Abb. 3.4 +N LL-C und +N HL-C, Abschnitt 1.1.2 Teil B). Um zu gewährleisten, dass die Bestimmung der Trockensubstanz auf vitale Zellen zurückgeführt werden kann, wurde das Verhältnis toter und lebender Zellen in Kulturen von *H. pluvialis* untersucht und in Abb. 3.5 dargestellt. Anhand des in Abb. 3.5 dargestellten Verhältnisses toter und lebender Zellen von *H. pluvialis*-Kulturen war zu erkennen, dass in allen Ansätzen, welche unter ständiger Begasung mit einem Gemisch aus Luft und CO₂ (1 % CO₂ (v/v)) kultiviert wurden, eine signifikant höhere Zellvitalität im Vergleich zu den mit Luft begasten (0,03 % CO₂ (v/v)) Kulturen resultierte. Die Ergebnisse wiesen am ersten Tag auf einen signifikanten Anstieg toter Zellen in weiteren Kulturen hin (vgl. Abb. 3.5 +N LL-C und +N HL-C, Abschnitt 1.1.3 Teil B). Kulturen, welche in Abhängigkeit eines induktiven Parameters (Nitratmangel im Kulturmedium oder Lichtstress (HL)) bei kontinuierlicher CO₂-Begasung kultiviert wurden, zeigten keine signifikanten Veränderungen des tot-lebend-Verhältnisses in gesamten Verlauf der Experimentalreihe.

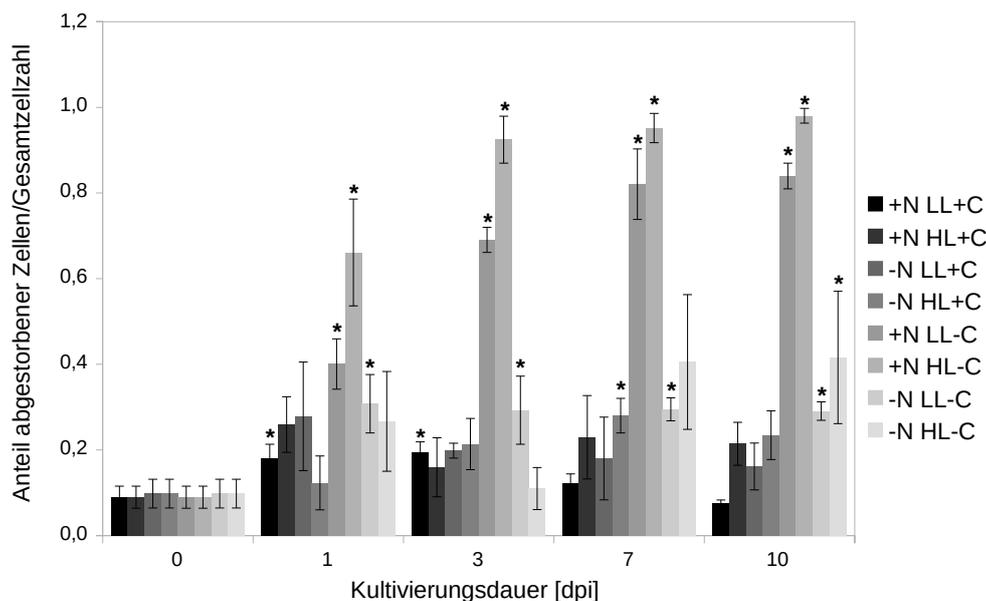


Abbildung 3.5: Verhältnis toter und lebender Zellen von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

Tot-lebend-Verhältnisse wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellem ANOVA (Tukey-HSD; * p ≤ 0,05), wobei die individuellen Proben zum Zeitpunkt 0 dpi als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 1.1.3 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Im Gegensatz hierzu war es in der Kontrollkultur möglich, eine signifikante Reduktion des Anteils an abgestorbenen Zellen zu beobachten (vgl. Abb. 3.5 +N LL+C 10 dpi, Abschnitt 1.1.3 Teil B), während in den unter induktiven Bedingungen kultivierten Proben eine signifikante Zunahme zu verzeichnen war (vgl. Abb. 3.5 -N HL+C 7 dpi). In den Ansätzen, welche keine zusätzliche CO₂-Begasung erhielten, war neben der signifikanten Zunahme des Anteils der abgestorbenen Zellen ein signifikanter Anstieg des pH-Wertes im Kulturmedium zu beobachten (vgl. Abb. 3.6, Abschnitt 1.1.4 Teil B). Die Analyse der pH-Werte zeigte, dass in den Kulturen ohne CO₂-Begasung am ersten Tag ein signifikanter Anstieg von pH 7 auf pH 9 - 10 resultierte. Die pH-Werte wiesen zum Teil signifikante Schwankungen auf, blieben jedoch bis zum Abbruch der Experimente auf einem vergleichbar hohem Niveau erhalten. Im Gegensatz zu den konsistenten Beobachtungen des pH-Wert-Verlaufes war es in Bezug auf die tot-lebend-Verhältnisse möglich, eine Differenzierung der Kulturen ohne CO₂-Begasung („-C“) zu erkennen. Im Zeitraum von 1 - 10 dpi (vgl. Abb. 3.5) konnte gezeigt werden, dass Kulturen ohne Nitrat im Kulturmedium einen signifikant höheren Anteil vitaler Zellen, verglichen mit Kulturen, die mit Nitrat wuchsen, aufwiesen (vgl. Abb. 3.5 -N LL/HL-C mit +N LL/HL-C, Abschnitt 1.1.3, 1.1.4 Teil B). Im Gegensatz zu den beschriebenen Sachverhalten der Kulturen +N LL/HL-C wurde die Zellvitalität in den Kulturen -N LL/HL-C nicht durch den signifikant erhöhten pH-Wert reduziert. Neben dem Einfluss des Parameters der CO₂-Begasung konnte festgestellt werden, dass die Vitalität der Zellen ebenfalls durch die Beleuchtung der Kulturen beeinflusst wurde. In Abhängigkeit von Lichtstress (HL) wurde eine signifikant höhere Sterberate von Kulturen nachgewiesen (vgl. Abb. 3.5 +N LL-C mit +N HL-C an 3 dpi). Der prozentuale Anteil toter Zellen wurde zur kalkulatorischen Differenzierung der GTS und der vitalen BTS der Kulturen verwendet.

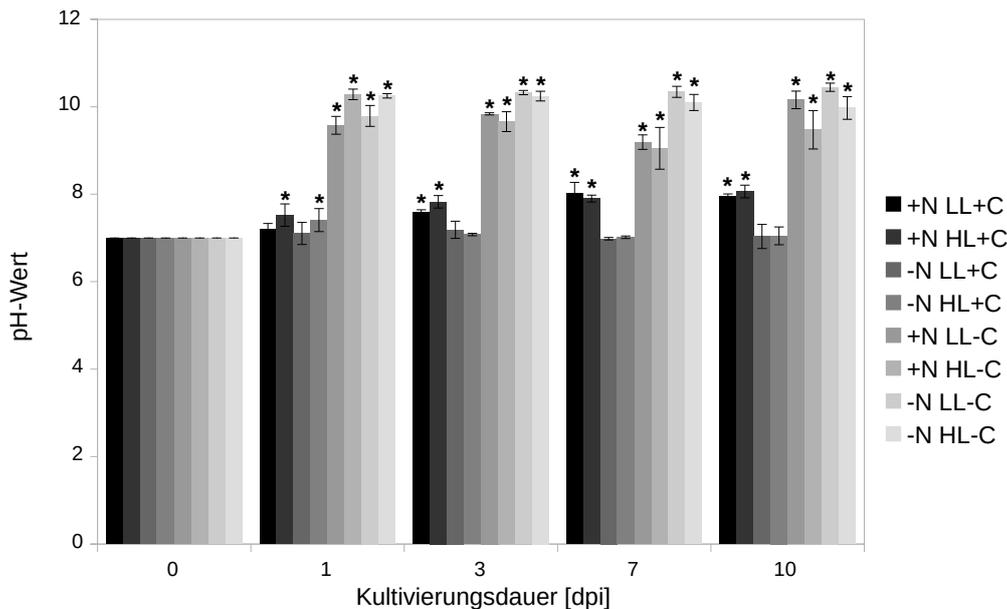


Abbildung 3.6: pH-Wert im Kulturmedium von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

pH-Werte wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * p ≤ 0,05), wobei die individuellen Proben zum Zeitpunkt 0 dpi als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 1.1.4 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Die Veränderungen der BTS im zeitlichen Verlauf der Experimente sind den Ergebnissen in Abb. 3.7 zu entnehmen. Analog zu den Ergebnissen der GTS von *H. pluvialis* war zu erkennen, dass die BTS eine signifikante Abhängigkeit zum Kultivierungsparameter der CO₂-Begasung aufzeigte.

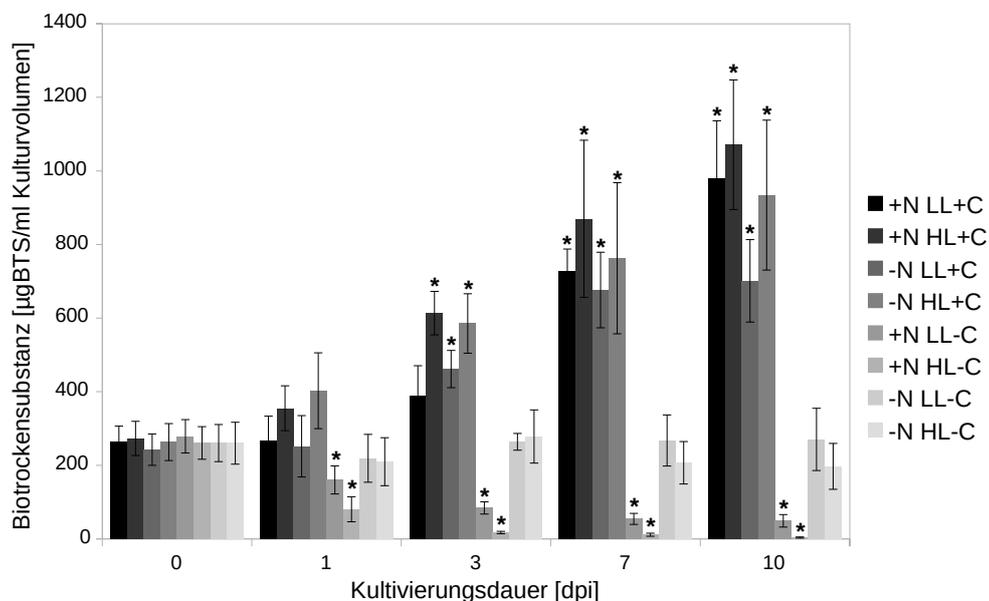


Abbildung 3.7: BTS von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

BTS wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus acht BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * p ≤ 0,05), wobei die individuellen Proben zum Zeitpunkt 0 dpi als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 1.1.5 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Hierbei war zusätzlich hervorzuheben, dass die Zunahme der BTS nur im Fall der unter nicht-induktiven Bedingungen kultivierten Kontrollansätze mit der Zellkonzentration korrelierte (vgl. Abb. 3.3 und 3.7). In den Proben, welche bei kontinuierlicher CO₂-Begasung in Abhängigkeit eines Stressfaktors kultiviert wurden (Nitratmangel bzw. Lichtstress (HL)), wurde eine signifikante Zunahme der BTS unabhängig vom Anstieg der Zellkonzentration nachgewiesen (vgl. Abb. 3.7 +N HL+C, -N LL+C und -N HL+C, Abschnitt 1.1.5 Teil B). Die BTS der Kulturen +N LL/HL-C korrelierte direkt mit dem in Abb. 3.3 gezeigten Rückgang der Zellkonzentrationen und stand somit im Widerspruch zu den Ergebnissen der GTS-Analysen. Zusammenfassend weisen die gewonnenen Erkenntnisse auf zelluläre Regulationsmechanismen hin, welche zum Teil in direkter Abhängigkeit zum pH-Wert in den Kultivierungsreaktoren stehen und durch die unterschiedlichen Begasungsstrategien bedingt werden. Darüber hinaus zeigten sich pH-Wert-unabhängige Effekte, welche auf die Nitratverfügbarkeit im Kulturmedium und die applizierten Beleuchtungsstrategien zurückgeführt werden konnten. Nachfolgend wurde der Einfluss der Kultivierungsparameter auf die relativen Pigmentverhältnisse von *H. pluvialis* in Abhängigkeit der Zeit untersucht. Die Normierung der Pigmentkonzentrationen auf die rechnerisch ermittelte BTS würde in den Kulturen mit einem hohen Anteil an abgestorbener Biomasse (+N LL/HL-C) unrealistische Dimensionen der Parameter bedingen. Für folgende Analysen musste demnach eine Differenzierung der Daten in Bezug auf die Normierungsgrundlage vorgenommen werden.

3.2.3 Ax-, Chl- und Car-Konzentrationen von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

Im folgenden Abschnitt werden die relativen Pigmentkonzentrationen zunächst bezogen auf die GTS dargestellt. Eine vollständige Auswertung statistisch signifikanter Unterschiede der Experimentaldaten in Abschnitt 3.2.3 erfolgte anhand der Angaben in Abschnitt 2.2.22.1. Die Konfidenzintervalle (p-Werte) der Analysen können Abschnitt 1.2.1 - 1.2.8 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden. Um eine vereinfachte Darstellung der statistischen Unterschiede in den folgenden Abbildungen zu gewährleisten, wurde auch eine einfaktorielle ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$) durchgeführt. Hierbei wurden die Proben zum Zeitpunkt 10 dpi verglichen und in verschiedene Konfidenzkategorien eingeteilt.

Die Ergebnisse der Chl-Analysen (Abb. 3.8) zeigten eine signifikante Reduktion der zur GTS relativierten Chl-Konzentration in allen Kulturen. Diese konnte einerseits auf eine Reduktion der absoluten Chl-Konzentrationen und andererseits auf eine Zunahme der GTS der Kulturen zurückgeführt werden. Die Abnahme der relativen Chl-Konzentrationen in den Kontrollansätzen hielt bis zum dritten Tag an und zeigte anschließend keine weiteren signifikanten Veränderungen (vgl. Abb. 3.8 +N LL+C, Abschnitt 1.2.1 Teil B). Eine ähnliche Tendenz konnte ab dem siebten Tag in den Kulturen -N LL-C und -N HL-C beobachtet werden (vgl. Abb. 3.8 -N LL/HL-C). Die unter induktiven Bedingungen kultivierten Ansätze (-N HL+C) zeigten, analog zu den Proben mit dem höchsten Anteil an abgestorbenen Zellen (+N HL-C), einen signifikanten Rückgang der relativen Chl-Konzentrationen bis zum siebten Tag der Kultivierung (vgl. Abb. 3.8 -N HL+C, +N HL-C). Die separate Applikation induktiver Kultivierungsparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Lichtstress (HL)) bei vorhandener CO₂-Begasung bedingte ab dem dritten Tag eine signifikante Reduktion der Chl-Konzentrationen verglichen zur Kontrolle (+N LL+C).

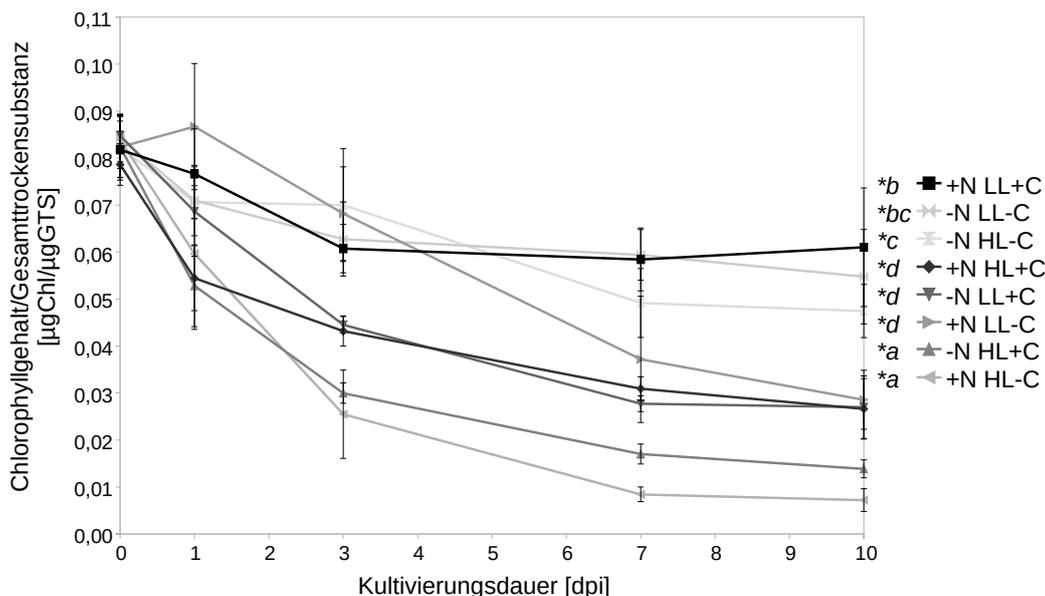


Abbildung 3.8: Relativer Chl-Gehalt bezogen auf GTS von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

Relative Chl-Gehalte wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus sieben BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * p ≤ 0,05), wobei die individuellen Proben zum Zeitpunkt 10 dpi verglichen und in Konfidenzkategorien (*a - *d) eingeteilt wurden. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede aller dargestellter Proben kann Abschnitt 1.2.1 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Weiterhin zeigte sich, dass die Reduktion signifikant geringer als in den Proben -N HL+C ausgeprägt war (Abb. 3.8 -N LL+C, +N HL+C mit -N HL+C an 3, 10 dpi, Abschnitt 1.2.1 Teil B). Die Analyse relativer Car- und Ax-Konzentrationen erfolgte anhand der in Abb. 3.9 und 3.10 dargestellten Ergebnisse.

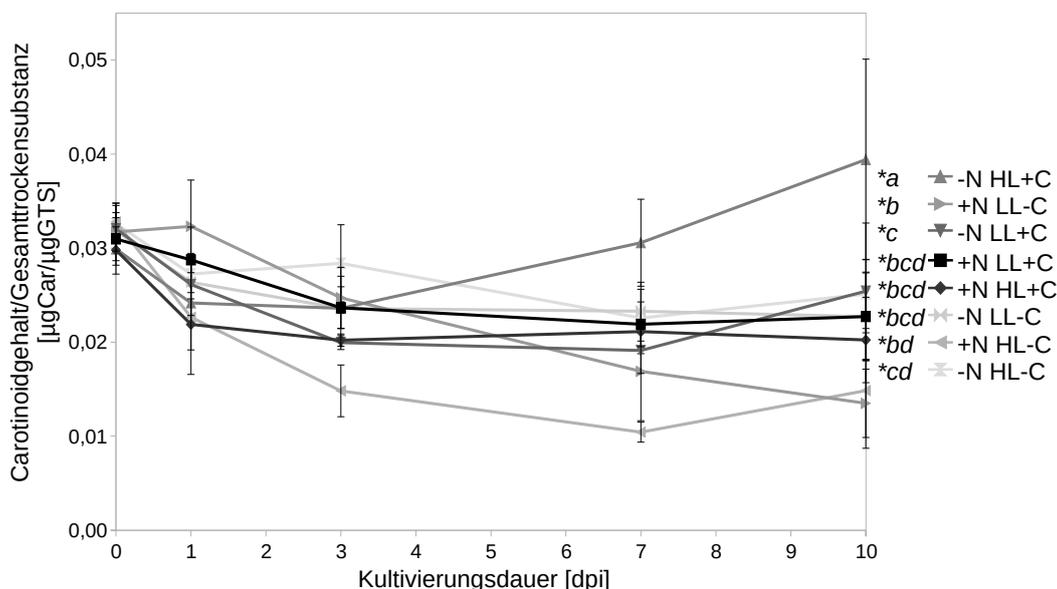


Abbildung 3.9: Relativer Car-Gehalt bezogen auf GTS von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

Relative Car-Gehalte wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus sieben BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * p ≤ 0,05), wobei die individuellen Proben zum Zeitpunkt 10 dpi verglichen und in Konfidenzkategorien (*a - *d) eingeteilt wurden. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede aller dargestellter Proben kann Abschnitt 1.2.2 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Die Analysen der unter induktiven Bedingungen kultivierten Ansätze (-N HL+C) wiesen ab dem ersten (Ax) bzw. siebten Tag (Car) auf eine signifikante Zunahme der Pigmente im Vergleich zur Kontrolle (+N LL+C) hin (vgl. Abb. 3.9 und 3.10, Abschnitt 1.2.2, 1.2.3 Teil B). Hierbei wurde gezeigt, dass die Ax-Konzentrationen der Kulturen ab dem ersten Tag signifikant anstiegen, während die relative Menge der Car zunächst verringert wurde. Die Abnahme des relativen Car-Gehaltes konnte bis zum dritten Tag ebenfalls in allen weiteren Proben nachgewiesen werden und wies, im Gegensatz zu den Beobachtungen der Kulturen -N HL+C, signifikante Unterschiede auf (vgl. Abschnitt 1.2.2, 1.2.3 Teil B). Nachfolgende Analysen zeigten, dass in den übrigen Ansätzen kein weiterer Rückgang des relativen Car-Gehaltes zu verzeichnen war (vgl. Abb. 3.9, Abschnitt 1.2.2 Teil B, Ausnahme: +N LL-C und -N HL-C). Diese Beobachtungen konnten im Fall aller Proben, welche in Abhängigkeit einer kontinuierlichen CO₂-Begasung kultiviert wurden („+C“), auf eine gleichmäßige Zunahme der GTS sowie der absoluten Car-Konzentrationen zurückgeführt werden. Weiterhin war es möglich, einen signifikanten Anstieg des relativen Ax- bzw. Car-Gehaltes ab dem ersten bzw. siebten Tag in den Proben -N LL+C nachzuweisen. Eine signifikante Zunahme des relativen Ax-Gehaltes konnte ebenfalls in den Proben +N HL+C gezeigt werden (vgl. Abb. 3.9 und 3.10 -N LL+C, +N HL+C an 1, 7 dpi, Abschnitt 1.2.2, 1.2.3 Teil B).

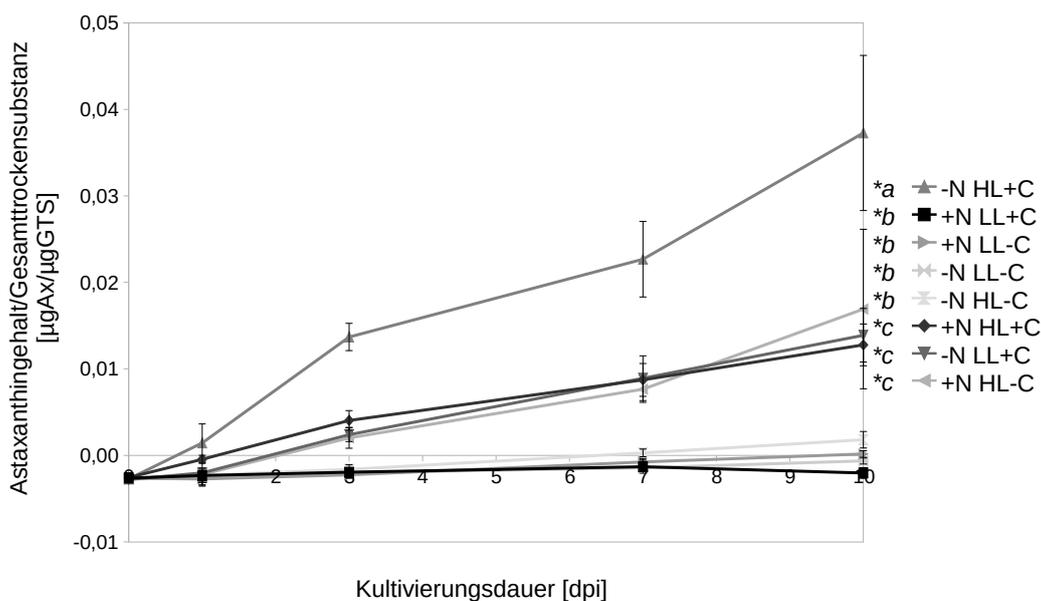


Abbildung 3.10: Relativer Ax-Gehalt bezogen auf GTS von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

Relative Ax-Gehalte wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus sieben BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellem ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die individuellen Proben zum Zeitpunkt 10 dpi verglichen und in Konfidenzkategorien (*a - *c) eingeteilt wurden. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede aller dargestellter Proben kann Abschnitt 1.2.3 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

In den Ansätzen +N LL-C, +N HL-C zeichnete sich im Verlauf der Kultivierung eine mitunter signifikante Abnahme des relativen Car-Gehaltes ab, welche bereits bezüglich des relativen Chl-Gehaltes sowie der Zellkonzentrationen und BTS beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 3.9 und 3.10 +N LL-C, +N HL-C, Abschnitt 1.2.2, 1.2.3 Teil B). Aufgrund der konstanten GTS in den Ansätzen konnte die direkte Abnahme der absoluten Chl- und Car-Konzentrationen der Proben nachgewiesen werden. Weiterführend wurde das Chl- zu Car-Verhältnis anhand der in Abb. 3.11 dargestellten Ergebnisse analysiert.

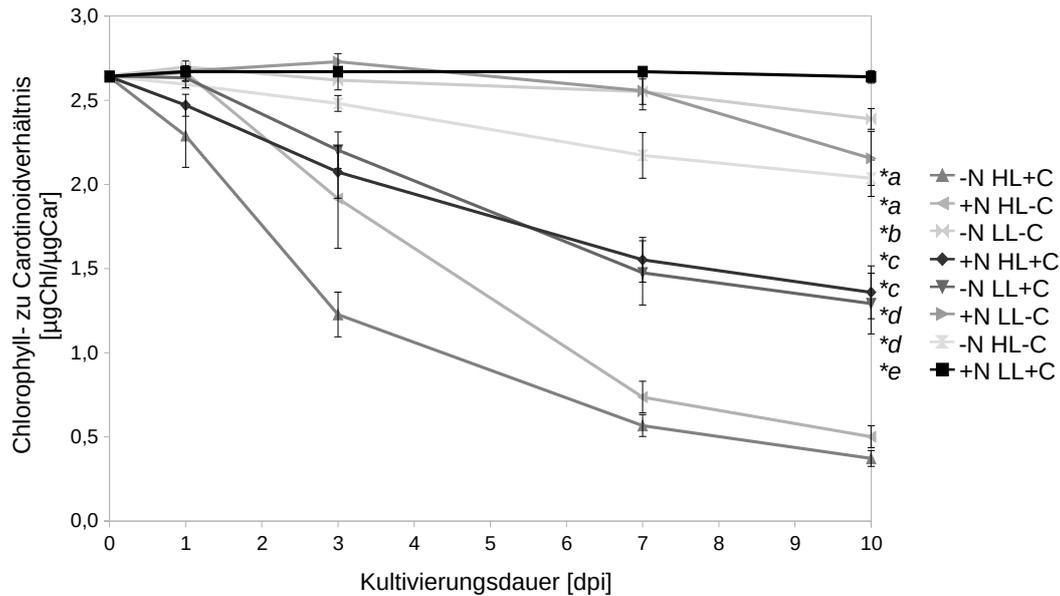


Abbildung 3.11: Chl- zu Car-Verhältnis von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

Chl- zu Car-Verhältnisse wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus sieben BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * p ≤ 0,05), wobei die individuellen Proben zum Zeitpunkt 10 dpi verglichen und in Konfidenzkategorien (*a - *d) eingeteilt wurden. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede aller dargestellter Proben kann Abschnitt 1.2.4 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Die applizierten Kultivierungsparameter ermöglichten die Einteilung der Zellen in drei Gruppen, welche sich bezüglich des Chl- zu Car-Verhältnisses voneinander unterschieden. Es zeichnete sich ab, dass die Kulturen -N HL+C die größten Mengen an Car verglichen zum Chl bildeten (vgl. Abb. 3.11 -N HL+C). Am zehnten Tag konnte im Vergleich zu den Kontrollansätzen (+N LL+C) eine signifikante Reduktion des Chl- zu Car-Verhältnisses um ca. 80 % beobachtet werden. Die Kultivierung in Abhängigkeit der induktiven Parameter des Nitratmangels (-N LL+C) bzw. des Lichtstresses (+N HL+C) zeigte, dass jene Kulturen ein ähnliches Verhalten bezüglich der Pigmentkonzentrationen aufwiesen. Die Veränderungen wiesen im Vergleich zu den unter induktiven sowie unter nicht-induktiven Bedingungen kultivierten Kontrollansätzen (+N LL+C und -N HL+C) signifikante Unterschiede auf. Am zehnten Tag wurde ein signifikant vermindertes Chl- zu Car-Verhältnis im Vergleich zu den Ansätzen +N LL+C (ca. 50 %) beobachtet, wohingegen im Vergleich zu den Ansätzen -N HL+C ein um ca. 60 % erhöhtes Pigmentverhältnis nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 3.11 +N LL+C und -N HL+C mit -N LL+C und +N HL+C an 10 dpi). In den Kontrollansätzen (+N LL+C) wurden vergleichbare Mengen von Chl und den Car im Verlauf der Experimente gebildet (keine signifikanten Veränderungen). Die Analysen des Chl- zu Car-Verhältnisses der Ansätze -N LL-C, -N HL-C und +N LL-C zeigten bis zum dritten Tag keine signifikanten Unterschiede verglichen zu den Kontrollreaktionen (+N LL+C). Ab dem siebten Tag wurde eine signifikante Reduktion des analysierten Verhältnisses beobachtet, welche auf einen Rückgang der Chl-Konzentrationen zurückgeführt werden konnte (vgl. Abb. 3.8, vgl. Abschnitt 1.2.1 Teil B). Zur Differenzierung der Car war es notwendig, die Ax- und Car-Konzentrationen gegenüberzustellen. Anhand der Analysen konnte gezeigt werden, dass die gebildeten Carotinoide nur für die Kulturen +N HL+C, -N HL+C, -N LL+C und +N HL-C auf die Synthese von Ax zurückgeführt werden konnten.

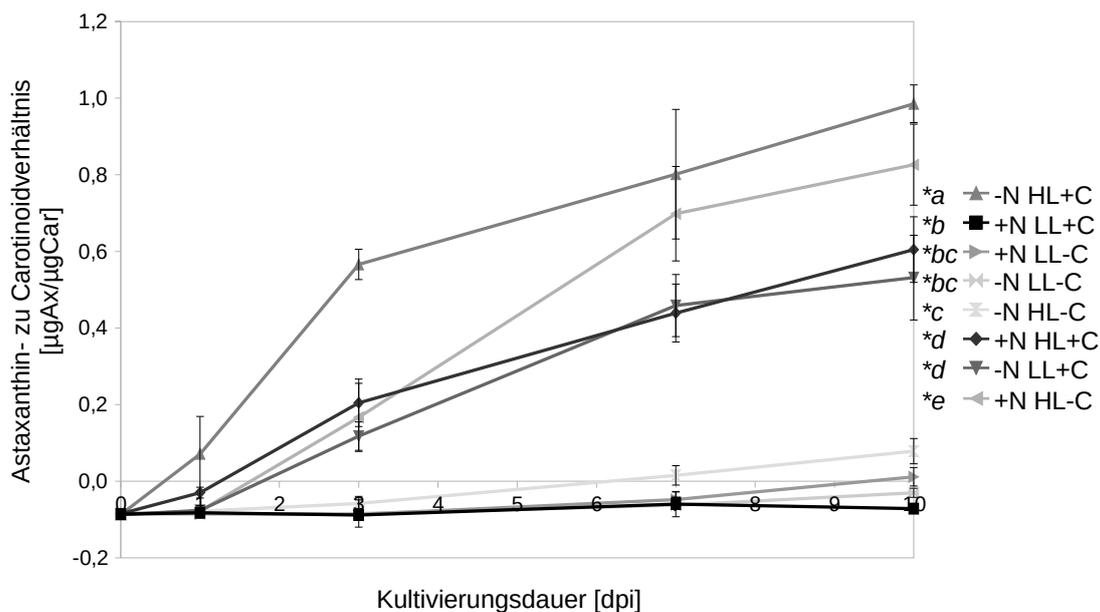


Abbildung 3.12: Ax- zu Car-Verhältnis von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

Ax- zu Car-Verhältnisse wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus sieben BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * p ≤ 0,05), wobei die individuellen Proben zum Zeitpunkt 10 dpi verglichen und in Konfidenzkategorien (*a - *e) eingeteilt wurden. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede aller dargestellter Proben kann Abschnitt 1.2.5 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Im Gegensatz zu den Analysen des Car-Gehaltes wurde bezüglich des relativen Ax-Gehaltes ein signifikanter Konzentrationsanstieg in den beschriebenen Ansätzen im Verlauf der Kultivierung beobachtet (vgl. Abschnitt 1.2.3 Teil B). Die separate Applikation induktiver Parameter (Nitratmangel im Kulturmedium bzw. Lichtstress (HL) bei CO₂-Begasung) bedingte Veränderungen in den Zellen, welche jenen der Kulturen -N HL+C ähnelten, diese jedoch nicht im vollen Umfang abbildeten (vgl. Abb. 3.10 und 3.11 -N LL+C und +N HL+C mit -N HL+C). Die Beobachtungen wurden anhand der Ergebnisse des Ax- zu Car-Verhältnisses in Abb. 3.12 bestätigt. Die Analyse der Pigmentverhältnisse in den Kulturen +N HL+C und +N HL-C verwies auf einen signifikanten Anstieg des prozentualen Ax-Anteils in Bezug zum Car-Gehalt auf ca. 50 - 70 % (vgl. Abb. 3.12 +N HL+C bzw. +N HL-C). Die Beobachtungen standen im Zusammenhang mit den Ergebnissen des relativen Car-Gehaltes. Diese zeigten, dass die Zellen keine gesteigerte Produktivität der Car in Bezug zur GTS aufgewiesen haben (vgl. Abb. 3.9 +N HL+C und +N HL-C). Für die Kulturen +N HL+C war diese Beobachtung auf eine gleichmäßige Zunahme der absoluten Konzentration der GTS (vgl. Abb. 3.4 +N HL+C) und der Car zurückzuführen. Vergleichbare Ergebnisse konnten in den Zellen beobachtet werden, welche in Abhängigkeit des induktiven Parameters des Nitratmangels (-N LL+C) kultiviert wurden. Die Zellen der Kulturen zeigten beginnend ab dem dritten Tag einen signifikanten Anstieg der relativen Ax-Konzentrationen, während der relative Car-Gehalt keine signifikante Zunahme aufwies. Diese Beobachtungen wurden durch den in Abb. 3.12 dargestellten signifikanten Anstieg des Ax- zu Car-Verhältnisses ab dem dritten Tag bestätigt (vgl. Abschnitt 1.2.5 Teil B). Die kombinierte Applikation der Stressfaktoren (Nitratmangel und Lichtstress (HL)) bedingte eine Maximierung der zellulären Anpassungsreaktionen und resultierte in einer nahezu vollständigen Umwandlung der Carotinoide in Ax (vgl. Abb. 3.12 -N HL+C).

Die Analysen zuvor beschriebener Parameter erfolgten im relativen Bezug zur GTS. Vergleichende Analysen der Pigmentgehalte bezogen auf BTS wurden zusammenfassend in Abb. 3.13 dargestellt. Die Ergebnisse glichen jenen der zuvor beschriebenen Erkenntnisse, wiesen jedoch bezüglich der Kulturen mit einem hohen Anteil an abgestorbenen Zellen (+N LL-C und +N HL-C) erhebliche Unterschiede auf. Die Analyse der Pigmentgehalte in Abhängigkeit der BTS genannter Kulturen führte zu einer Verschiebung der analytischen Messwertbereiche und wurde nicht weiterführend ausgewertet. Die Übersicht verdeutlicht den Einfluss der Kultivierungsparameter auf physiologische Veränderungen der Kulturen von *H. pluvialis* und ermöglichte die Abgrenzung von zwei Gruppen. Die Kulturen der Behandlungsregimes -N LL-C und -N HL-C glichen bezüglich der relativen Pigmentgehalte den Kontrollansätzen (+N LL+C). Die Analysen der BTS und Zellkonzentrationen wiesen hingegen auf signifikante Unterschiede verglichen zur Kontrolle hin (vgl. Abschnitt 1.1.1, 1.1.2, 1.1.5 Teil B).

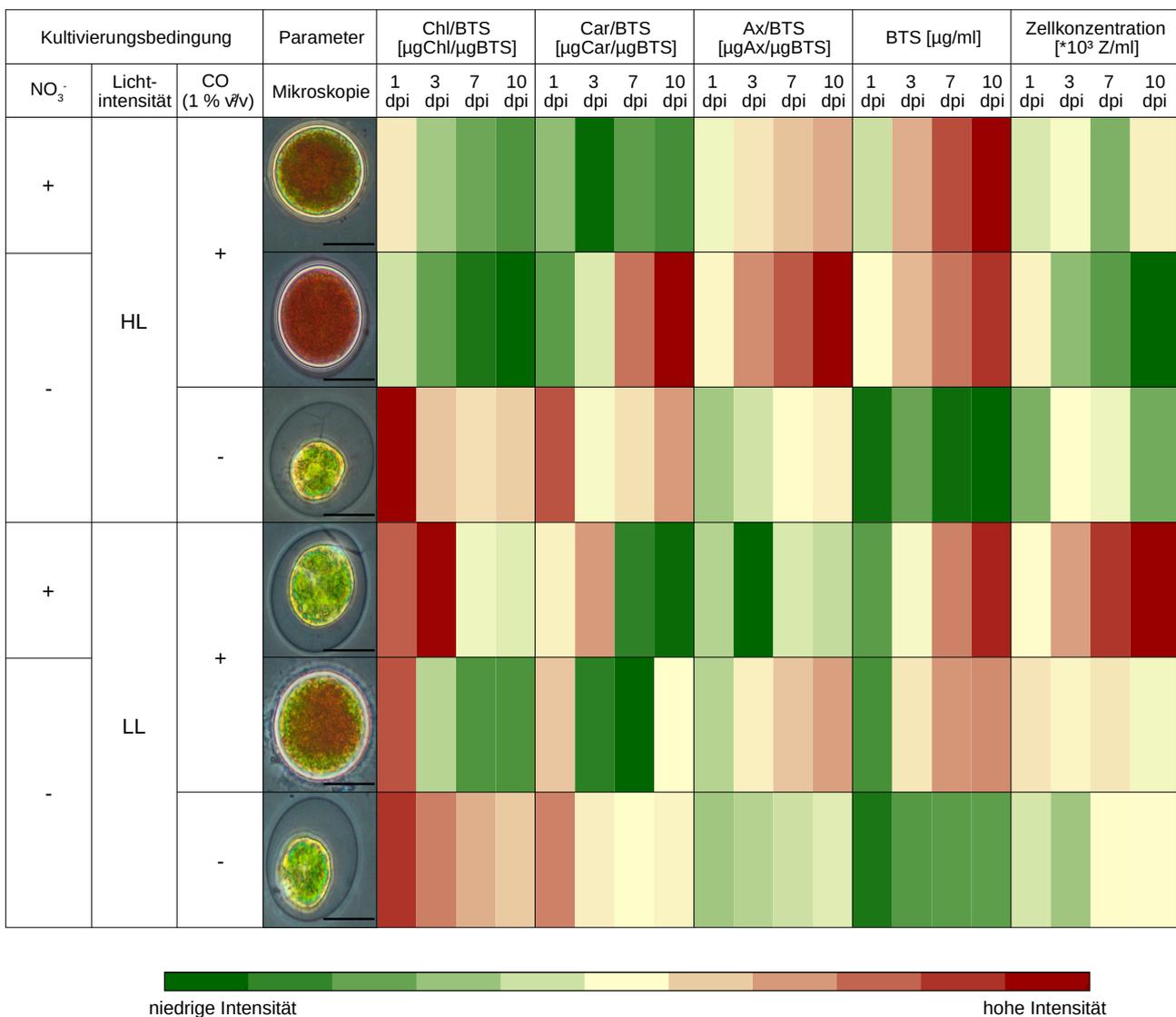


Abbildung 3.13: Wachstumsindikatoren und Pigmentkonzentrationen von *H. pluvialis* bezogen auf BTS im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

Entwicklungsverlauf der Analysegrößen in Abhängigkeit verschiedener Kultivierungsparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (1 - 10 dpi). Maßstabsbalken 20 µm. Daten resultieren aus den Messungen von 3 - 7 BR in Bezug auf die jeweiligen Parameter und werden anhand von Mittelwerten dargestellt. Die Farbverläufe repräsentieren die Dimensionen der Parameter einer Datenreihe gemäß der Skala.

Die Kulturen +N HL+C und -N LL+C kennzeichneten sich durch eine Stagnation der Zellkonzentration bei einer signifikanten Zunahme der BTS. Die signifikante BTS-Zunahme konnte ebenfalls in den Proben -N HL+C nachgewiesen werden, wobei zusätzlich eine signifikante Reduktion der Zellkonzentration am zehnten Tag der Kultivierung gezeigt wurde. Die Analysen der Pigmentgehalte wiesen auf eine signifikante Zunahme der relativen Ax-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (+N LL+C) hin (vgl. Abb. 3.10). Der Konzentrationsanstieg des Keto-Carotinoids spiegelte sich ebenfalls in einem signifikanten Anstieg des Ax- zu Car-Verhältnisses wider, während eine signifikante Reduktion des Chl- zu Car-Verhältnisses resultierte (vgl. Abb. 3.11, 3.12). Die Reduktion des relativen Chl- und die Erhöhung des relativen Ax-Gehaltes konnte in den Kulturen +N HL+C und -N LL+C in einem identischen Verhältnis nachgewiesen werden. In Bezug auf die Pigmentgehalte (Chl/BTS und Ax/BTS) zeichnete sich ab, dass die separate Applikation induktiver Kultivierungsparameter, verglichen zu den unter induktiven Bedingungen kultivierten Proben (-N HL+C), Veränderungen um ca. 50 % bedingte (vgl. Abb. 3.13 +N HL+C, -N LL+C mit -N HL+C).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Applikation der induktiven Kultivierungsparameter des Nitratmangels im Kulturmedium sowie die Applikation von Lichtstress (HL) nicht in jedem Fall eine Ax-Produktion in Kulturen von *H. pluvialis* bedingte. Es zeichnete sich ab, dass die Induktion der Ax-Bildung ebenfalls durch die CO₂-Verfügbarkeit beeinflusst wurde. Kulturen, welche bei kontinuierlicher CO₂-Begasung in Abhängigkeit von mind. einem induktiven Parameter kultiviert wurden, wiesen eine signifikante Zunahme der Ax-Konzentration im Verlauf der Kultivierung auf (vgl. Abb. 3.10 -N LL+C, -N HL+C und +N HL+C). In den Kulturen, welche bei anhaltendem Nitratmangel ohne zusätzliche CO₂-Begasung kultiviert wurden, konnte unabhängig von der applizierten Beleuchtungsstrategie keine Biosynthese von Ax nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.10 -N LL/HL-C). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Induktion der Ax-Biosynthese durch verschiedene Stressfaktoren ausgelöst wird. Die Stressfaktoren wirken teilweise additiv und konnten die Ax-Akkumulation verstärken oder aber auch inhibieren. Die Experimente verdeutlichen den Einfluss der Kultivierungsparameter auf ausgewählte Wachstumsindikatoren und vor allem die Pigmentkonzentrationen von *H. pluvialis*-Kulturen, welche weiterführend auf physiologischer, molekularer und proteinbiochemischer Ebene charakterisiert wurden.

3.3 Photosynthetische Aktivitätsparameter von *H. pluvialis*

Die Bestimmung photosynthetischer Aktivitätsparameter kann als weitere Methode zur Charakterisierung des physiologischen Zellstatus photoautotropher Organismen herangezogen werden. Aufgrund der definierten Ausrichtung des wissenschaftlichen Fokus auf landwirtschaftlich nutzbare Feldpflanzen und Modellorganismen, sind die meisten kommerziell erhältlichen Analysegeräte auf die Untersuchung solcher Pflanzen angepasst. Die Anwendung der verfügbaren Geräte auf aquatische Mikroorganismen wie *H. pluvialis* musste daher zunächst etabliert werden. Es wurden zwei Systeme getestet, welche sich durch die verwendete Art des Anregungs- bzw. Messlichtes, der Analysefläche und der Sensibilität unterschieden. Das Gerät Imaging-PAM Fluorometer (Walz) verfügt über ein blaues Messlicht (470 nm), während das Analysesystem FluorCam (Photon System Instruments) ein rotes Messlicht besitzt (617 nm), welche der Anregung der Photosysteme während der Chlorophyllfluoreszenzmessung dienen.

Vorversuche zeigten, dass die Sensitivität des Imaging-PAM Fluorometers nicht ausreichte, um die Chlorophyllfluoreszenz der Zellen in Flüssigkulturen zu bestimmen. Nachfolgend wurde eine Immobilisierung der Zellen auf Filtermembranen vorgenommen. Eine initiale Experimentalreihe diente dem Vergleich beider Analysesysteme, wobei keine statistische Auswertung der Daten erfolgen konnte ($n = 1$). Für den Vergleich der photosynthetischen Aktivität von Zellen wird in der Literatur auf die Verwendung des F_v/F_m -Wertes verwiesen [Murchie und Lawson, 2013]. Der Wert gibt die maximale Effizienz der photochemischen Signalverarbeitung dunkeladaptierter Photosysteme an. Der Vergleich des F_v/F_m -Wertes der unter induktiven Bedingungen kultivierten Proben am zehnten Tag zeigte, dass unter Verwendung des Imaging-PAM Fluorometers eine statistisch nicht abgesicherte Reduktion des Parameters um ca. 30 % im Vergleich zur Analyse mit der FluorCam ermittelt werden konnte (vgl. Abb. 7.2 a) und b) an 10 dpi). Die Diskrepanz könnte auf das Messlicht in den Analysesystemen zurückgeführt werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Sensitivität und Messtechnik der FluorCam für die Chlorophyllfluoreszenzmessung in Flüssigkulturen geeignet war. Folgende Experimente zur Bestimmung photosynthetischer Aktivitätsparameter erfolgten daher mit der FluorCam.

3.3.1 Photochemische Quantenausbeute nativer Flüssigkulturen von *H. pluvialis*

Die Analyse der photochemischen Quantenausbeute von *H. pluvialis* erfolgte bei definierten Lichtintensitäten (0, 1, 3, 35, 86, 171, 403 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$), sodass die Effizienz der photochemischen Signalverarbeitung dunkel- bzw. lichtadaptierter Photosysteme in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsparameter abgeleitet werden konnte. Für die Auswertung der Experimente des Abschnitts 3.3.1 wurde eine vollständige Analyse statistisch signifikanter Unterschiede aller Proben gemäß Abschnitt 2.2.22.1 durchgeführt. Die Konfidenzintervalle (p -Werte) der Analysen können Abschnitt 2.1.1 - 2.1.7 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden. Um eine vereinfachte Darstellung der statistischen Unterschiede in den folgenden Diagrammen zu gewährleisten, wurde auch eine einfaktorielle ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$) durchgeführt. Die Proben der jeweiligen Behandlungen zum Zeitpunkt 0 dpi dienten dafür als Bezugswerte. Das folgende Diagramm zeigt die Veränderungen der F_v/F_m -Werte von *H. pluvialis* in Abhängigkeit definierter Kultivierungsbedingungen.

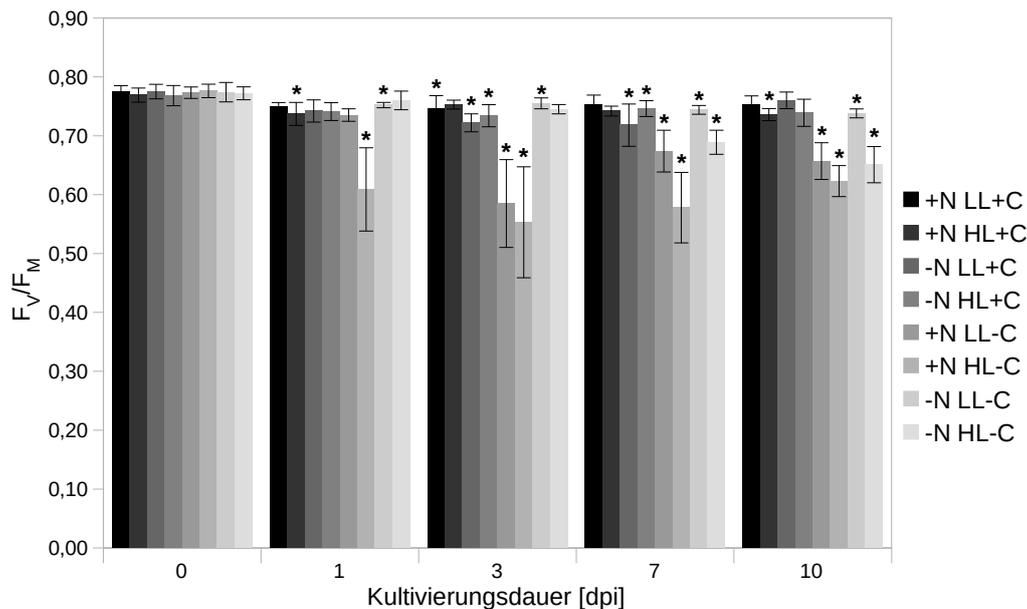


Abbildung 3.14: Maximale photochemische Quantenausbeute (F_v/F_m bei $0 \mu E/m^2/s$) von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

F_v/F_m -Werte wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus fünf BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; $* p \leq 0,05$), wobei die Proben zum Zeitpunkt 0 dpi als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 2.1.1 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Die Analyse der Zellen, welche eine kontinuierliche CO_2 -Begasung erhielten (vgl. Abb. 3.14 Proben: „+C“) zeigte, dass im Verlauf der Experimente keine signifikanten Veränderungen der F_v/F_m -Werte resultierten. Der Trend konnte bis zum siebten Tag ebenfalls in den Kulturen -N HL-C und über den gesamten Zeitraum der Kultivierung in den Proben -N LL-C beobachtet werden (vgl. Abb. 3.14 -N LL-C, -N HL-C). Im Gegensatz hierzu wurde eine signifikante Reduktion des Parameters von 0,78 auf 0,61 in den Proben +N HL-C am ersten Tag gezeigt (vgl. Abb. 3.14 +N HL-C 1 dpi). Beginnend ab dem dritten Tag wurde zusätzlich in den Kulturen -N LL+C eine signifikante Reduktion des Parameters nachgewiesen (vgl. Abb. 3.14 +N LL-C 3 dpi), welche bis zum Abbruch der Experimente erhalten blieb (vgl. Abschnitt 2.1.1 Teil B). Kulturen, welche sich ausschließlich in Bezug auf das applizierte Beleuchtungsregime unterschieden, wiesen mitunter signifikant verschiedene F_v/F_m -Werte auf (+N LL/HL-C bzw. -N LL/HL-C). Die maximale photochemische Quantenausbeute in den unter Lichtstress kultivierten Proben (HL) war signifikant reduziert (vgl. Abb. 3.14 Proben: +N LL/HL-C an 7 dpi bzw. -N LL/HL-C an 10 dpi, vgl. Abschnitt 2.1.1 Teil B). Die Ergebnisse wiesen auf Veränderungen der maximalen photochemischen Kapazität zellulärer Photosysteme in Abhängigkeit der Zeit und der Kultivierungsparameter hin. Nachfolgend wurde die Effizienz der zellulären Photosysteme in Abhängigkeit definierter Beleuchtungsintensitäten untersucht und exemplarisch anhand der Ergebnisse in Abb. 3.15 dargestellt. Zu Beginn (0 dpi) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen nachgewiesen werden. In den Kontrollansätzen wurde im zeitlichen Verlauf ein signifikanter Anstieg der F_v'/F_m' -Werte beobachtet (vgl. Abb. 3.15 +N LL+C), während bei den Behandlungsregimes +N HL+C, -N LL+C, -N HL+C und +N LL-C keine signifikanten Änderungen der F_v'/F_m' -Werte zu Beginn und am Ende der Experimente zu verzeichnen waren (vgl. Absatz 2.1.6 Teil B).

Im Vergleich zur Kontrolle (+N LL+C) zeichnete sich ab dem siebten Tag eine signifikante Erhöhung der F_v'/F_M' -Werte, in den unter induktiven Lichtbedingungen (HL) ohne CO₂-Begasung kultivierten Proben, ab (vgl. Abb. 3.15 +N HL-C und -N HL-C mit +N LL+C an 7, 10 dpi).

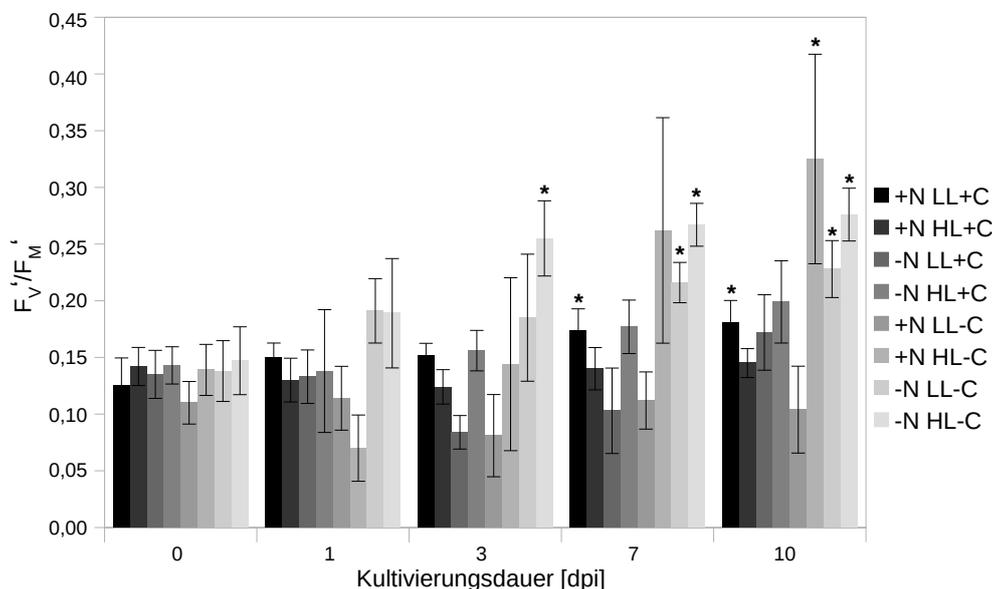


Abbildung 3.15: Effektive photochemische Quantenausbeute (F_v'/F_M' bei 403 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

F_v'/F_M' -Werte wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus fünf BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die Proben zum Zeitpunkt 0 dpi als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 2.1.7 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Zusammenfassend konnte aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass die Kultivierungsparameter signifikante Veränderungen der F_v/F_M - bzw. F_v'/F_M' -Werte in den Kulturen bedingten. Die Effekte wiesen eine temporäre Abhängigkeit auf und waren nicht in jedem Fall über den Verlauf der Experimente konsistent. Kulturen ohne zusätzliche CO₂-Begasung zeigten signifikant reduzierte F_v/F_M -Werte im Vergleich zu den übrigen Kultivierungsansätzen (vgl. Absatz 2.1.1 Teil B). Im Gegensatz hierzu wurde jedoch nachgewiesen, dass in Abhängigkeit definierter Lichtintensitäten (403 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) signifikant gesteigerte F_v'/F_M' -Werte in den Kulturen resultierten (vgl. Absatz 2.1.6, 2.1.7 Teil B). In weiteren Experimenten wurde der NPQ der Zellen analysiert und die Ergebnisse im Folgenden dargestellt.

3.3.2 Nicht-photochemischer Quench nativer Flüssigkulturen von *H. pluvialis*

Der NPQ gilt als Maß zur Abschätzung der Energie einer Lichtquelle, welche nicht im Zuge photochemischer Prozesse umgewandelt werden kann und bspw. in Form von Wärme oder Chlorophyllfluoreszenz freigesetzt wird. Die Analyse des NPQ von *H. pluvialis* erfolgte in Abhängigkeit definierter Lichtintensitäten. Für die Auswertung der Experimente des Abschnitts 3.3.2 wurde eine vollständige Analyse statistisch signifikanter Unterschiede aller Proben gemäß Abschnitt 2.2.22.1 durchgeführt. Die Konfidenzintervalle (p -Werte) der Analysen können Abschnitt 2.2.1 - 2.2.6 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden. Für die Visualisierung der grundlegenden Ergebnisse erfolgte die Darstellung des Parameters in Abhängigkeit einer Lichtintensität von 403 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$.

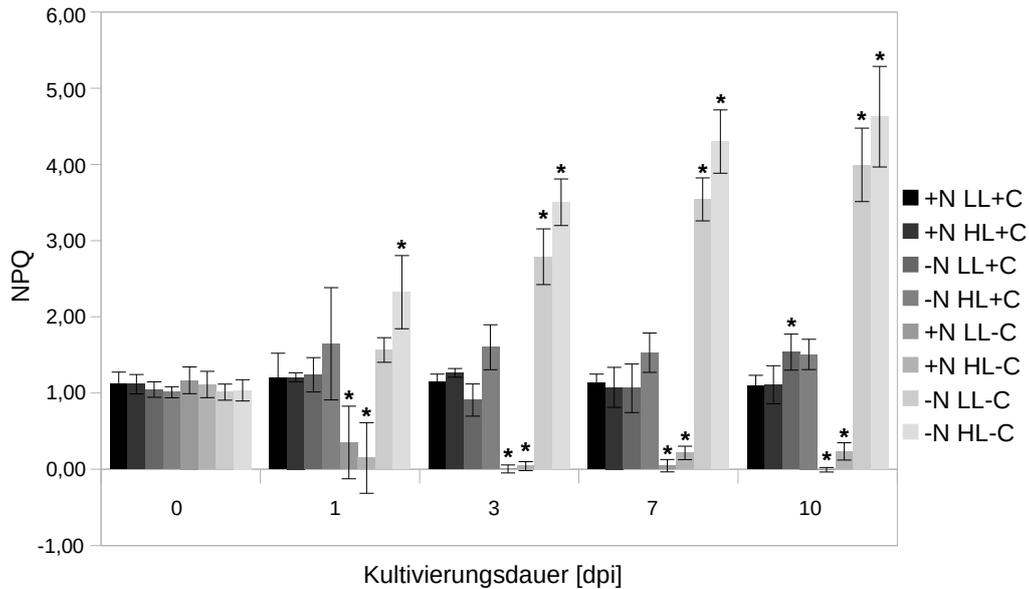


Abbildung 3.16: Nicht-photochemischer Quench (NPQ bei $403 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

NPQ-Werte wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus fünf BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; $* p \leq 0,05$), wobei die Proben zum Zeitpunkt 0 dpi als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 2.2.6 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Die Analyse der NPQ-Werte in der Kontrollreaktion (+N LL+C) sowie den Kulturen +N HL+C und -N HL+C zeigte über den gesamten Verlauf der Kultivierung keine signifikanten Veränderungen (vgl. Abb. 3.16 +N LL+C, +N HL+C, -N HL+C). Des Weiteren wurde gezeigt dass die Kulturen -N LL-C, -N HL-C eine signifikante Erhöhung der NPQ-Aktivität gegenüber der Gesamtheit der weiteren Ansätze ab dem dritten Tag aufwiesen (vgl. Abb. 3.16 -N LL-C, -N HL-C an 3 dpi, Abschnitt 2.2.6 Teil B). Die Zunahme setzte sich bis zum Ende des Experimentes fort und erreichte am zehnten Tag ein im Vergleich zur Kontrollreaktion 4 - 5-fach höheres und signifikant verschiedenes Level (vgl. Abb. 3.16 -N LL-C, -N HL-C mit +N LL+C an 10 dpi). Weiterhin war es ab dem ersten Tag möglich, eine signifikante Abnahme des Parameters in den Zellen der Kulturen +N LL-C und +N HL-C zu beobachten, welche bis zum Ende des Experimentes verfolgt werden konnte (vgl. Abb. 3.16 +N LL-C und +N HL-C mit +N LL+C an 1 - 10 dpi).

Anhand von Abb. 3.17 konnte eine zusammenfassende Analyse über die Veränderungen der F_V/F_M - bzw. F_V'/F_M' -Werte sowie des NPQ in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen durchgeführt werden. Im Folgenden werden signifikante Unterschiede beschrieben, welche auf den statistischen Analysen im Abschnitt 2.1 und 2.2 des statistischen Anhangs (Teil B) basieren. Die Ergebnisse der photochemischen Energieverwertung in den Kontrollansätzen (+N LL+C) zeigten, dass die Zellen im Verlauf der Kultivierung erhöhte F_V'/F_M' -Werte aufwiesen, welche mit einer signifikanten Reduktion des NPQ in Abhängigkeit von $\text{PFD} < 171 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ einhergingen. Das maximale photochemische Verwertungspotential wies hingegen keine signifikanten Veränderungen auf. Die Ax-produzierenden Kulturen zeigten variable Veränderungen des photosynthetischen Aktivitätsstatus als Reaktion auf die applizierten Lichtintensitäten. Die Ansätze +N HL+C und -N HL+C wiesen eine identische Reaktion bezüglich der Parameter auf, welche sich bis zum dritten Tag von jener der Kulturen -N LL+C unterschied.

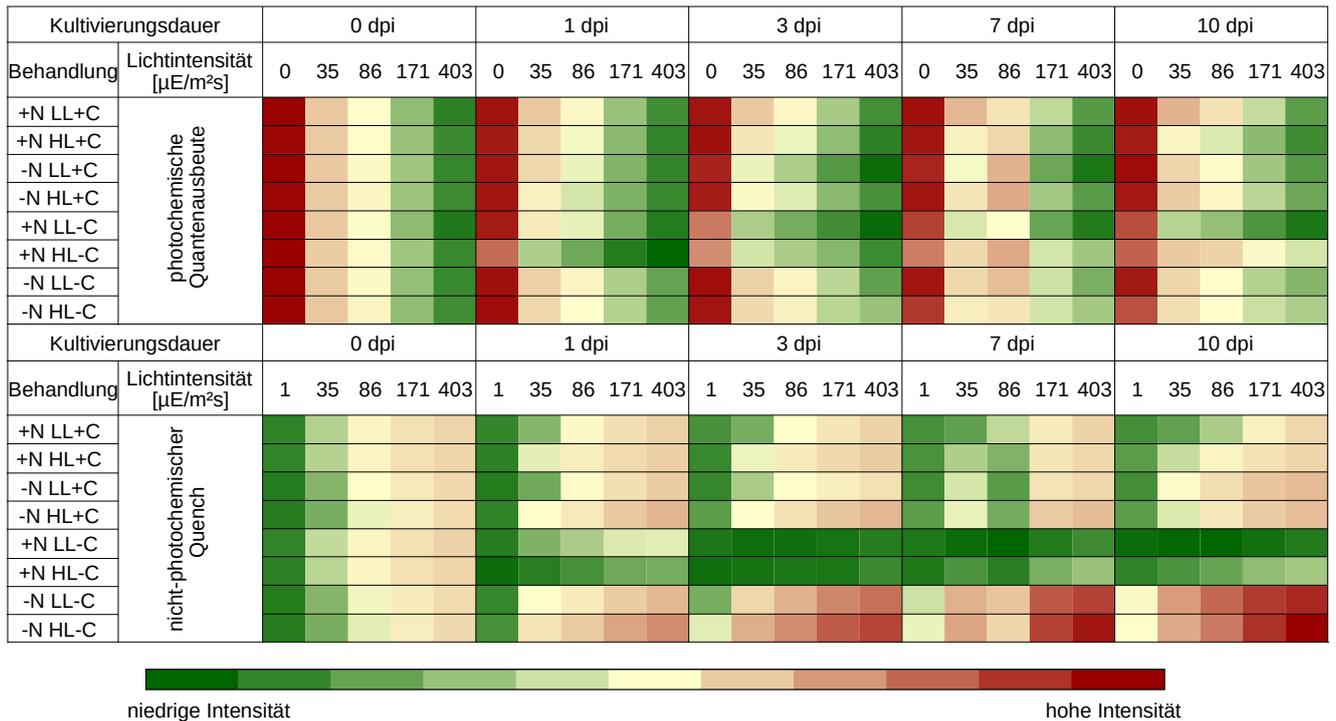


Abbildung 3.17: Photosynthetische Aktivitätsparameter von *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Beleuchtungsintensitäten und Prozessparameter (1 - 10 dpi)

Photochemische Quantenausbeuten und nicht-photochemische Quench-Aktivitäten wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) bei verschiedenen Beleuchtungsintensitäten (0, 1, 35, 86, 171, 403 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) ermittelt. Die Daten resultieren aus den Messungen von fünf BR und werden anhand berechneter Mittelwerte dargestellt. Die Farbverläufe repräsentieren die Dimensionen der Parameter einer Datenreihe gemäß der Skala.

Am zehnten Tag wiesen die Zellen des Behandlungsregimes +N HL+C hingegen Unterschiede der F_V'/F_M' -Werte gegenüber den Ansätzen -N LL/HL+C auf (vgl. Abb. 3.17 +N HL+C und -N HL+C mit -N LL+C bis 3 dpi bzw. -N LL/HL+C mit +N HL+C an 10 dpi). Die F_V'/F_M' -Werte der Kulturen -N LL-C und -N HL-C konnten am zehnten Tag mit jenen der Ax-produzierenden Zellen (-N LL/HL+C) verglichen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass mit zunehmender Ax-Konzentration und einem geringeren Chl- zu Car-Verhältnis der Zellen ein höheres Maß an NPQ bei simultaner Reduktion der F_V'/F_M' -Werte resultierte (vgl. Abb.3.17 +N HL+C, -N LL+C und -N HL+C mit +N LL+C an 10 dpi). Die Zellen der Behandlungen -N LL-C und -N HL-C kennzeichneten sich durch eine signifikante Zunahme des NPQ im Verlauf der Experimente. Weiterhin wurde ab dem siebten Tag eine signifikante Reduktion der F_V'/F_M' -Werte im Vergleich zur Kontrollreaktion in den Kulturen -N HL-C ermittelt. Die F_V'/F_M' - bzw. F_V'/F_M' -Werte der Proben +N HL-C wurden bis zum dritten Tag signifikant reduziert, wohingegen im weiteren Verlauf eine Regeneration des photochemischen Verwertungspotentials beobachtet werden konnte. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen bei Lichtintensitäten $> 35 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ein erhöhtes photochemisches Verwertungspotential bei verminderter NPQ-Aktivität im Vergleich zu anderen Kulturen aufwiesen. Die Ergebnisse weisen auf komplexe Regulationsmechanismen hin und verdeutlichen das Regenerationspotential photosynthetischer Prozesse in den Zellen, welche im Abschnitt 4.3 diskutiert werden. Weiterführend wurde die photosynthetische Aktivität der Zellen anhand des lichtabhängigen Gasbildungspotentials untersucht.

3.3.3 Gasbildungspotential nativer Flüssigkulturen von *H. pluvialis*

Die Analysen photosynthetischer Aktivitätsparameter im Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 basierten auf Chlorophyllfluoreszenzmessungen bei definierten Beleuchtungsintensitäten. Im Rahmen weiterer Experimente wurde das Gasbildungspotential von *H. pluvialis* bei einer PFD von $171 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ untersucht. Anhand der Gasbildungsraten erfolgte die Berechnung der SBR in Abhängigkeit der Zellkonzentration gemäß der Angaben in Abschnitt 2.2.9. Für die Auswertung der Experimente des Abschnitts 3.3.3 wurde eine vollständige Analyse statistischer signifikanter Unterschiede aller Proben gemäß Abschnitt 2.2.22.1 durchgeführt. Die Konfidenzintervalle (p-Werte) der Analysen können Abschnitt 2.3.1 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden. Um eine vereinfachte Darstellung der statistischen Unterschiede zu gewährleisten, wurde auch eine einfaktorielle ANOVA (Tukey-HSD; $* p \leq 0,05$) durchgeführt. Die Proben der jeweiligen Behandlungen zum Zeitpunkt 1 dpi dienten dafür als Bezugswerte (vgl. Abb. 3.18)

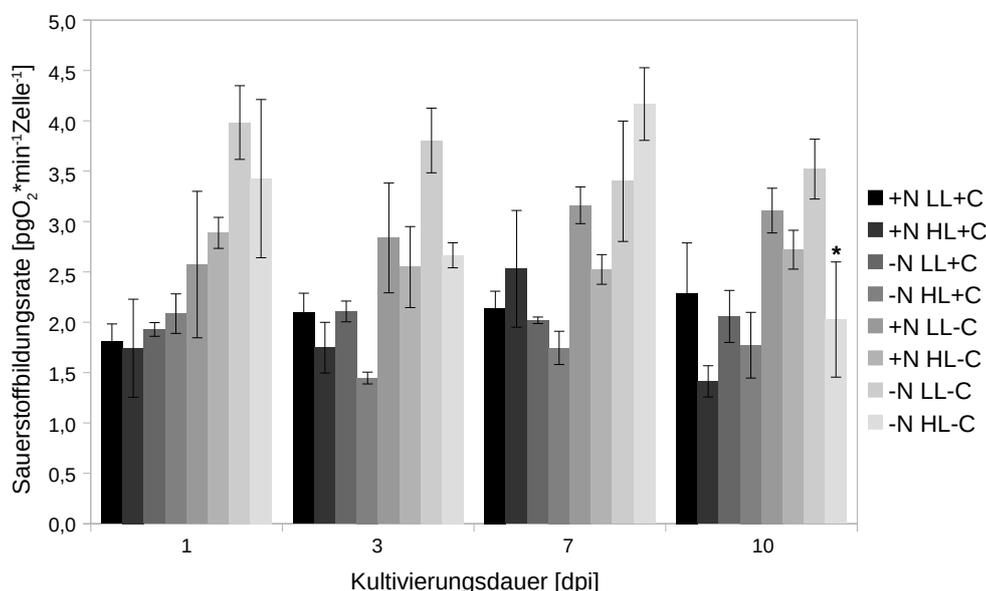


Abbildung 3.18: Sauerstoffbildungsrate (SBR bei $171 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter

SBR wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; $* p \leq 0,05$), wobei die Proben zum Zeitpunkt 1 dpi als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 2.3.1 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Die Ergebnisse in Abb. 3.18 zeigten, dass in den Kulturen keine signifikanten Änderungen der SBR im Vergleich vom ersten zum zehnten Tag der Kultivierung resultierten (Ausnahme -N HL-C). Der Vergleich aller Kulturen ergab, dass Kulturen ohne CO_2 -Begasung signifikant gesteigerte SBR aufwiesen (vgl. Abb. 3.18 -N LL-C, -N HL-C, Abschnitt 2.3.1 Teil B). Weiterhin wurden am dritten und zehnten Tag in den bei induktiven Lichtbedingungen kultivierten Proben (HL) signifikant reduzierte SBR, im Vergleich zu den bei nicht-induktiven Lichtbedingungen kultivierten Ansätzen (LL), beobachtet (vgl. Abb. 3.18 -N LL-C mit N HL-C an 3, 10 dpi und +N LL+C mit +N HL+C an 10 dpi, Abschnitt 2.3.1 Teil B). Für einen zusammenfassenden Vergleich der Daten aus Abschnitt 3.3.1 - 3.3.3 wurde eine Übersicht generiert und in Abb. 3.19 dargestellt.

Behandlung	Parameter	0 dpi	1 dpi	3 dpi	7 dpi	10 dpi
+N LL+C	F_V'/F_M'	low	low	low	low	low
	NPQ	low	low	low	low	low
	SBR	high	high	high	high	high
+N HL+C	F_V'/F_M'	low	low	low	low	low
	NPQ	low	low	low	low	low
	SBR	high	high	high	high	high
-N LL+C	F_V'/F_M'	low	low	low	low	low
	NPQ	low	low	low	low	low
	SBR	high	high	high	high	high
-N HL+C	F_V'/F_M'	low	low	low	low	low
	NPQ	low	low	low	low	low
	SBR	high	high	high	high	high
+N LL-C	F_V'/F_M'	low	low	low	low	low
	NPQ	low	low	low	low	low
	SBR	high	high	high	high	high
+N HL-C	F_V'/F_M'	low	low	low	low	low
	NPQ	low	low	low	low	low
	SBR	high	high	high	high	high
-N LL-C	F_V'/F_M'	low	low	low	low	low
	NPQ	low	low	low	low	low
	SBR	high	high	high	high	high
-N HL-C	F_V'/F_M'	low	low	low	low	low
	NPQ	low	low	low	low	low
	SBR	high	high	high	high	high



Abbildung 3.19: Photosynthetische Aktivitätsparameter ($171 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) von *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi)

Effektive photochemische Quantenausbeuten (F_V'/F_M'), nicht-photochemische Quench-Aktivitäten (NPQ) sowie die Sauerstoffbildungsraten [SBR in $\text{pgO}_2/\text{min} \cdot \text{Zelle}$] wurden in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (0 - 10 dpi) ermittelt. Die Daten resultieren aus den Messungen von 3 - 5 BR und werden anhand berechneter Mittelwerte dargestellt. Die Farbverläufe repräsentieren die Dimensionen der Parameter einer Datenreihe gemäß der Skala.

Im Folgenden werden signifikante Unterschiede beschrieben, welche auf den statistischen Analysen der Daten basieren (vgl. Abschnitt 2.1.6, 2.2.5, 2.3.1 statistischer Anhang Teil B). Die Untersuchungen der F_V'/F_M' -Werte sowie der SBR der Kontrollansätze zeigten eine stetige Zunahme der Parameter im zeitlichen Verlauf, wohingegen eine Reduktion des NPQ beobachtet wurde. Die Effekte wiesen in Bezug auf die F_V'/F_M' -Werte signifikante Unterschiede auf. Die Kulturen +N HL-C wiesen ebenfalls eine Zunahme der F_V'/F_M' -Werte (signifikant ab 3 dpi) sowie der SBR bei gleichzeitiger Abnahme des NPQ (signifikant ab 1 dpi) auf. In den Ax-produzierenden Kulturen +N HL+C konnten keine signifikanten Veränderungen von F_V'/F_M' und NPQ gezeigt werden, während die Ansätze -N LL/HL+C eine signifikante Erhöhung der Parameter aufwiesen. Die Proben +N LL-C wiesen reduzierte NPQ- und F_V'/F_M' -Werte (signifikant an 1 dpi bzw. 3 dpi) bei gleichzeitiger Zunahme der SBR auf (nicht signifikant). Im Gegensatz konnte in den Ansätzen -N LL/HL-C eine Zunahme des NPQ und der F_V'/F_M' -Werte (signifikant an 1 dpi bzw. 7 dpi) bei konstanter SBR gezeigt werden (vgl. Abb. 3.19 -N LL-C und -N HL-C). Die Auswertung der in Abb. 3.19 visualisierten Daten ermöglichte es Entwicklungsmuster nachzuweisen, welche teilweise den Ergebnissen der Literatur entsprechen. Weiterhin zeichneten sich neuartige Erkenntnisse ab, welche auf eine komplexe Regulation stoffwechselphysiologischer Prozesse verweisen. Diese wurden weiterführend auf Genexpressions- und Proteom-Ebene untersucht und im Folgenden ausgewertet.

3.4 Genexpression von *H. pluvialis* in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen

Die Untersuchung von Wachstumsindikatoren, morphologischer und physiologischer Parameter sowie die Analyse der Pigmentzusammensetzung von *H. pluvialis* verdeutlichen, dass die Kultivierungsbedingungen physiologische Veränderungen bedingen. Um mögliche Zusammenhänge aufzuklären wurden umfangreiche Analysen der Genexpression anhand von qPCR-Experimenten durchgeführt.

3.4.1 Identifikation von *housekeeping*-Genen in *H. pluvialis*

Die qPCR-Analyse erfordert die Identifizierung von Referenzgenen, deren Transkriptmengen sich in Abhängigkeit der Kulturbedingungen möglichst nicht ändern. Hierzu bieten sich Gene des Primärstoffwechsels an, sogenannte *housekeeping*-Gene. Für die Identifikation von *housekeeping*-Genen in *H. pluvialis* wurden in 32 Proben (acht Kombinationen von Kultivierungsparametern an vier Zeitpunkten) Transkripte für ausgewählte Gene mittels qPCR analysiert. Die Schwankungsbreite der gemittelten C_T -Werte ist in Abb. 3.20 dargestellt.

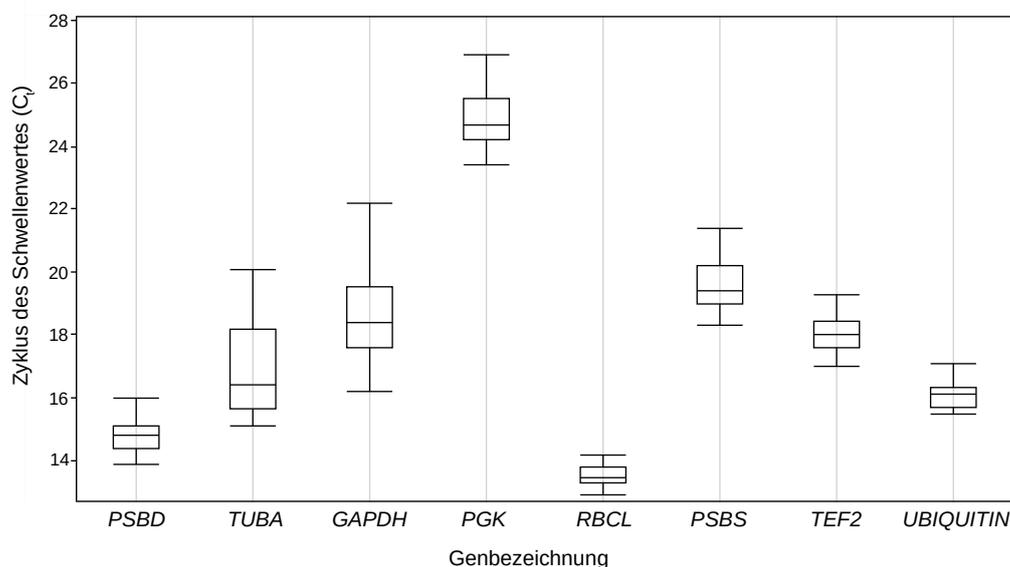


Abbildung 3.20: Häufigkeitsverteilung der C_T -Werte potentieller *housekeeping*-Gene von *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi)

C_T -Werte ausgewählter Transkripte wurden im Rahmen quantitativer Genexpressionsanalysen von 32 verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf von Experimentalreihen (1 - 10 dpi) ermittelt. Gemittelte C_T -Werte von drei BR wurden für die Darstellung der Box-Plots verwendet.

Bei der Analyse zeichnete sich ab, dass die Gene Alpha Tubulin (*TUBA*) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) die größten Differenzen der ermittelten C_T -Werte aufgewiesen haben. Die Gene Photosystem II D2-Protein (*PSBD*), 3-Phosphoglyceratkinase (*PGK*), Photosystem II 22 kDa-Protein (*PSBS*) und Translations-Elongationsfaktor 2 (*TEF2*) wiesen hingegen eine geringere Schwankungsbreite der C_T -Werte (dC_T) auf. Die Schwankungsbreite der Gene *RBCL* (1,29) und *UBIQUITIN* (1,66) war 0,92 - 3,44-fach geringer als jene Differenz, welche bei der Analyse der Gene *PSBS* (dC_T : 1,99), *PSBD* (dC_T : 2,13), *TEF2* (dC_T : 3,05) und *PGK* (dC_T : 4,43) ermittelt werden konnte. Auf Grundlage der Daten konnten zwei *housekeeping*-Gene (*RBCL* und *UBIQUITIN*) identifiziert werden, deren Transkriptmengen unter den gewählten Kultivierungsbedingungen eine geringe Schwankungsbreite zeigten und die daher als Normalisierungsgrundlage für die folgenden qPCR-Experimente verwendet wurden.

3.4.2 Relative Genexpression von *H. pluvialis* in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen

Zur Analyse der Genexpressionsänderungen wurden in einer Experimentalreihe 32 Proben untersucht, welche die verschiedenen Kultivierungsbedingungen und Probenahmezeitpunkte repräsentieren. Für die Auswertung der Experimente des Abschnitts 3.4.2 wurde eine vollständige statistische Datenanalyse aller Proben gemäß Abschnitt 2.2.22.2 durchgeführt. Die Konfidenzintervalle (p-Werte) können Abschnitt 3.1 - 3.5 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden. Um eine vereinfachte Darstellung statistischer Unterschiede in den folgenden Diagrammen zu gewährleisten, wurde auch eine einfaktorielle ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$) durchgeführt. Hierbei dienten die zur Normalisierung der Daten verwendeten Kontrollansätze +N LL+C als Bezugswerte. Die Analysen verfolgten das Ziel, einen Einblick in molekulare Veränderungen von *H. pluvialis* in relevanten Stoffwechselwegen zu erlangen. Die Auswahl erfolgte auf Grundlage von Sequenzinformationen der Datenbank *UniProt Knowledgebase* (UniProtKB) [<https://www.uniprot.org/>] und des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]. Die Transkripte wurden den Kategorien Carotinoid-Biosynthese, Fettsäurestoffwechsel, Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus (C- und N-Metabolismus), Chlorophyll- und Photosynthese, Stressantwort und zelluläre Regulationsprozesse zugeordnet und sind zusammenfassend in Abb. 3.21 dargestellt.

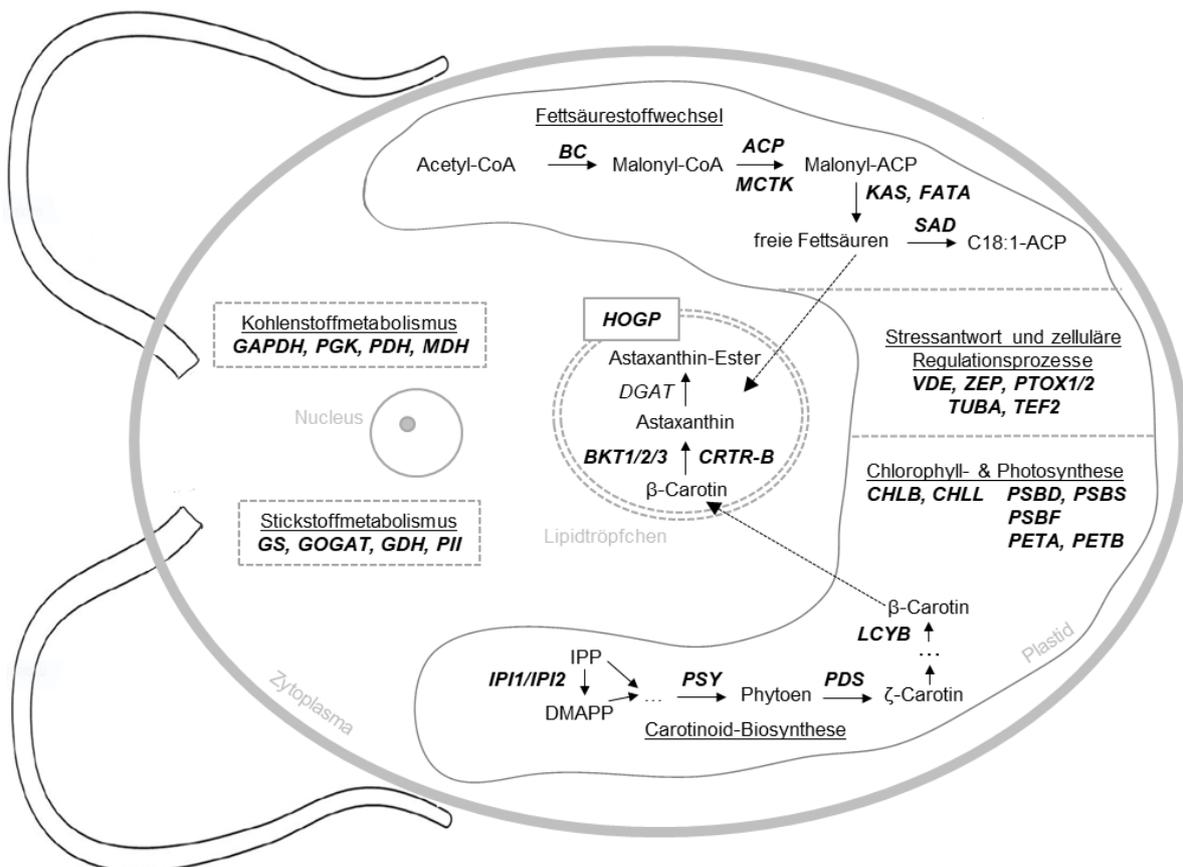


Abbildung 3.21: Übersicht der analysierten Transkripte im Rahmen von qPCR-Experimenten unter Berücksichtigung der Einteilung in definierte metabolische Kategorien

Schematische Darstellung relevanter Transkripte aus unterschiedlichen metabolischen Kategorien unter Berücksichtigung der zellulären Wirkungsorte dieser in den Zellen von *H. pluvialis*. Im Rahmen der qPCR-Experimente erfolgte die Analyse der Expression jener Gen, welche in der schematischen Übersicht durch eine breite Schriftart hervorgehoben wurden. Die ermittelten Expressionslevel der Gene *RBCL* und *UBIQUITIN* dienten bei den Analysen als *housekeeping*-Gene.

Die Auswertung der Expressionsunterschiede erfolgte in Abhängigkeit der angewendeten Kultivierungsbedingungen, wobei im Folgenden lediglich die Daten zu ausgewählten Versuchszeitpunkten dargestellt werden. Die Daten der Expressionsänderungen weiterer Versuchszeitpunkte sind den Abb. 7.3 - 7.14 im Anhang zu entnehmen. Die Ergebnisse in Abb. 3.22 zeigten, dass bereits am ersten Tag eine signifikante Veränderung der relativen Expression von Genen der Carotinoid-Biosynthese in Abhängigkeit der angewendeten Kultivierungsparameter resultierte. Die Zellen des Behandlungsregimes -N HL+C wiesen gegenüber der Kontrollreaktion (+N LL+C) eine signifikant erhöhte Expression (2 - 11-fach) essentieller Gene der Carotinoid-Biosynthese auf, welche vereinzelt ebenfalls in den Kulturen +N HL+C und -N LL+C gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.22 +N LL+C mit +N HL+C, -N LL+C, -N HL+C). Es zeichnete sich ab, dass die Zellen in Abhängigkeit von Lichtstress (+N HL+C) ein signifikant höheres Expressionslevel der Gene Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (*IPI1*, *IPI2*) und *BKT1* gegenüber jenen Zellen aufwiesen, welche dem Stressfaktor des Nitratmangels im Kulturmedium ausgesetzt waren (vgl. Abschnitt 3.1 Teil B). Im Gegensatz hierzu wiesen jene Zellen in Abwesenheit von Nitrat (-N LL+C) eine signifikant höhere Expression des Gens *CRTR-B* auf (vgl. Abb. 3.22 +N HL+C mit -N LL+C in *IPI1*, *IPI2*, *BKT1*, *CRTR-B*, Abschnitt 3.1 Teil B).

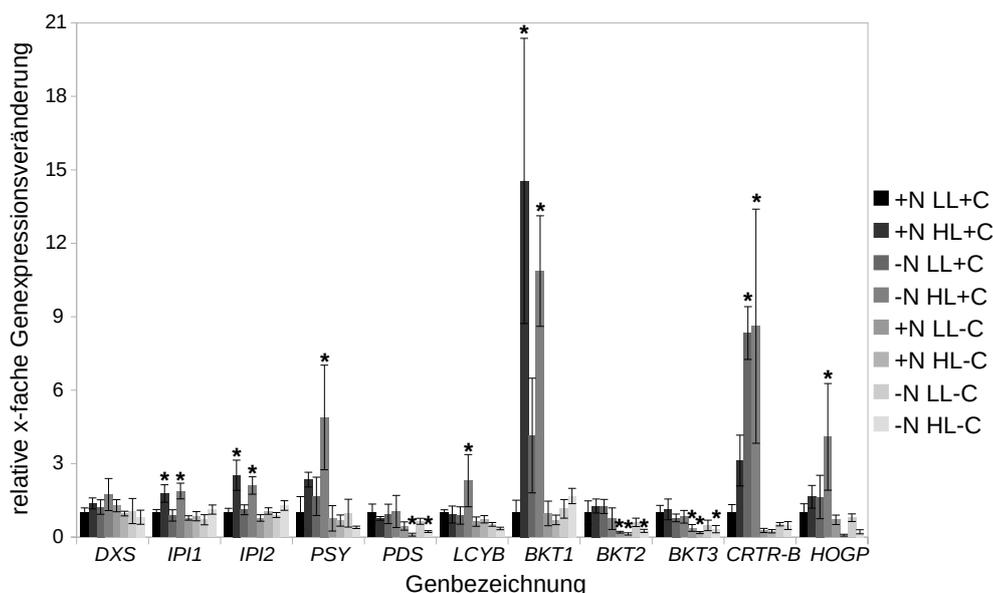


Abbildung 3.22: Expression ausgewählter Gene der Carotinoid-Biosynthese in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Carotinoid-Biosynthese (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 1 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellem ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.1.1 - 3.1.11 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Am dritten Tag konnte in den Proben +N HL+C, -N LL+C und -N HL+C eine anhaltend erhöhte und signifikant verschiedene Expression beschriebener Gene verglichen zur Kontrolle beobachtet werden. Hierbei zeichnete sich ab, dass die Expression einzelner der genannten Gene auf ein identisches Niveau anstieg (vgl. Abb. 3.23 +N HL+C, -N LL+C, -N HL+C, Abschnitt 3.1 Teil B).

Weiterhin setzte sich der in Abb. 3.22 beobachtete Trend im Verlauf der Experimente fort und zeigte, dass die Proben +N HL+C und -N HL+C eine signifikant erhöhte Expression der Gene *IPI1* und *IPI2* verglichen zu den übrigen Kulturen aufwiesen (vgl. Abb. 3.23). Die codierten Proteine (*IPI1* und *IPI2*) katalysieren die primäre Isomerisierungsreaktion isoprenoider Grundkörper (*IPP* und *DMAPP*) und bilden somit einen der initialen Schritte der Carotinoid-Biosynthese ab. In den analysierten Genen der Carotinoid-Biosynthese von *H. pluvialis* waren insgesamt drei Isoformen der β -Carotin-Ketolase (*BKT1*, *BKT2*, *BKT3*) enthalten. Wie beschrieben, konnte bereits nach einem Tag eine signifikante Zunahme der Expression von *BKT1* in den Ax-produzierenden Zellen (+N HL+C, -N LL+C, -N HL+C) nachgewiesen werden, welche über den Verlauf der Kultivierung erhalten blieb (Ausnahme +N HL+C an 10 dpi). Im Gegensatz zeichnete sich im Zeitraum vom dritten bis zum siebten Tag in den Kulturen +N HL+C eine signifikante Zunahme der Expression von *BKT2* gegenüber den übrigen Behandlungsregimes ab (vgl. Abschnitt 3.1 Teil B). Die Ergebnisse in Abb. 3.23 wiesen ebenfalls auf eine signifikante Zunahme der Expression von *PSY* in den Proben +N LL-C und +N HL-C hin (vgl. Abschnitt 3.1 Teil B). Im Verlauf der Kultivierung wurde zusätzlich ein Anstieg der Expression weiterer Gene der Carotinoid-Biosynthese in den genannten Behandlungsregimes beobachtet. Am siebten bzw. zehnten Tag wiesen die Zellen ein vergleichbares Expressionslevel hinsichtlich essentieller Gene des analysierten Stoffwechselprozesses zu den Ax-produzierenden Kulturen +N HL+C und -N LL+C auf (vgl. Abb. 3.24, 7.3 Expression von *PSY*, *CRTR-B* in +N LL/HL-C mit +N HL+C und -N LL+C, Abschnitt 3.1 Teil B). Die Analysen der Expressionsänderungen am siebten und zehnten Tag konnten die im Vorfeld beschriebenen Beobachtungen bestätigen.

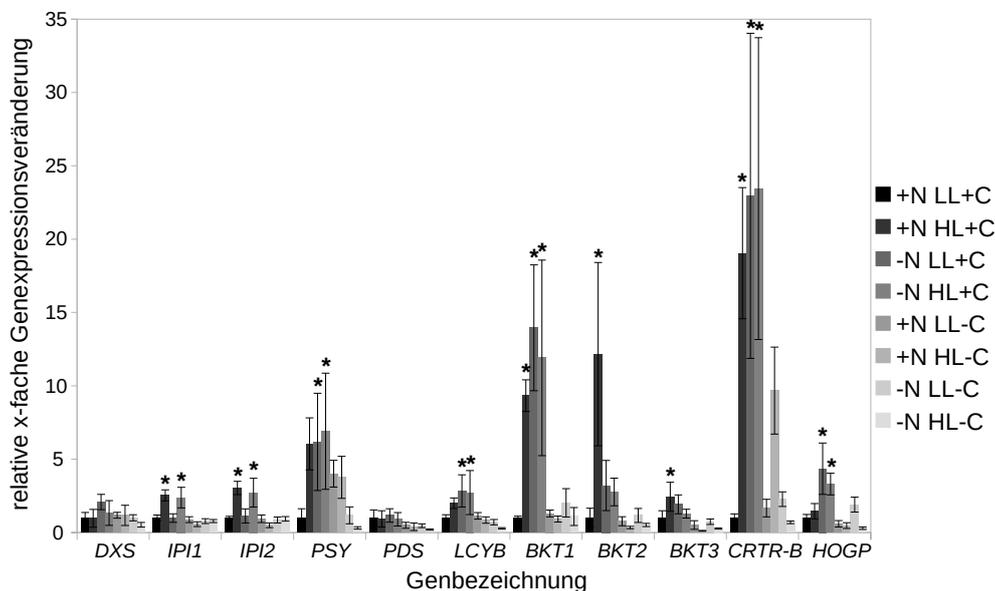


Abbildung 3.23: Expression ausgewählter Gene der Carotinoid-Biosynthese in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (3 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Carotinoid-Biosynthese (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 3 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.1.1 - 3.1.11 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Die Beobachtungen waren in Hinblick auf die in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Ergebnisse ein Hinweis darauf, dass die Biosynthese von Ax auf Ebene der Genexpression in Kulturen von *H. pluvialis* induziert werden konnte, welche ohne zusätzliche CO₂-Begasung und unabhängig von induktiven Bedingungen (Nitratmangel im Kulturmedium bzw. Lichtstress (HL)) kultiviert wurden (+N LL-C).

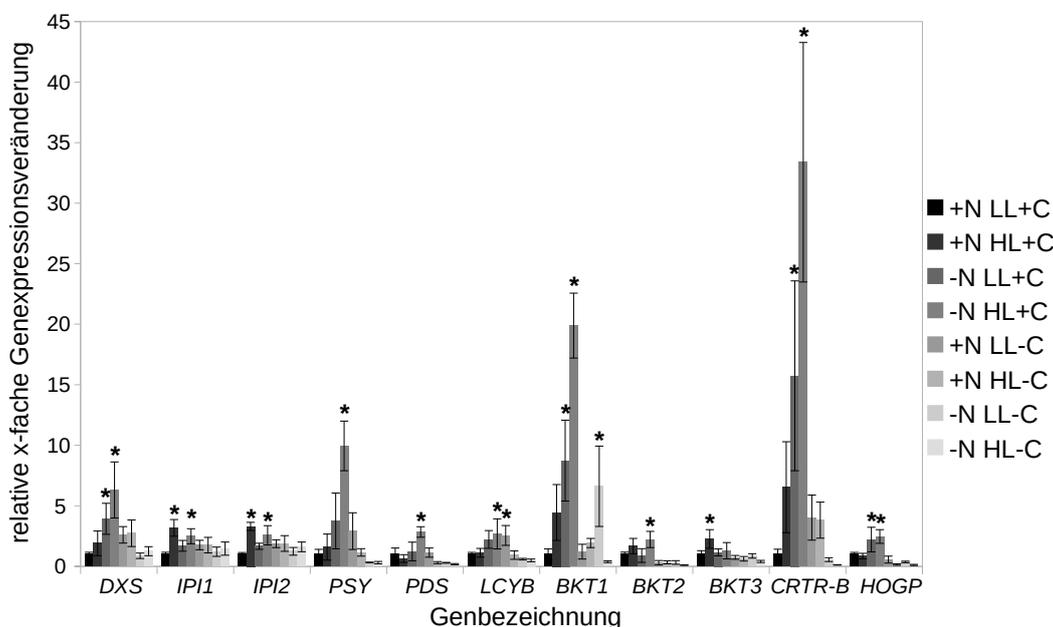


Abbildung 3.24: Expression ausgewählter Gene der Carotinoid-Biosynthese in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (10 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_t-Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Carotinoid-Biosynthese (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 10 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * p ≤ 0,05), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.1.1 - 3.1.11 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Zusätzlich war es möglich nachzuweisen, dass die Zellen der Proben -N HL+C eine signifikant erhöhte Expression in der Gesamtheit analysierter Gene im Vergleich zu den Kontrollansätzen am zehnten Tag aufwiesen (vgl. Abb. 3.24 +N LL+C mit -N HL+C Expression aller Gene, Ausnahme *BKT3*). Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression signifikant in Abhängigkeit der Zeit und der applizierten Kultivierungsparameter reguliert wurde (vgl. Abschnitt 3.1 Teil B). Die Applikation der unterschiedlichen Stressfaktoren ermöglichte den Nachweis, dass die signifikant erhöhte Expression ausgewählter Gene (z.B. *BKT2* in +N HL+C) in Abhängigkeit von Lichtstress induziert werden konnte. Zusätzlich wurden kurzzeitige Expressionsänderungen bestimmter Gene im Verlauf der Kultivierung (z.B. *PSY* in +N HL+C) beobachtet. Analog zu den Ergebnissen im Abschnitt 3.2.3 wurde eine Induktion der Ax-Biosynthese in den Ansätzen nachgewiesen, welche bei kontinuierlicher CO₂-Begasung in Abhängigkeit induktiver Bedingungen (Lichtstress (HL) bzw. Nitratmangel im Kulturmedium) kultiviert wurden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die steigende Ax-Konzentration im Zuge der kombinierten Applikation der induktiven Kultivierungsparameter ebenfalls auf molekularbiologischer Ebene mit einem signifikanten Anstieg der Expression einer Vielzahl der Gene des Carotinoid- bzw. Ax-Stoffwechsels einherging.

Um einen Überblick der Expressionsänderungen in Abhängigkeit der Kultivierungsparameter im Verlauf der Experimente zu erhalten, erfolgte die Analyse der Daten in einem Profilplot. Die in Abb. 3.25 dargestellten Daten repräsentieren eine Mengenverteilung (Box-Plot) der relativen Expressionsänderungen ausgewählter Transkripte der Carotinoid-Biosynthese. Die Berechnung relativer Genexpressionsunterschiede der Proben erfolgte im Bezug zur Kontrollreaktion (Kalibrator: +N LL+C), sodass in den Proben keine Veränderungen der Expressionsprofile im Verlauf der Experimente resultierten.

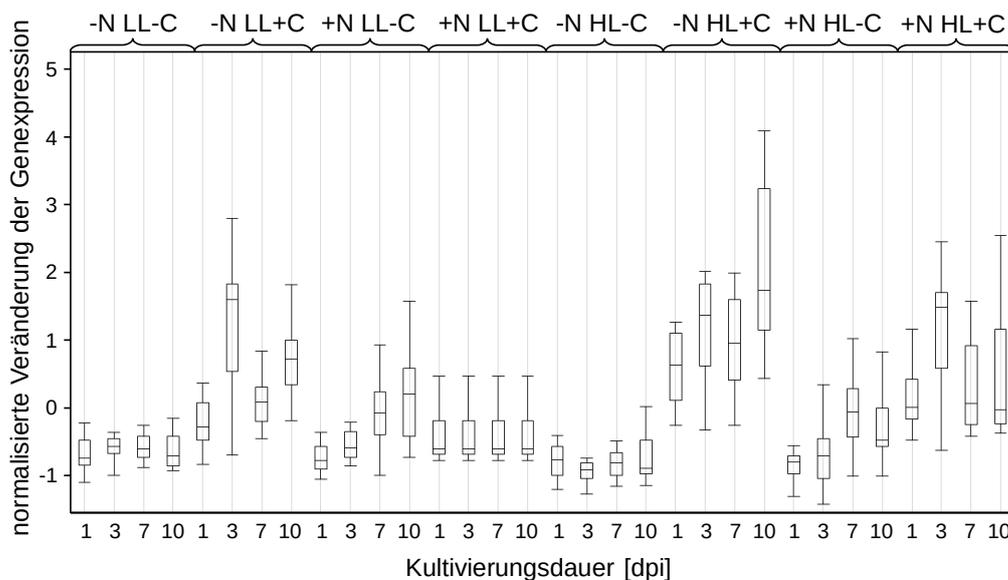


Abbildung 3.25: Expressionsprofile ausgewählter Gene der Carotinoid-Biosynthese in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi)

Häufigkeitsverteilung normalisierter Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die mit Hilfe eines Z-Scoring normalisierten ddC_t -Werte der Amplifikate repräsentieren die relative Veränderung der Gesamtheit relevanter Transkripte der Carotinoid-Biosynthese (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf unabhängiger Experimentalreihen (1 - 10 dpi). Aus den gemittelten ddC_t -Werten der Transkripte wurde eine Häufigkeitsverteilung erstellt und für die Visualisierung der dargestellten Box-Plots verwendet ($n = 3$).

Anhand der Visualisierung der Expressionsmuster ausgewählter Transkripte der Carotinoid-Biosynthese in Abb. 3.25 konnte gezeigt werden, in welchem Maß die Expression in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen reguliert wurde. Hierbei wiesen insbesondere die Zellen der Proben -N LL+C, -N HL+C und +N HL+C eine erhöhte normalisierte Veränderung der Genexpression gegenüber den Kontrollansätzen (+N LL+C) auf, welche über den Verlauf der Experimente anhielt. Weiterhin zeichnete sich in den Ansätzen +N LL-C und +N HL-C ein Anstieg des relativen Expressionslevels ab. Es konnten Schlussfolgerungen in Bezug auf die notwendigen Stressfaktoren zur Induktion der Carotinoid-Biosynthese sowie deren zeitliche Abhängigkeit abgeleitet werden.

Im Anschluss an die Biosynthese von Ax erfolgt ein intrazellulärer Veresterung des Keto-Carotinoids mit Fettsäuren [Zhekisheva *et al.*, 2005]. Die im Folgenden analysierten Transkripte sind im Rahmen des Fettsäurestoffwechsels an der Bildung von Malonyl-ACP (Biotin-Carboxylase (BC), Acyl-Carrier Protein (ACP), Malonyl-CoA-ACP-Transacylase (MCTK)), an der Kettenverlängerung im Zuge der Fettsäuresynthese (3-Ketoacyl-ACP-Synthase (KAS)) sowie der Fettsäuremodifikation (Stearyl-ACP-Desaturase (SAD)) und dem Fettsäuretransport ins Cytosol (Acyl-ACP-Thioesterase A (FATA)) beteiligt.

Im Rahmen der Analysen konnte am ersten Tag eine signifikante Zunahme der Expression des Gens *FATA* in den Kulturen -N HL+C nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.26 -N HL+C in *FATA*). Weiterhin wurde eine signifikante Expressionsverminderung in der Gesamtheit der analysierten Transkripte des Fettsäurestoffwechsels in den Kulturen +N HL-C beobachtet (vgl. Abb. 3.26 +N HL-C, Abschnitt 3.2 Teil B). Der Trend zeigte sich zusätzlich in allen Ansätzen, welche ohne CO₂-Begasung kultiviert wurden. Die Expression der Gene *ACP* und *KAS* wies in den genannten Proben einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollansätzen auf (vgl. Abb. 3.26 Proben: „-C“, Abschnitt 3.2 Teil B).

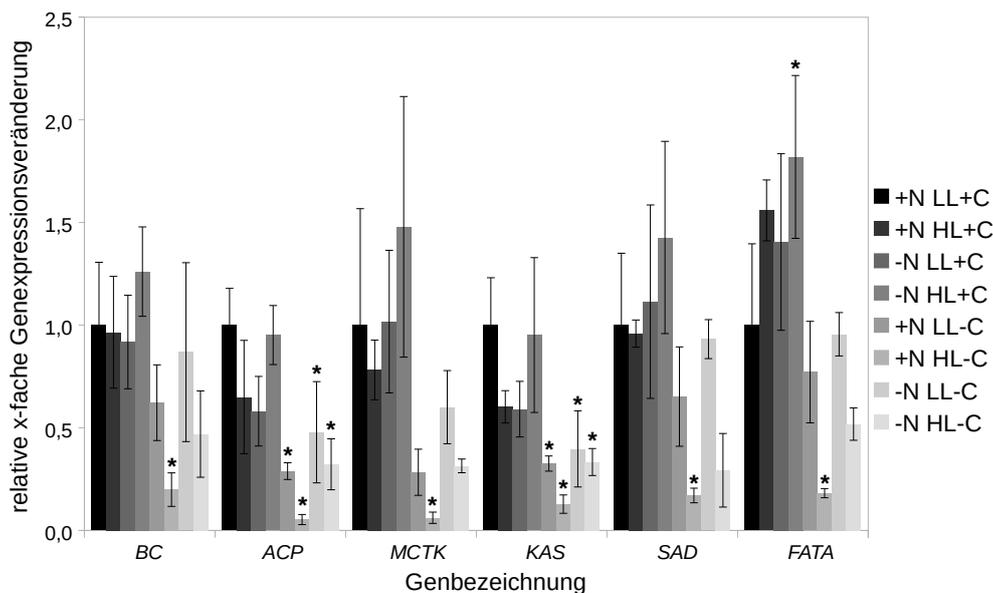


Abbildung 3.26: Expression ausgewählter Gene des Fettsäurestoffwechsels in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_t-Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte des Fettsäurestoffwechsels (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 1 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * p ≤ 0,05), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.2.1 - 3.2.6 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Im weiteren Verlauf zeichnete sich in den Proben +N HL-C, -N LL-C und -N HL-C ein reduziertes Expressionsniveau der Gene gegenüber der übrigen Kulturen ab. Hierbei konnten in der Kultur +N HL-C signifikante Unterschiede verglichen zu den Kontrollansätzen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.27 +N HL-C, -N LL-C und -N HL-C). Weiterhin zeigte sich, dass die Expression der Gene in den Kulturen +N LL-C keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollansätzen aufwies, obwohl diese keine CO₂-Begasung erhielten. Reduzierte Expressionslevel konnten ebenfalls in den Proben +N HL+C nachgewiesen werden. Die Beobachtungen waren zeitlich begrenzt und wiesen keinen systematischen Charakter auf (vgl. Abb. 7.4 +N HL+C in *BC*; Abb. 7.5 +N HL+C in *KAS*, *MCTK*). Im Verlauf der Experimente wurde eine signifikant erhöhte Expression von *SAD* und *FATA* in den Kulturen -N LL+C und -N HL+C verglichen zur Kontrolle beobachtet (vgl. Abb. 7.4, 3.27 -N LL/HL+C in *SAD*, *FATA*). Weiterhin wurden gezeigt, dass die Ax-produzierenden Kulturen signifikante Unterschiede in der Expression von Genen des Fettsäurestoffwechsels aufwies (vgl. Abschnitt 3.2 Teil B).

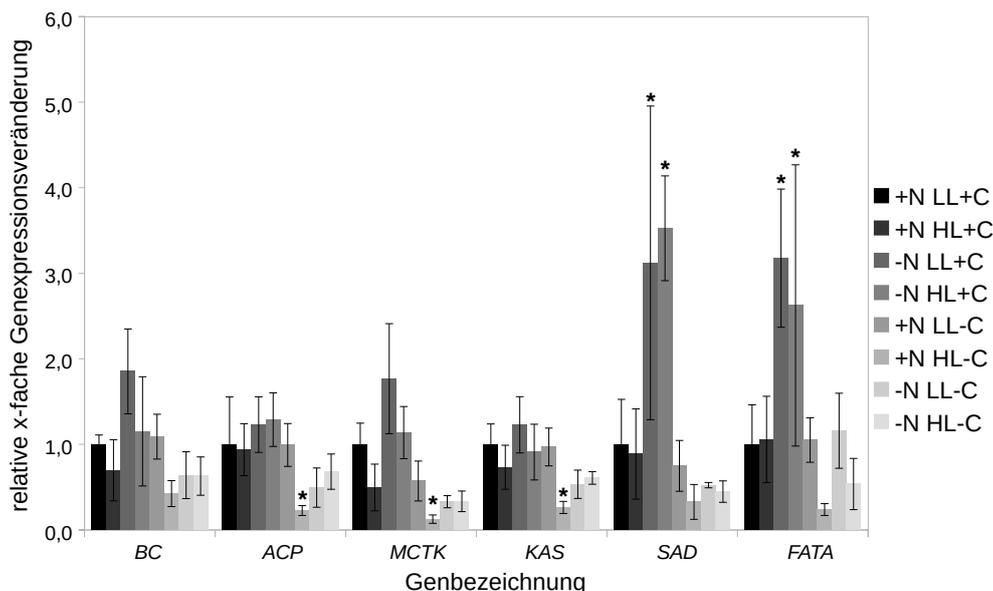


Abbildung 3.27: Expression ausgewählter Gene des Fettsäurestoffwechsels in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (10 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte des Fettsäurestoffwechsels (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 10 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.2.1 - 3.2.6 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Die Beobachtungen wurden anhand der Expressionsprofile ausgewählter Gene des Fettsäurestoffwechsels in Abb. 7.6 bestätigt. Im Verlauf der Experimente zeichnete sich eine im Vergleich zu den übrigen Kulturen größere Schwankungsbreite der Expression von Genen des Fettsäurestoffwechsels in den Proben -N LL+C ab. Es konnte herausgestellt werden, dass die Expressionsvariation in Kulturen ohne zusätzliche CO_2 -Begasung niedriger als in Kulturen war, welche in Anwesenheit der Begasung mit CO_2 kultiviert wurden.

Im Folgenden wurde der Einfluss der Kultivierungsparameter auf die Expression von Genen des C- und N-Metabolismus untersucht. Die analysierten Transkripte des N-Metabolismus (Glutamatdehydrogenase (*GDH*), Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase (*GOGAT*), Glutamin-Synthetase (*GS*)) sind an der Ammoniumverwertung im Zuge der Glutamat- und Glutamin-Biosynthese während des GS-GOGAT-Zyklus beteiligt [Ding *et al.*, 2019]. Bei der Analyse von Transkripten aus der Glykolyse (*GAPDH*, *PGK*) und dem Citrat-Zyklus (Pyruvatdehydrogenase (*PDH*), Malatdehydrogenase (*MDH*)) wurden in Abhängigkeit von Lichtstress (HL) signifikant reduzierte Expressionslevel nachgewiesen (vgl. Abb. 3.28 Proben: „HL“ und „LL“, Abschnitt 3.3 Teil B). Es zeigte sich, dass die Expressionsmuster der Kulturen am ersten Tag vereinzelt signifikante Unterschiede in den Genen *GAPDH* und *GS* im Vergleich zu den Kontrollansätzen aufwiesen. Die Expression von *GAPDH* wurde im Vergleich zu den Kontrollansätzen in nahezu allen Kulturen (Ausnahme: -N LL+C, -N LL-C) signifikant vermindert, wohingegen die Expression von *GS* in den Kulturen -N LL+C signifikant anstieg (vgl. Abb. 3.28 -N LL+C in *GS*; alle Behandlungsregimes (Ausnahme: -N LL+C, -N LL-C) in *GAPDH*).

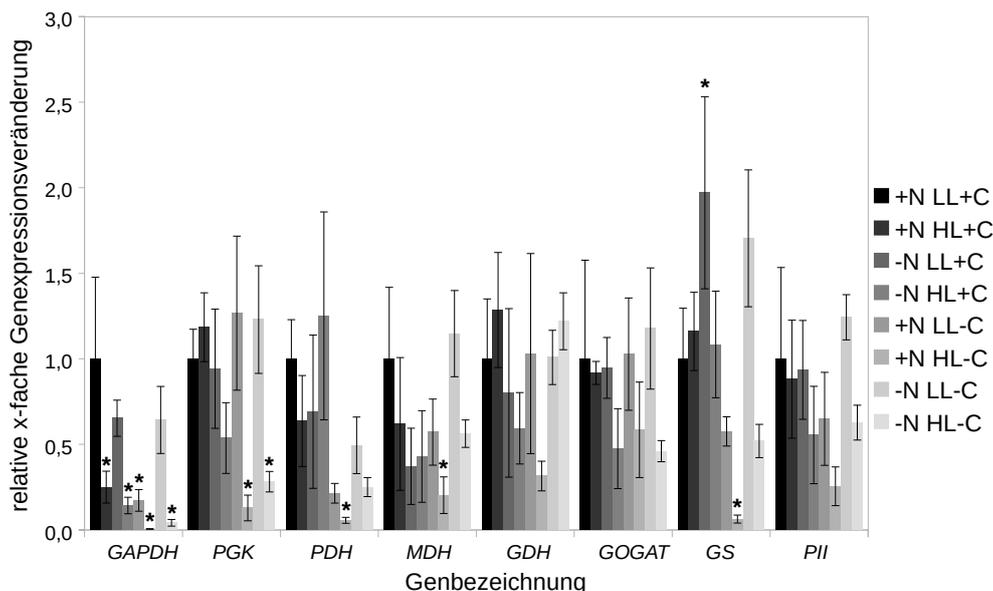


Abbildung 3.28: Expression ausgewählter Gene des C- und N-Metabolismus in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte des C- und N-Metabolismus (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 1 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.3.1 - 3.3.8 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Der Trend setzte sich fort und führte am dritten Tag zu einer signifikanten Reduktion der Expression von *GAPDH* in allen Kulturen (vgl. Abb. 7.7 Expression *GAPDH*, vgl. Abschnitt 3.3 Teil B). Weiterführende Analysen verwiesen auf eine signifikante Zunahme des Transkriptlevels von *GS* ab dem siebten Tag in den Kulturen -N HL+C (vgl. Abb. 7.8, -N HL+C in *GS*). Weiterhin zeichnete sich ab, dass Kulturen ohne CO_2 -Begasung eine signifikant verminderte Expression ausgewählter Gene des C- und N-Metabolismus aufwiesen. Die Effekte wurden temporär begrenzt und nur in einzelnen Proben („-C“) nachgewiesen und zeigten keinen systematischen Charakter (vgl. Abb. 7.7 -/+N HL C in *PDH*, *GOGAT*; Abb. 7.8 Proben: „-C“ in *GDH*; Abschnitt 3.3 Teil B). Die zusammenfassende Analyse der Expressionsvariationen in Abb. 7.9 konnte diese Beobachtungen bestätigen.

Ein grundlegendes Ziel der in Abschnitt 3.3 beschriebenen stoffwechselphysiologischen Analysen bestand darin, den Einfluss ausgewählter Kultivierungsparameter auf den Prozess der Photosynthese zu analysieren. Nachfolgend sollten anhand der Expressionslevel von Genen der Chlorophyll- und Photosynthese die molekularen Hintergründe der physiologischen Variationen untersucht werden. Die analysierten Transkripte mit der Bezeichnung *Light-independent protochlorophyllide reductase subunit B* (*CHLB*) und *Light-independent protochlorophyllide reductase subunit L* (*CHLL*) sind an der Biosynthese von Chlorophyll beteiligt. Die Transkripte *PSBD* und *PSBS* hingegen tragen zum Aufbau des PS II bzw. des Cytochrom- b_5f -Komplexes (*Cytochrome b559 subunit beta* (*PSBF*), *Cytochrome f* (*PETA*) und *Cytochrome b₆* (*PETB*)) bei und sind indirekt bzw. direkt an den plastidären Elektronenübertragungsmechanismen beteiligt.

Anhand der in Abb. 3.29 dargestellten Expressionsänderungen war es möglich, einen signifikanten Anstieg der relativen Transkriptabundanz von *CHLB* und *CHLL* in Abhängigkeit der Behandlungsregimes nachzuweisen. Darüber hinaus zeichnete sich ein signifikanter Rückgang in der Expression von *PSBS* in den Kulturen -N HL+C, +N HL-C und -N HL-C im Vergleich zu den Kontrollansätzen ab (vgl. Abb. 3.29 +N HL+C, -N LL-C in *CHLB*; +N HL+C in *CHLL* und -N HL+C, +N HL-C und -N HL-C in *PSBS*). Über den Versuchszeitraum konnte gezeigt werden, dass die Expression von *CHLB* und *CHLL* in Abhängigkeit von Lichtstress (HL), im Vergleich zu den unter nicht-induktiven Lichtbedingungen kultivierten Proben, vereinzelt signifikant erhöht war (vgl. Abb. 7.10 +N HL+C in *CHLB*; Abb. 7.11 und 3.30 +N HL-C in *CHLL*, Abschnitt 3.4 Teil B). Im Gegensatz dazu konnte bei der Analyse von *PSBS* gezeigt werden, dass die Expressionslevel in den bei Lichtstress (HL) kultivierten Proben signifikant geringer waren, als in den vergleichbaren Proben unter nicht-induktiven Lichtbedingungen (vgl. Abb. 7.10 +N HL-C bzw. -N HL-C mit +N LL-C bzw. -N LL-C, Abschnitt 3.4 Teil B).

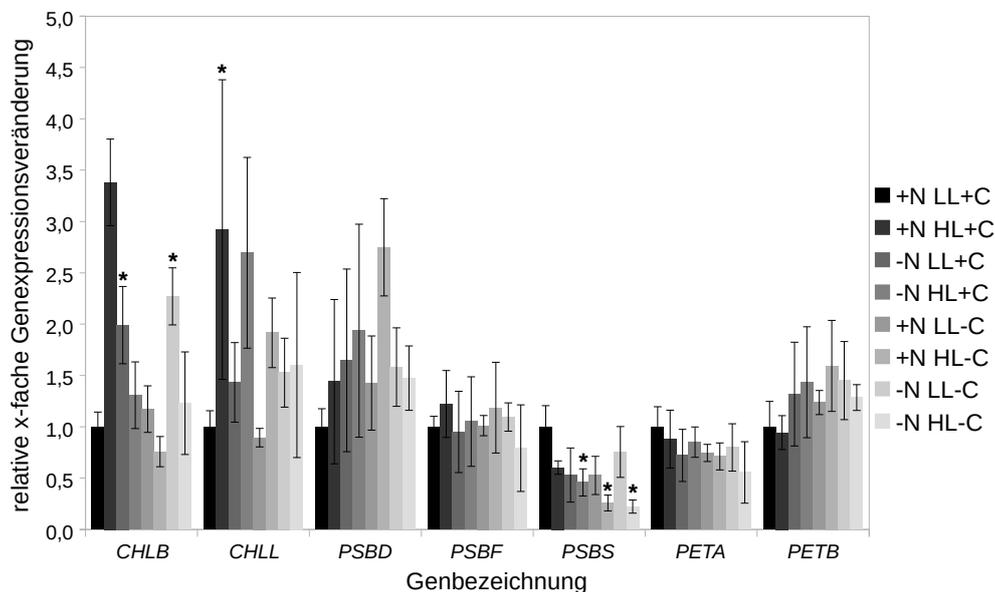


Abbildung 3.29: Expression ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Chlorophyll- und Photosynthese (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 1 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellem ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.4.1 - 3.4.7 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Im Verlauf der Kultivierung wurde eine Zunahme der Expression von *PSBD* und *PETB* in den Kulturen +N HL-C nachgewiesen, welche am zehnten Tag in einer ca. 6-fachen Erhöhung dieser gegenüber der Kontrollreaktion resultierte (vgl. Abb. 3.30 +N HL-C in *PSBD* und *PETB*). Die Ergebnisse am zehnten Tag wiesen darüber hinaus darauf hin, dass die Expression der analysierten Gene in den Zellen erhöht war, welche ohne zusätzliche CO_2 -Begasung kultiviert wurden (vgl. Abb. 3.30 +N LL-C in *PSBD*, +N HL-C in *PSBD* und *PETB*, -N HL-C in *PETA* und *PETB*, Proben: „-C“ in *PSBF*).

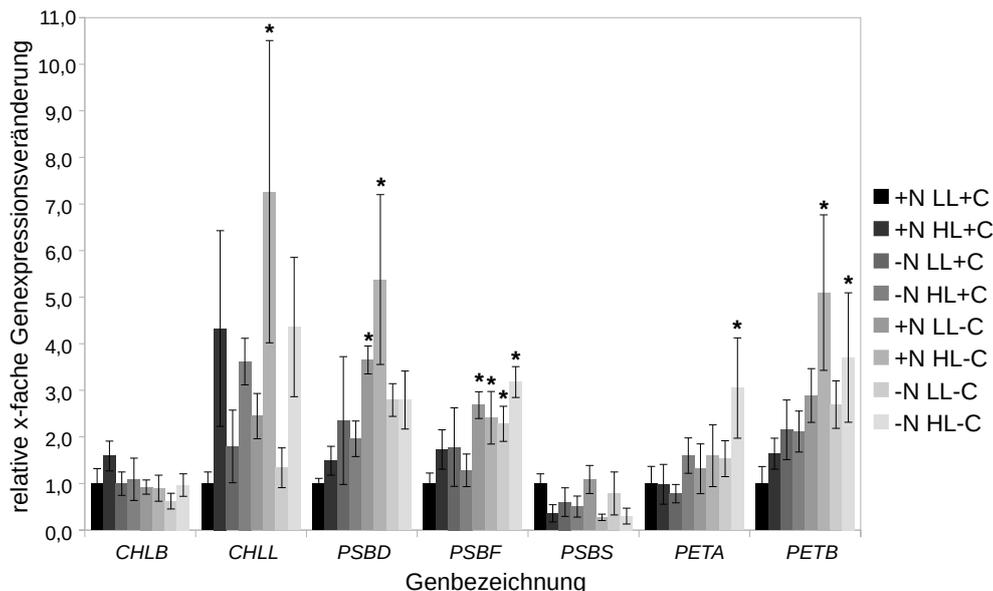


Abbildung 3.30: Expression ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (10 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Chlorophyll- und Photosynthese (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 10 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.4.1 - 3.4.7 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Im Rahmen der Auswertung der ermittelten Expressionsprofile konnte eine zunehmende Variation der normalisierten relativen Expressionslevel der Kulturen im zeitlichen Verlauf der Kultivierung nachgewiesen werden, welche keine zusätzliche CO_2 -Begasung erhielten (vgl. Abb. 3.31). Die Expressionsunterschiede stiegen in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer kontinuierlich an und erreichten am zehnten Tag ein Maximum. Des Weiteren wurde eine gesteigerte Expressionsvariation in den Kulturen ohne zusätzliche CO_2 -Begasung in Abhängigkeit induktiver Lichtbedingungen nachgewiesen (vgl. Abb. 3.31 -/+N HL-C mit -/+N LL-C). Die Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse, welche bei der Analyse unterschiedlicher Pigmentkonzentrationen und photosynthetischer Aktivitätsparameter im Abschnitt 3.2.3 und 3.3 ermittelt werden konnten. Zellen ohne zusätzliche CO_2 -Begasung wiesen individuelle Regulations- und Synthesemuster in Bezug auf die photochemische Quantenausbeute, die SBR sowie der intrazellulären Chl-Konzentrationen auf, welche ebenfalls anhand der Expressionsprofile ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese nachgewiesen wurden. Neben der Analyse der photosynthetischen Aktivität erfolgte im Abschnitt 3.3 die Auswertung der NPQ-Aktivität von *H. pluvialis*-Kulturen. Der NPQ kann als zelluläre Antwort auf ungünstige Umgebungsbedingungen interpretiert werden und gibt an, welcher Anteil von eingestrahelter Lichtenergie nicht im Zuge photochemischer Prozesse umgesetzt werden kann. Es existieren weitere Möglichkeiten der zellulären Stressantwort, welche auf molekularer Ebene untersucht wurden.

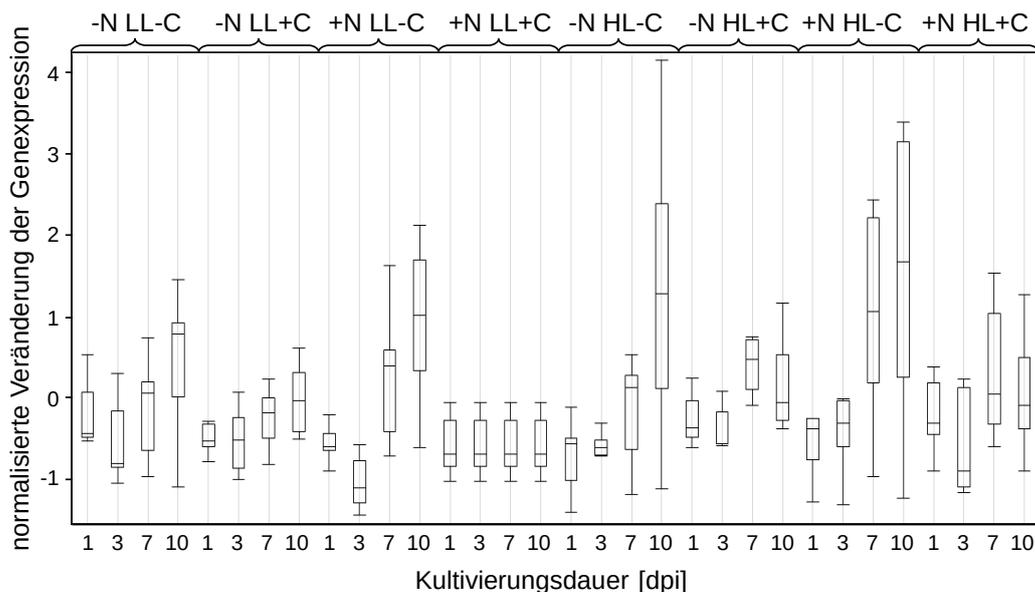


Abbildung 3.31: Expressionsprofile ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi)

Häufigkeitsverteilung normalisierter Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die mit Hilfe eines Z-Scorings normalisierten ddC_i-Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Veränderung der Gesamtheit relevanter Transkripte der Chlorophyll- und Photosynthese (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf unabhängiger Experimentalreihen (1 - 10 dpi). Aus den gemittelten ddC_i-Werten der Transkripte wurde eine Häufigkeitsverteilung erstellt und für die Visualisierung der dargestellten Box-Plots verwendet (n = 3).

In folgenden Experimenten wurde die Expression zweier Gene des Xanthophyll-Zyklus (Violaxanthin-Deepoxidase (*VDE*), Zeaxanthin-Epoxidase (*ZEP*)), zweier Varianten des Gens *PTOX* (*PTOX1/2*) sowie von *TUBA* und *TEF2* untersucht. Am ersten Tag wurde ein signifikanter Anstieg der Expression von *PTOX2* in den Kulturen +N HL+C und -N HL+C verglichen zu den Kontrollansätzen nachgewiesen (vgl. Abb. 3.32 +N HL+C und -N HL+C in *PTOX2*). Das Expressionslevel blieb bis zum siebten Tag erhalten und wies hierbei einen bis zu vierfachen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollansätzen auf (vgl. Abb. 7.12, 7.13 +N HL+C und -N HL+C in *PTOX2*). Im direkten Vergleich der Proben -N LL-C und -N HL-C konnte am ersten Tag eine signifikant verminderte Expression von *ZEP* in den bei Lichtstress kultivierten Proben (-N HL-C) nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.32 -N LL-C in *ZEP*, Abschnitt 3.5 Teil B). Die Analysen der Expression von *VDE* wiesen hingegen auf eine signifikante Reduktion der relativen Transkriptabundanz in mehreren Kulturen hin (vgl. Abb. 3.32 -N HL+C, +N LL-C, +N HL-C, -N HL-C in *VDE*, Abschnitt 3.5 Teil B). Die Zellen der Kulturen +N HL-C kennzeichneten sich weiterhin durch eine verminderte Expression von *TUBA*, welche über den gesamten Zeitraum der Analysen erhalten blieb und ab dem dritten Tag signifikante Unterschiede zur Kontrolle (+N LL+C) aufwies (vgl. Abb. 3.32, 7.12 - 7.14 +N HL-C in *TUBA*). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression von *TUBA* ab dem dritten bzw. siebten Tag in allen Kulturen (mit Ausnahme -N LL-C) signifikant reduziert wurde (vgl. Abb. 7.12 - 7.14 *TUBA*). Die Ergebnisse in Abb. 7.12 wiesen ebenfalls auf eine signifikant erhöhte Expression von *PTOX1* in den Zellen der Behandlung +N LL-C im weiteren Verlauf der Experimente hin. Zusammenfassend konnten bei den Analysen von Transkripten der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse keine einheitlichen Expressionsmuster in Abhängigkeit der Kultivierungsparameter identifiziert werden.

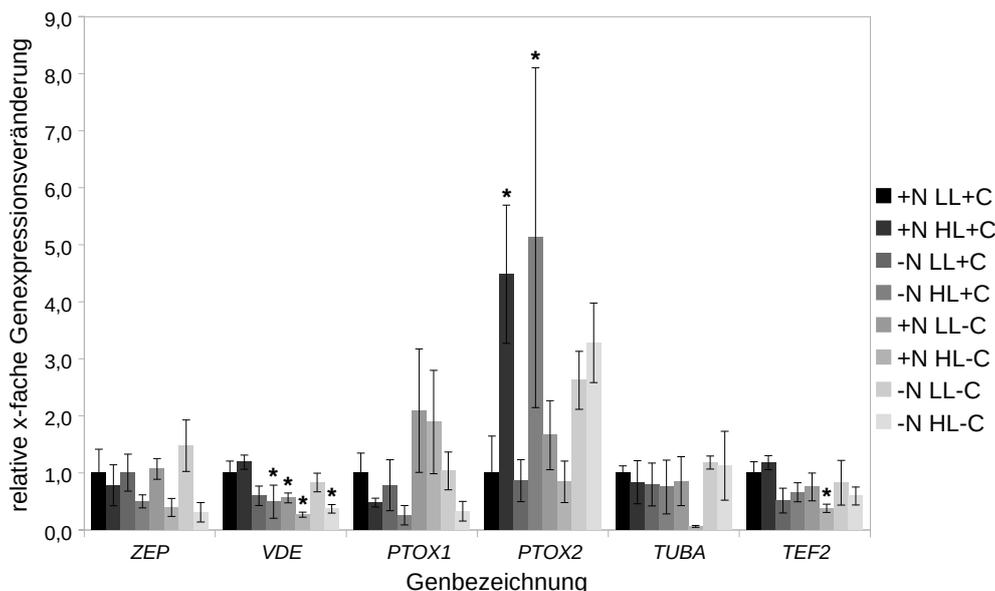


Abbildung 3.32: Expression ausgewählter Gene der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanzen erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 1 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.5.1 - 3.5.6 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

Die Expressionsanalysen von Genen relevanter metabolischer Kategorien ermöglichten es, einen Einblick in molekulare Veränderungen von *H. pluvialis* zu erlangen, welche anhand der Heatmap in Abb. 3.33 zusammenfassend dargestellt werden. Für die Auswertung der Daten werden im Folgenden mitunter signifikante Unterschiede beschrieben, welche auf den Ergebnissen der Analysen in Kapitel 3 des statistischen Anhangs (Teil B) basieren. Der im unteren Teil der Heatmap hervorgehobene Cluster 1 beinhaltete Gene, welche den finalen Schritten der Ax-Biosynthese, des Fettsäurestoffwechsels und des C-Metabolismus zugeordnet werden konnten. Bei der Analyse des Clusters wurde eine, im Vergleich zur Kontrolle, erhöhte Expression der Gene in den Kulturen -N LL+C, -N HL+C und +N LL-C und eine verminderte Expression in den Proben +N HL-C, -N LL-C und -N HL-C nachgewiesen. Die Zellen der Behandlung +N HL+C wiesen hingegen eine erhöhte Expression von Genen der Cluster 2 und 3 auf, welche überwiegend Transkripte des N-Metabolismus, der Stressantwort sowie initialen Schritten der Carotinoid-Biosynthese (Cluster 2) bzw. der Chlorophyll- und Photosynthese (Cluster 3) beinhalteten. Eine erhöhte Expression der Gene des Clusters 2 konnte ebenfalls in den Ansätzen -N HL+C beobachtet werden. Die Analysen ergaben, dass die Unterschiede in Bezug auf die Expression von Genen unterschiedlicher metabolischer Kategorien insbesondere auf die Regulationsmuster in den Ax-produzierenden Kulturen zurückgeführt werden konnten. Die Ergebnisse bestätigen darüber hinaus die Beobachtungen aus Abschnitt 3.2.3 und zeigen, dass eine Optimierung der Ax-Biosynthese durch die Kombination induktiver Kultivierungsparameter (Nitratmangel, Lichtstress (HL)) auf transkriptioneller Ebene induziert werden kann.

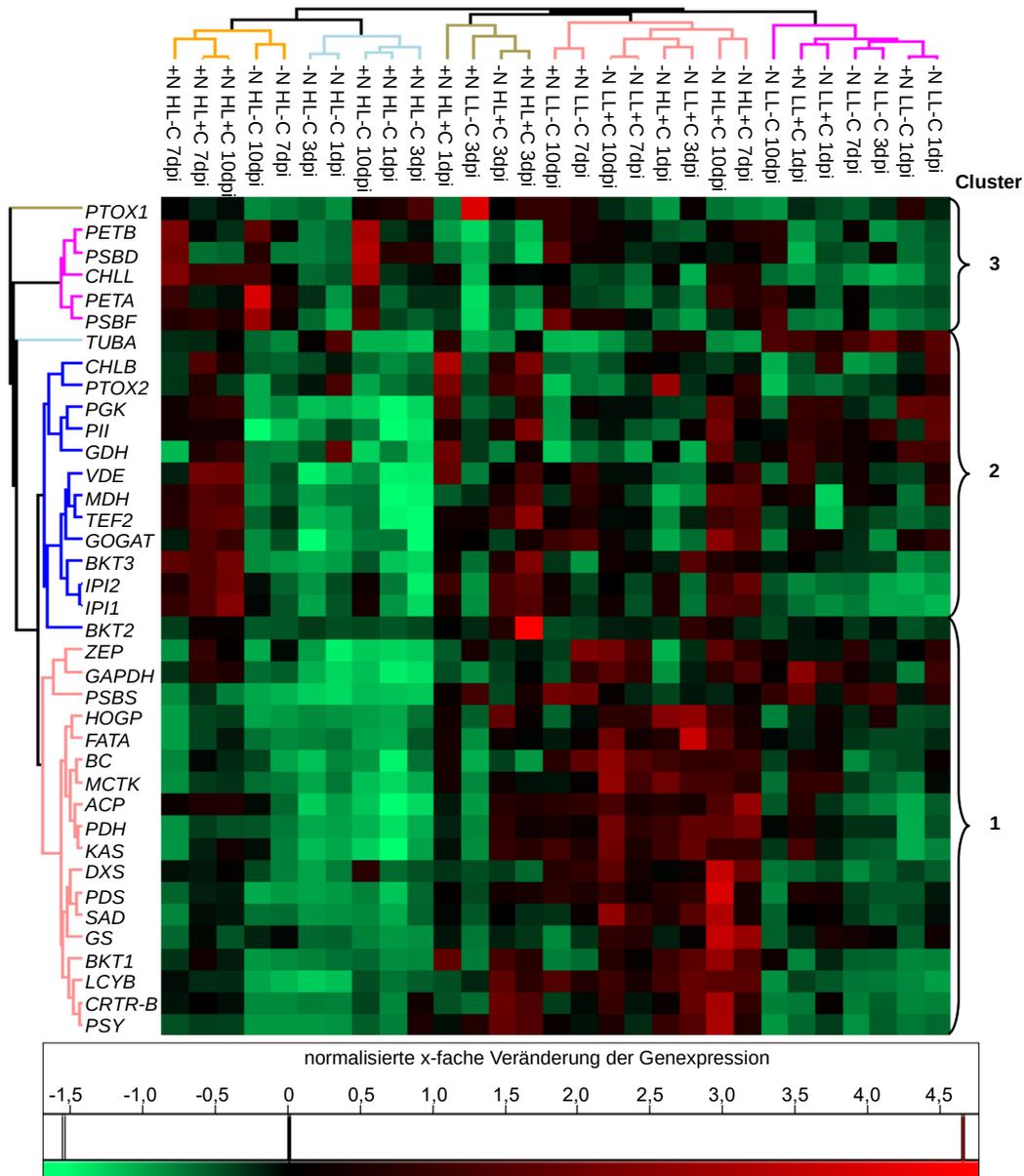


Abbildung 3.33: Genexpression von *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi)

Normalisierte Mengenverhältnisse ausgewählter Transkripte unterschiedlicher metabolischer Kategorien von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Transkriptmengen verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte unterschiedlicher metabolischer Kategorien (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in 32 Proben und in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im Verlauf unabhängiger Experimentalreihen (1 - 10 dpi). Die Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede erfolgte in Bezug zu den Kontrollansätzen +N LL+C am jeweiligen Tag des Experimentes. Das für die Erstellung der Heatmap durchgeführte Clustering erfolgte in den Behandlungsregimes auf Grundlage des Pearson- und in den Transkripten auf Grundlage des Spearman-Algorithmus. Die Daten zeigen die Z-Score normalisierten Mittelwerte relativer Transkriptmengen aus drei BR. Farbverläufe repräsentieren die Dimensionen normalisierter Transkriptabundanz einer Datenreihe gemäß der Skala.

Zusätzlich ergaben sich Fragestellungen, welche unter Verwendung gerichteter molekularbiologischer Methoden nicht weiterführend untersucht wurden. In nachfolgenden Experimenten wurde eine ungerichtete Analyse des Proteoms definierter zellulärer Zustände von *H. pluvialis* durchgeführt. Die Daten der Proteomics-Experimente wurden mit den Ergebnissen der qPCR-Analysen gegenübergestellt, sodass die Effekte der Kultivierungsparameter auf Transkriptom- und Proteom-Ebene verglichen werden konnten. Auf Grundlage der Proteom-Daten wurden neue Aspekte hinsichtlich molekularer Änderungen und Regulationsmechanismen der Zellen identifiziert und im folgenden Abschnitt erläutert.

3.5 Proteomics

Ungerichtete Proteom-Analysen verfolgen das Ziel, die Gesamtheit der sich ereignenden zellulären Veränderung von Proteinen zu detektieren und auszuwerten. Die in Abschnitt 3.5 dargestellten Ergebnisse basieren auf einer ungerichteten Analyse des Proteoms von *H. pluvialis* in Abhängigkeit definierter Kultivierungsparameter. Die Rohdaten der Experimente sind den Tabellen in Teil C des elektronischen Anhangs zu entnehmen. Im Rahmen der Experimente wurden die Kulturen +N HL+C, -N HL+C und +N LL+C untersucht. Diese kennzeichneten sich einerseits durch eine variable Expression von Genen unterschiedlicher metabolischer Kategorien und repräsentierten darüber hinaus drei zelluläre Zustände der Mikroalge, welche durch morphologische Eigenschaften unterschieden werden können. Auf Grundlage eines Datenbankabgleichs konnten in den generierten Proteom-Datensätzen der zellulären Zustände zwischen 3831 - 4763 Proteine von *H. pluvialis* identifiziert werden. Für die weiterführende Auswertung der identifizierten Proteine wurden diese gemäß der Angaben in Abschnitt 2.2.21.5 selektiert und die Verteilung zunächst in einem Mengendiagramm dargestellt (vgl. Abb. 7.15). Das Diagramm zeigt die Gesamtheit der vorgefilterten Proteine und ermöglichte es, die Überschneidungsmengen zwischen den zellulären Zuständen quantitativ bewerten zu können. Weiterführend wurden diese unter Berücksichtigung zusätzlicher Kriterien gefiltert. Um eine qualitative Absicherung der Daten zu gewährleisten wurden nur Proteine analysiert, welche in mind. zwei BR nachweisbar waren.

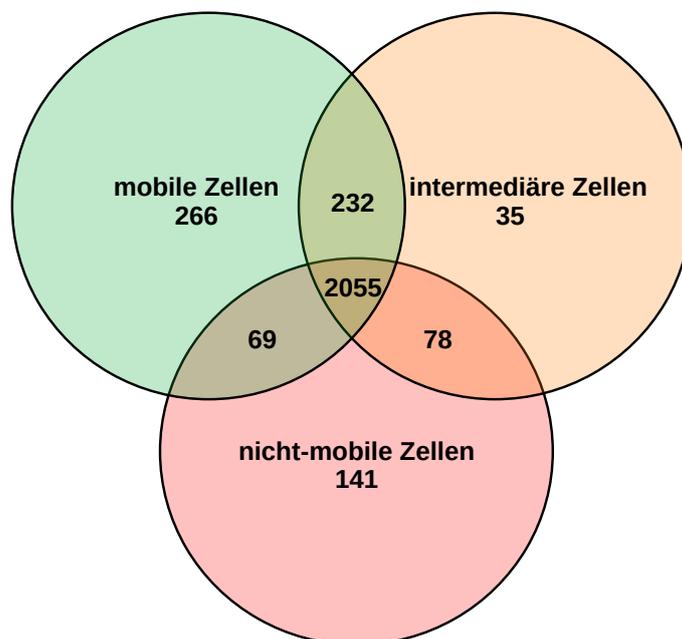


Abbildung 3.34: Mengenverteilung von Proteinen in Schnittmengen zellulärer Zustände von *H. pluvialis*

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Überschneidungsmengen geben die Anzahl identischer Proteine an, welche unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert wurden. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten.

Auf Grundlage der Daten wurde ein Mengendiagramm generiert und in Abb. 3.34 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass der größte Anteil der Proteine in der Überschneidungsmenge aller Zustände von *H. pluvialis* nachweisbar war (2055 Proteine). In den Kulturen +N LL+C, welche überwiegend mobile Zellen von *H. pluvialis* beinhalten, wurde der größte Anteil stadienspezifischer Proteine identifiziert (266 Proteine). Die Proben +N HL+C wiesen hingegen nur 35 stadienspezifische Proteine auf.

Die Zellen, welche in Abhängigkeit des Parametersatzes +N HL+C kultiviert wurden, werden im Folgenden als: „intermediärer Phänotyp“ bezeichnet. In den Kulturen konnten sowohl mobile als auch nicht-mobile *H. pluvialis*-Zellen mit einer heterogenen Ax-Akkumulationsrate nachgewiesen werden. Die Zellen, welche in Abhängigkeit der induktiven Parameter des Lichtstress und des Nitratmangels im Nährmedium bei kontinuierlicher CO₂-Begasung kultiviert wurden (-N HL+C), repräsentierten einen nicht-mobilen Phänotyp mit erhöhter Ax-Akkumulationsrate. In den genannten Kulturen konnten unter Berücksichtigung der Filterkriterien 141 stadienspezifische Proteine nachgewiesen werden. Weitere identische Proteine wurden in den Schnittmengen zwischen zwei zellulären Zuständen identifiziert. Hierbei zeigte sich, dass der größte Anteil an identischen Proteinen in der Überschneidungsmenge mobiler und intermediärer Zellen existierte (232), während die geringste Anzahl identischer Proteine zwischen den Kulturen mobiler und nicht-mobiler Zellen identifiziert wurde (69 Proteine). Für weiterführende Analysen wurden die Proteine aus den unterschiedlichen Schnittmengen in definierte Proteinkategorien eingeteilt. Zum Zeitpunkt der Analysen konnte kein geeignetes Programm ermittelt werden, welches die funktionelle Zuordnung von Proteinrohdaten aus *H. pluvialis* ermöglichte. Es erfolgte eine manuelle Zuordnung der eindeutig identifizierten Proteine in folgende metabolische Proteinkategorien: zelluläre Regulationsprozesse, Proteinhomöostase, Signal- und Transportprozesse, Zytoskelett und Organellstruktur, Metabolit-Biosynthese und -Modifikation, Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsel, Chlorophyll- und Photosynthese, Carotinoid-Biosynthese, Stressantwort und Energiemetabolismus. Es wurden zwei weitere Kategorien erstellt, welche nicht eindeutig identifizierbare Proteine beinhalteten (Domänen-beinhaltende Proteine und uncharakterisierte Proteine). Basierend auf den Daten konnten die Schnittmengen von Proteinen, in Abhängigkeit der jeweiligen zellulären Zustände von *H. pluvialis*, im Rahmen folgender Auswertungen genauer charakterisiert werden.

3.5.1 Nicht-stadienspezifische Proteine drei zellulärer Zustände von *H. pluvialis*

Anhand des in Abb. 3.34 dargestellten Mengendiagramms war es möglich, Schnittmengen von Proteinen individueller zellulärer Zustände von *H. pluvialis* abzugrenzen. Zunächst erfolgte die Charakterisierung der Schnittmenge jener Proteine, welche in jedem der drei Zustände von *H. pluvialis* nachgewiesen werden konnten (2055 Proteine). Nach der Kategorisierung der Proteine wurden die ermittelten Datenmengen in einer Häufigkeitsverteilung visualisiert (vgl. Abb. 3.35). Die Analyse der Häufigkeitsverteilung zeigte, dass der überwiegende Anteil der Proteine den Kategorien uncharakterisierter und Domänen-beinhaltender Proteine zugeordnet wurde. Darüber hinaus zeichnete sich ab, dass ca. ein Viertel der Proteingesamtheit an zellulären Regulations-, Signal- und Transportprozessen sowie der Proteinhomöostase beteiligt sind. Es war hervorzuheben, dass nur 2,3 % identischer Proteine der Stressantwort und Carotinoid-Biosynthese angehörten, wohingegen 10,4 % der Chlorophyll- und Photosynthese sowie dem Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsel zugeordnet werden konnten. Um eine quantitative Abschätzung der Proteine zu gewährleisten, wurde ein relatives Quantifizierungsmaß (PQI) berechnet (Abschnitt 2.2.21.5). Weiterführend sollte anhand stadienspezifischer PQI identischer Proteine die Proteinabundanz in den Zelltypen unterschieden werden. Hierzu wurde die Veränderung der PQI eines Proteins zwischen den Zuständen untersucht und als prozentuale Änderungsrate definiert (dPQI).

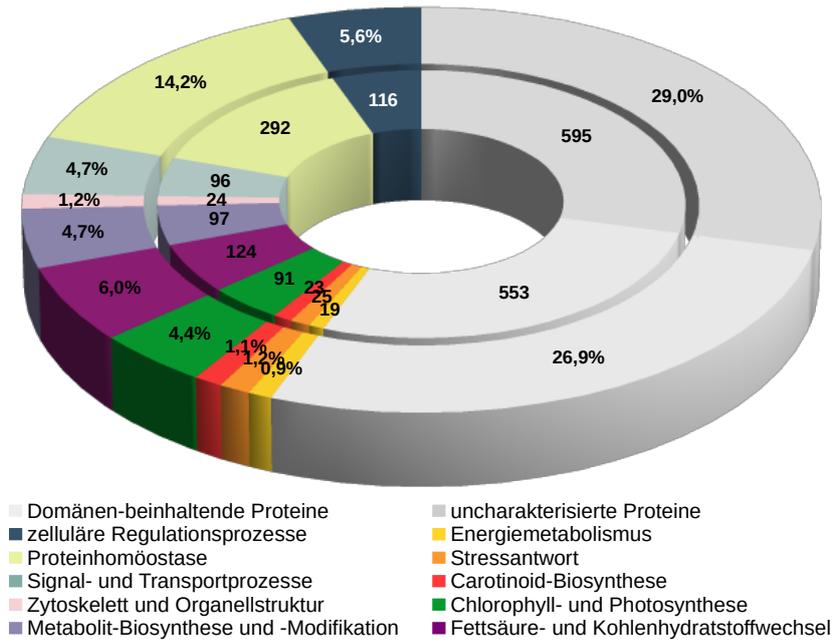


Abbildung 3.35: Häufigkeitsverteilung identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von *H. pluvialis* (2055 Proteine) in metabolischen Kategorien

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge in der Verteilung wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und metabolischen Kategorien zugeordnet. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten.

Abb. 3.36 zeigt die Häufigkeitsverteilung der dPQI der im Vorfeld analysierten Proteingesamtheit identischer Proteine von *H. pluvialis* (2055 Proteine). Anhand der Ergebnisse in Abb. 3.36 war zu erkennen, dass ca. 75 % der Proteine eine Änderungsrate von weniger als 50 % zueinander aufwiesen. Weiterhin wurde gezeigt, dass weniger als 5 % der Proteine, in Abhängigkeit der zellulären Subformen, einen dPQI > 80 % aufwiesen.

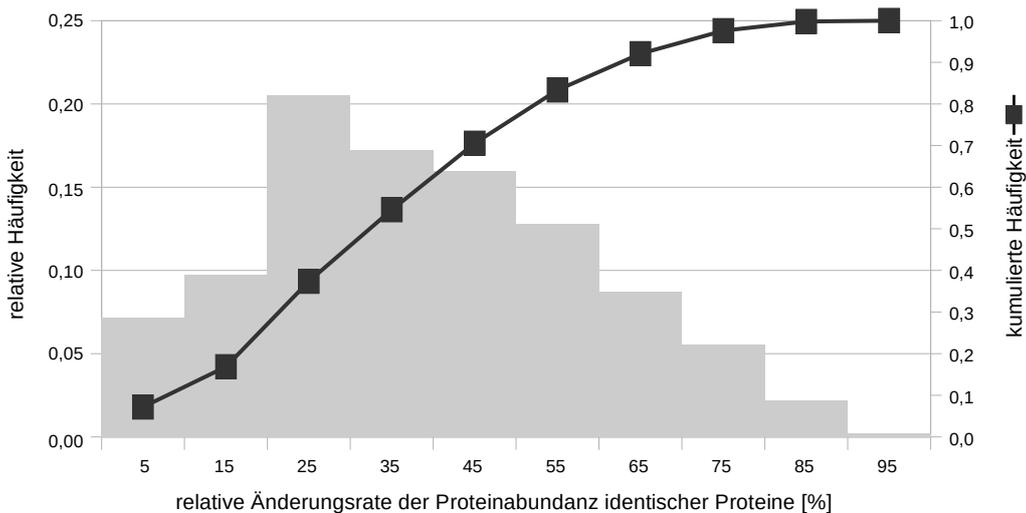


Abbildung 3.36: Häufigkeitsverteilung von dPQI-Kategorien identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von *H. pluvialis* (2055 Proteine)

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse dreier BR mobiler, intermediärer und nicht-mobiler Kulturen von *H. pluvialis*. Proteineinträge wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und hinsichtlich peptidspezifischer dPQI kategorisiert. Balkendiagramme repräsentieren die relative Häufigkeit von dPQI-Kategorien, welche aus den Abundanzinformationen der Proteine zwischen den zellulären Zuständen ermittelt wurden. Die schwarze Kurve zeigt die kumulierte Häufigkeit der dPQI-Kategorien. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten.

Ein Hauptziel der Experimente bestand darin, Regulationsmuster von Stoffwechselaktivitäten der zellulären Zustände von *H. pluvialis* zu identifizieren. Aufgrund der Zielstellung wurden weiterführend nur Proteine analysiert, welche eine Änderungsrate von über 50 % ($dPQI > 50\%$) aufgewiesen haben. Die Gesamtheit identischer Proteine der zellulären Zustände wurde von 2055 auf 598 reduziert (vgl. Abb. 7.16). Die Verteilung identischer Proteine mit einer $dPQI > 50\%$ wurde hinsichtlich der kategorischen Zugehörigkeit dieser untersucht und die Ergebnisse in Abb. 3.37 dargestellt.

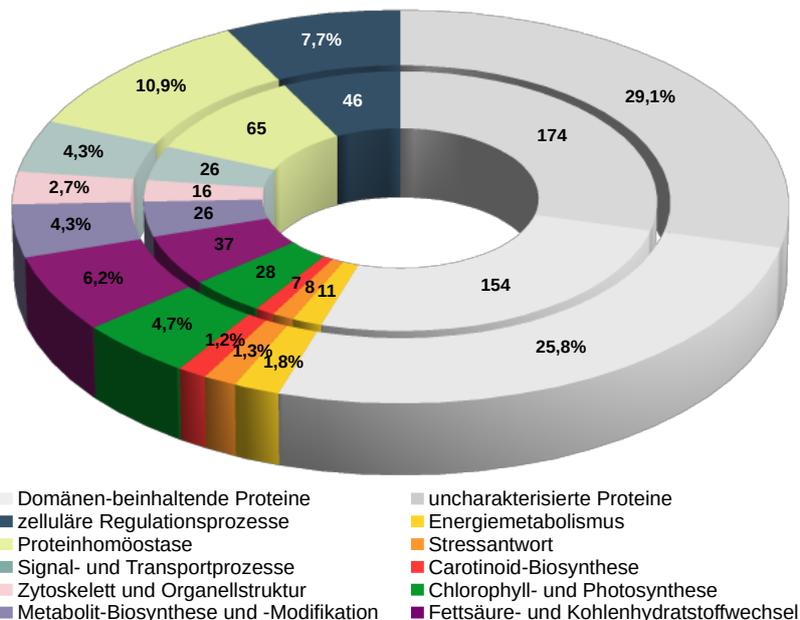


Abbildung 3.37: Häufigkeitsverteilung identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von *H. pluvialis* (598 Proteine)

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge in der Verteilung wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und metabolischen Kategorien zugeordnet. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten und einen $dPQI > 50\%$ zwischen den Zuständen aufwiesen.

Die Häufigkeitsverteilung in Abb. 3.37 zeigte, dass der Hauptteil der Proteine (ca. 56 %) nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. Die prozentualen Anteile der Proteine in den metabolischen Kategorien wiesen ein ähnliches Verteilungsmuster zu jenem auf, welches in Abb. 3.35 gezeigt wurde. Die aus der Filterung resultierende Reduktion der Datenmatrix führte somit zu einer gleichmäßigen Verminderung der Proteine in der Gesamtheit der metabolischen Kategorien. Weiterführend sollte auf Grundlage der Datenmatrix eine vergleichende Analyse der Proteinabundanz zwischen den zellulären Zuständen durchgeführt werden. Die resultierenden Abundanzprofile der zellulären Zustände wurden in einer Heatmap (vgl. Abb. 3.38) dargestellt. Im Rahmen der Analyse wurden drei Cluster abgegrenzt, welche Proteine mit einer erhöhten Abundanz innerhalb eines definierten zellulären Subtyps aufwiesen und weiterführend hinsichtlich der enthaltenen Proteine (resp. Proteinkategorien) untersucht wurden. Die Analyse der Heatmap ergab, dass der größte Anteil der Proteine mit einem $dPQI > 50\%$ in den mobilen Zellen von *H. pluvialis* nachgewiesen werden konnte (355 Proteine). Im Cluster der intermediären und nicht-mobilen Zellen wurden hingegen 43 bzw. 200 Proteine identifiziert. Um die Verteilung der Proteine in den Clustern zu analysieren, wurden diese extrahiert und erneut gemäß der zugehörigen biologischen Funktionen kategorisiert (vgl. Abb. 3.39).

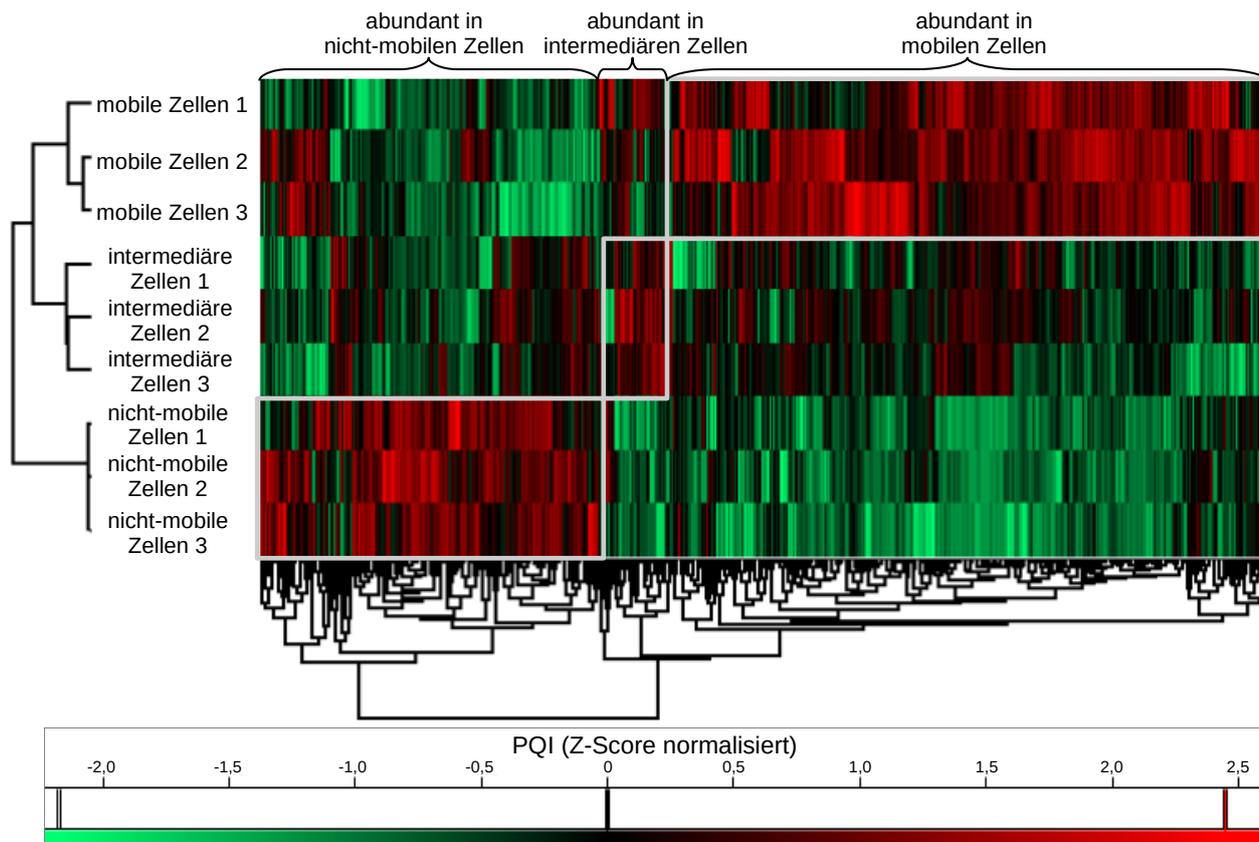


Abbildung 3.38: Proteinabundanzen identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von *H. pluvialis* (598 Proteine)

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und hinsichtlich peptidspezifischer dPQI kategorisiert. Es wurden Proteine für die Erstellung der Heatmap verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten und einen dPQI > 50 % zwischen den Zuständen aufwiesen. Die Daten repräsentieren die Z-Score normalisierten Mittelwerte des PQI der BR. Das für die Erstellung der Heatmap durchgeführte Clustering erfolgte in den zellulären Zuständen auf Grundlage des Pearson- und in den Proteinen auf Grundlage des Spearman-Algorithmus. Die Farbverläufe repräsentieren die Dimensionen des normalisierten PQI einer Datenreihe gemäß der Skala.

Im Cluster der nicht-mobilen Zellen wurde der höchste prozentuale Anteil an unbekanntem Proteinen nachgewiesen (ca. 64 %). Darüber hinaus zeichnete sich ab, dass die Anteile der Proteine, welche den metabolischen Kategorien der zellulären Regulationsprozesse und Proteinhomeostase zugeordnet wurden, innerhalb der Cluster eine ähnliche Verteilung aufgewiesen haben (vgl. Abb. 3.39). In den mobilen Zellen wurde ein erheblicher Anteil an abundanten Proteinen nachgewiesen, welche der Chlorophyll- und Photosynthese zugeordnet werden konnte. Proteine aus der metabolischen Kategorie der Carotinoid-Biosynthese konnten ausschließlich in mobilen und nicht-mobilen Zellen mit einer erhöhten Abundanz nachgewiesen werden. Bei der Analyse der prozentualen Proteinverteilung in den Clustern musste berücksichtigt werden, dass diese eine unterschiedliche Anzahl von Rohdaten beinhalteten, weshalb die prozentualen Verteilungen keinen absoluten quantitativen Vergleich der zu einer Kategorie gehörigen Proteine zuließen. Anhand der Analysen konnte ein Einblick in die molekularen Prozesse, unabhängig vom zellulären Zustand von *H. pluvialis* erlangt werden. Es wurde gezeigt, dass die analysierte Schnittmenge, neben nicht eindeutig identifizierbaren Proteinen (ca. 56 %), ebenfalls zu ca. einem Viertel durch Proteine der metabolischen Kategorien zellulärer Regulationsprozesse, der Proteinhomeostase sowie Signal- und Transportprozesse definiert wurde (vgl. Abb. 3.39).

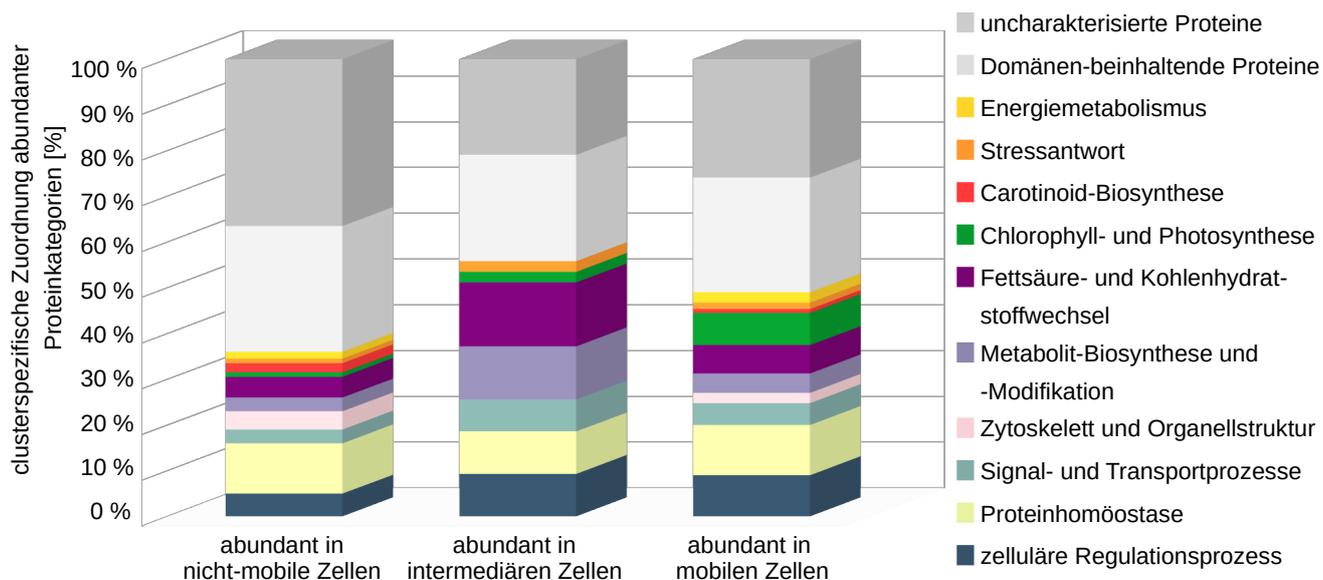


Abbildung 3.39: Prozentuale Verteilung identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von *H. pluvialis* (598 Proteine) mit Angabe der Abundanzlevel in metabolischen Kategorien

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und metabolischen Kategorien zugeordnet. Datenbalken repräsentieren die Menge abundanter Proteine in den zellulären Zuständen. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten und einen dPQI > 50 % zwischen den Zuständen aufwiesen.

Um weiterführende Aussagen über die resultierenden Veränderungen des Proteoms von *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen erhalten zu können, sollten im Folgenden die Schnittmengen von Proteinen aus zwei zellulären Zuständen analysiert werden.

3.5.2 Stadienspezifische Proteine in der Schnittmenge zweier zellulärer Zustände von *H. pluvialis*

Das Ziel folgender Analysen bestand darin, Proteine zu identifizieren, welche in Abhängigkeit definierter Kultivierungsbedingungen und den resultierenden Anpassungsreaktionen gebildet wurden. Die Ergebnisse in Abb. 3.40 basieren auf den Datenmatrizes, welche in Abb. 3.34 gezeigt wurden. Es wurde gezeigt, dass 62,3 % - 76,9 % der Proteine in den Überschneidungsmengen nicht eindeutig identifiziert werden konnten (vgl. Abb. 3.40 Anteil Domänen-beinhaltende und uncharakterisierte Proteine). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass in den Schnittmengen der Zustände in keinem Fall Proteine aller Kategorien zugeordnet wurden. Proteine aus der Kategorie der Stressantwort wurden ausschließlich in intermediären und nicht-mobilen Zellen nachgewiesen, wohingegen Proteine der Carotinoid-Biosynthese nur in mobilen und intermediären Zellen identifiziert wurden. Analog zu den Ergebnissen aus Abschnitt 3.5.1 wurde in der Schnittmenge mobiler und intermediärer sowie mobiler und nicht-mobiler Zellen herausgestellt, dass ca. ein Viertel der Proteine den Kategorien zelluläre Regulationsprozesse, Proteinhomeostase sowie Signal- und Transportprozesse angehörten. Der Anteil in der Überschneidungsmenge mobiler und intermediärer Zellen betrug 6,4 %. Es zeichnete sich ab, dass in jeder der Überschneidungsmengen 5,7 % - 7,7 % der Proteine der Chlorophyll- und Photosynthese bzw. dem Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsel angehörten. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass in Abhängigkeit der Strategien zur Kultivierung von *H. pluvialis* Veränderungen in den Proteinspektren der Zellen resultierten.

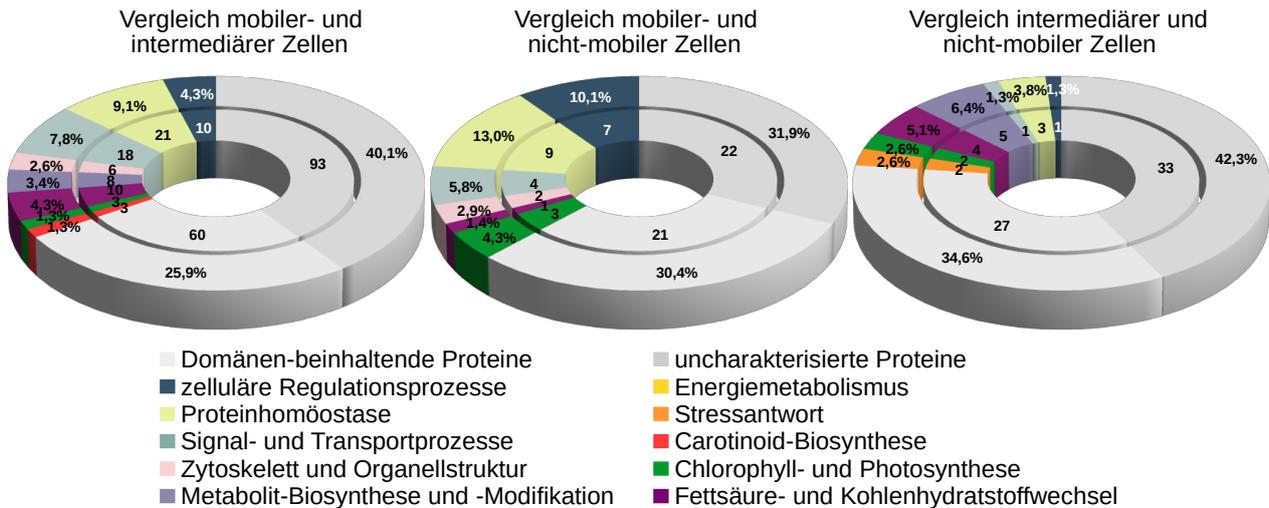


Abbildung 3.40: Häufigkeitsverteilung identischer Proteine in Schnittmengen zweier zellulärer Zustände von *H. pluvialis* in metabolischen Kategorien

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge in der Verteilungen wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und metabolischen Kategorien zugeordnet. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten.

Weiterführend wurden die Regulationsmuster der unterschiedlichen Proteine anhand der Proteinabundanzen untersucht (vgl. Abb. 3.41). Die Ergebnisse in Abb. 3.41 zeigten, dass in der Überschneidungsmenge mobiler und nicht-mobiler Zellen ein geringerer Anteil unbekannter Proteine im Vergleich zu den in Abb. 3.40 ermittelten Ergebnissen existierte. Im Gegensatz dazu wurden in den weiteren in Abb. 3.41 visualisierten Verteilungen vergleichbare Anteile unbekannter Proteine ermittelt (vgl. Abb. 3.40 und 3.41). Weiterhin konnten spezifische Proteinkategorien in den Überschneidungsmengen identifiziert werden. Mobile und intermediäre Zellen kennzeichneten sich bspw. durch Proteine aus der Carotinoid-Biosynthese.

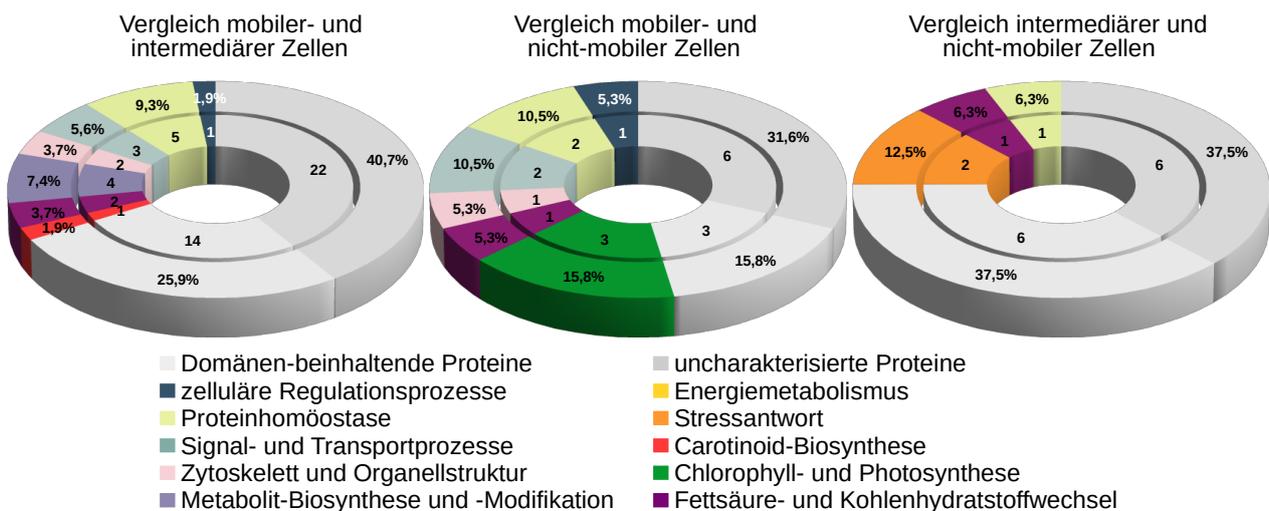


Abbildung 3.41: Häufigkeitsverteilung identischer Proteine in Schnittmengen zweier zellulärer Zustände von *H. pluvialis* in metabolischen Kategorien

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge in der Verteilungen wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und metabolischen Kategorien zugeordnet. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten und einen dPQI > 50 % zwischen den Zuständen aufwiesen.

In mobilen und nicht-mobilen Zellen wurden Proteine der Chlorophyll- und Photosynthese identifiziert, während in intermediären und nicht-mobilen Zellen Proteine der Stressantwort nachgewiesen wurden. Proteine der Kategorien zelluläre Regulationsprozesse, Proteinhomeostase sowie Signal- und Transportprozesse zeigten verglichen zu den vorherigen Analysen ähnliche Anteile. Weiterführend sollte die Abundanz der Proteine in Abhängigkeit der Kultivierungsparameter analysiert werden (vgl. Abb. 3.42) .

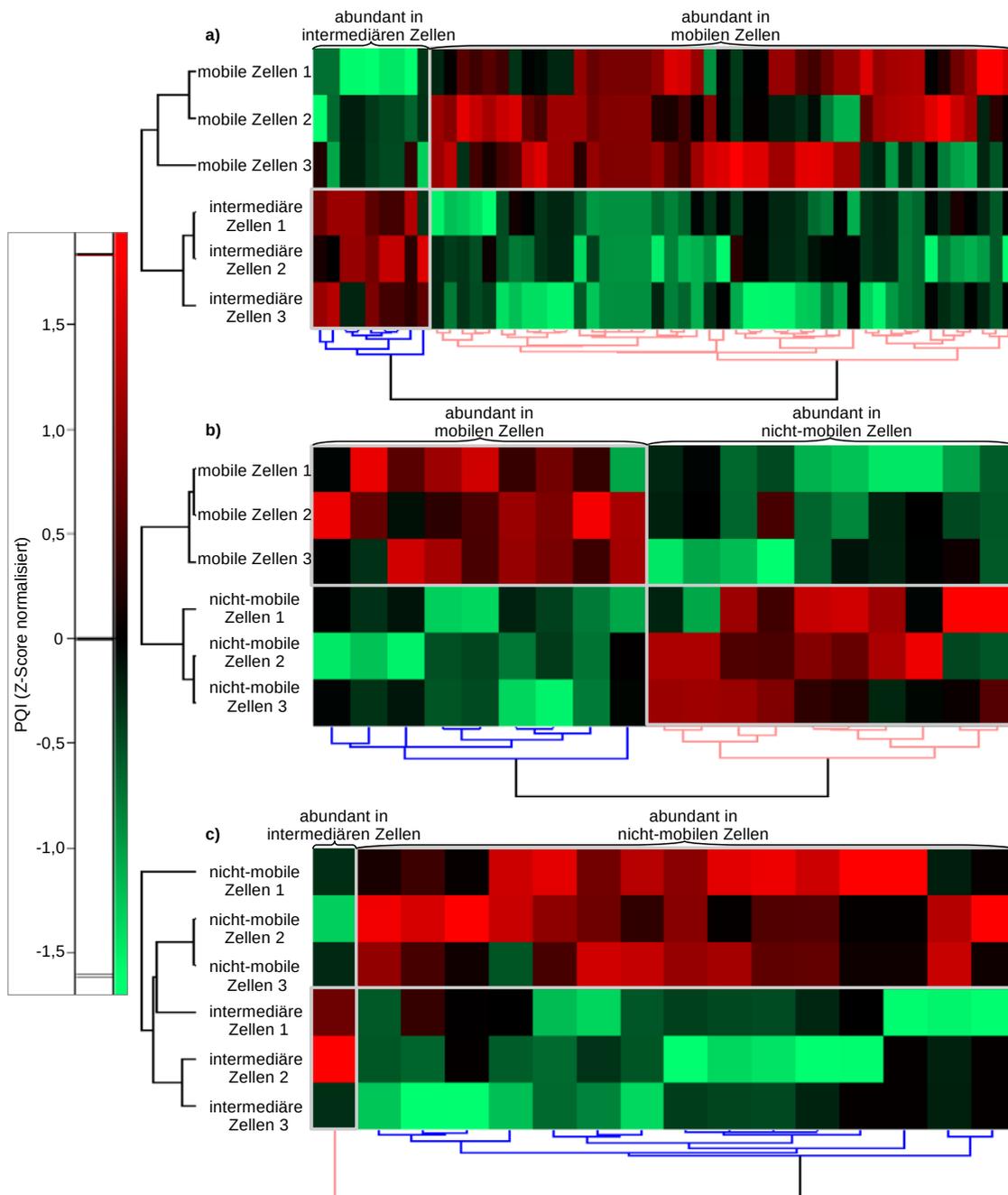


Abbildung 3.42: Proteinabundanzen identischer Proteine in Schnittmengen zellulärer Zustände von *H. pluvialis*

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge wurden hinsichtlich peptidspezifischer dPQI kategorisiert. Heatmaps repräsentieren die Proteindaten individueller Überschneidungsmengen unter Berücksichtigung normalisierter Abundanzinformationen. a) mobile und intermediäre Zellen (54 Proteine); b) mobile und nicht-mobilen Zellen (19 Proteine); c) intermediäre und nicht-mobilen Zellen (16 Proteine). Es wurden Proteine für die Erstellung der Heatmap verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten und einen dPQI > 50 % zwischen den Zuständen aufwiesen. Die Daten repräsentieren die Z-Score normalisierten Mittelwerte des PQI der BR. Das für die Erstellung der Heatmap durchgeführte Clustering erfolgte in den zellulären Zuständen auf Grundlage des Pearson- und in den Proteinen auf Grundlage des Spearman-Algorithmus. Die Farbverläufe repräsentieren die Dimensionen des normalisierten PQI einer Datenreihe gemäß der Skala.

Die Ergebnisse in Abb. 3.42 zeigten, dass die Verteilung abundanter Proteine in Abhängigkeit der zellulären Zustände von *H. pluvialis* unterschiedliche Verhältnisse aufwies. Hierbei zeichnete sich ab, dass der Anteil abundanter Proteine in intermediären Zellen, im Vergleich zu mobilen bzw. nicht-mobilen, reduziert war (vgl. Abb. 3.42 a) bzw. c)). In der Überschneidungsmenge mobiler und nicht-mobiler Zellen war es dahingegen möglich, annähernd identische Verhältnisse nachzuweisen. Für eine exakte Identifikation der Proteine, welche in Abhängigkeit der Kultivierungsparameter eine erhöhte Abundanz in definierten zellulären Zuständen von *H. pluvialis* aufwiesen, wurden auf Grundlage der Daten aus den Heatmaps Mengendiagramme unter Berücksichtigung der Proteinkategorien erstellt (vgl. Abb. 3.43).

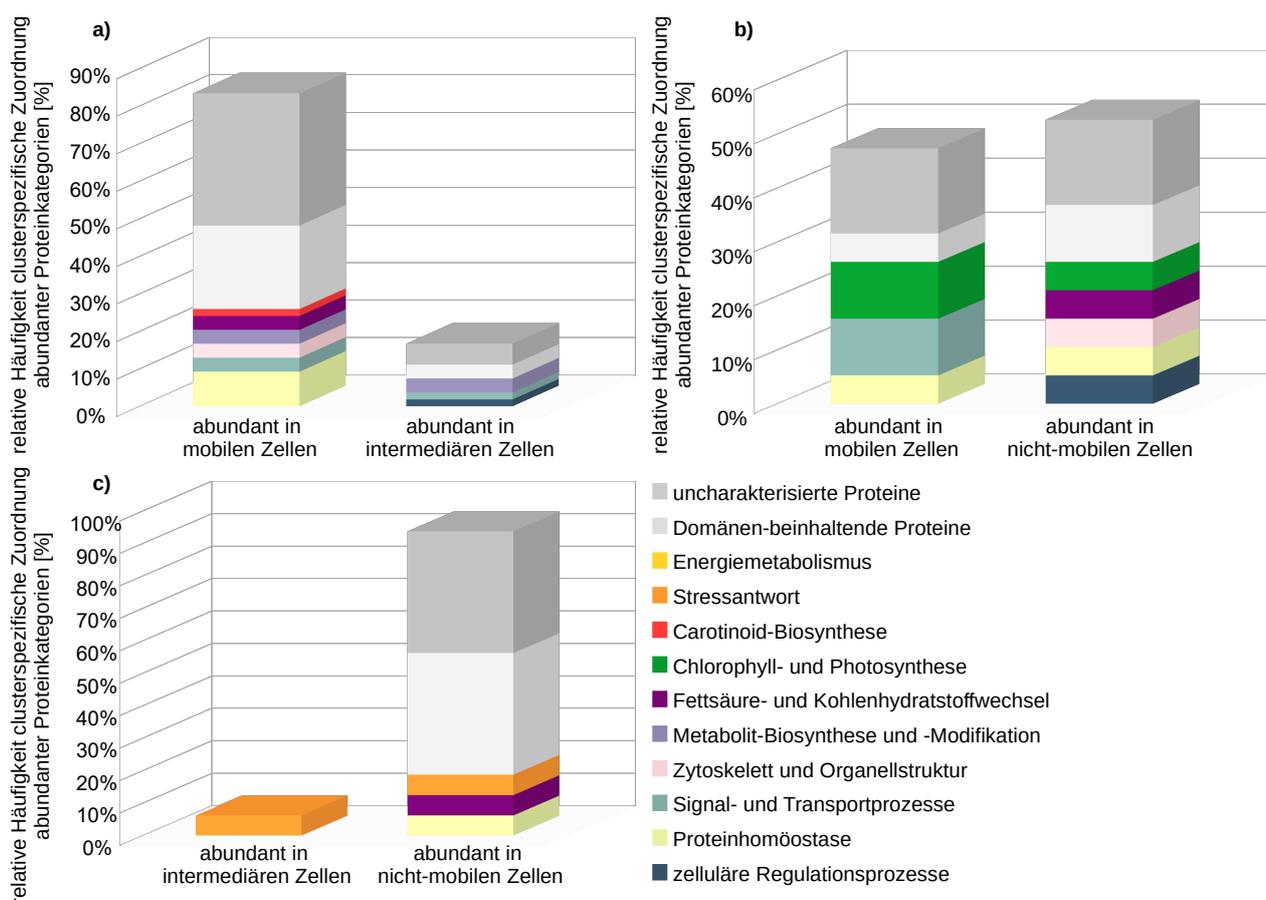


Abbildung 3.43: Prozentuale Verteilung identischer Proteine in Schnittmengen zweier zellulärer Zustände von *H. pluvialis* mit Angabe der Abundanzlevel in metabolischen Kategorien

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und metabolischen Kategorien zugeordnet. Datenbalken repräsentieren die Proteindaten individueller Überschneidungsmengen unter Berücksichtigung von Abundanzinformationen. a) mobile und intermediäre Zellen (54 Proteine); b) mobile und nicht-mobilen Zellen (19 Proteine); c) intermediäre und nicht-mobilen Zellen (16 Proteine). Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten und einen dPQI > 50 % zwischen den Zuständen aufwiesen.

Die Ergebnisse zeigten, dass in intermediären Zellen Proteine mit einer erhöhten Abundanz gegenüber mobilen Zellen aus den Kategorien Metabolit-Biosynthese und -Modifikation, Signal- und Transportprozesse sowie zelluläre Regulationsprozesse nachweisbar waren. Im Gegensatz konnten in den mobilen Zellen, neben Proteinen der Kategorien Signal- und Transportprozesse, Zytoskelett und Organellstruktur, Metabolit-Biosynthese und -Modifikation sowie der Proteinhomeostase, Kandidaten des Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsels und der Carotinoid-Biosynthese identifiziert werden (vgl. Abb. 3.43 a)).

Im Vergleich der intermediären und nicht-mobilen Zellen wurde je ein Protein der Stressantwort mit erhöhter Abundanz nachgewiesen, wobei nicht-mobile Zellen ebenfalls Proteine des Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsels und der Proteinhomöostase beinhalteten (vgl. Abb. 3.43 c)). Darüber hinaus kennzeichneten sich die Überschneidungsmengen durch einen hohen Anteil unbekannter Proteine mit einer gesteigerten Abundanz in mobilen und nicht-mobilen Zellen (vgl. Abb. 3.43 a) bzw. c)). Vergleichende Analysen der Überschneidungsmenge mobiler und nicht-mobiler Zellen zeigten, dass abundante Proteine der Chlorophyll- und Photosynthese nachweisbar waren. Proteine mit einer erhöhten Abundanz aus der Kategorie Signal- und Transportprozesse wurden ausschließlich in mobilen Zellen und Proteine der Kategorien zelluläre Regulationsprozesse, Zytoskelett und Organellstruktur bzw. Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsel nur in nicht-mobilen Zellen nachgewiesen. Die Ergebnisse ermöglichten es, weitere gemeinsame Effekte der Kultivierungsparameter auf Proteom-Ebene zu identifizieren und die zellulären Veränderungen nachzuvollziehen. Abschließende Analysen der Proteom-Daten zielten darauf ab, individuelle Unterschiede der einzelnen zellulären Subtypen von *H. pluvialis* herauszustellen.

3.5.3 Stadienspezifische Proteine in individuellen zellulären Zuständen von *H. pluvialis*

Folgende Analysen dienen der Charakterisierung stadienspezifischer Proteine in individuellen zellulären Zuständen von *H. pluvialis*, deren Biosynthese in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen induziert werden konnte. Die Datenreihen individueller Proteine basieren auf der in Abb. 3.34 dargestellten Häufigkeitsverteilung. Der größte Anteil individueller Proteine wurde in mobilen Zellen (266 Proteine) nachgewiesen. Intermediäre und nicht-mobile Zellen wiesen 35 bzw. 141 stadienspezifische Proteine auf. Es erfolgte eine Kategorisierung der Proteine gemäß Abschnitt 3.5.1. Die resultierende Häufigkeitsverteilung der Proteinkategorien in den definierten Zellstadien ist in Abb. 3.44 dargestellt. Die Analyse der Verteilungen ergab, dass für den überwiegenden Anteil der Proteine keine funktionelle Zuordnung erfolgen konnte (vgl. Abb. 3.44 72,9 % mobile, 65,7 % intermediäre und 75,2 % nicht-mobile Zellen).

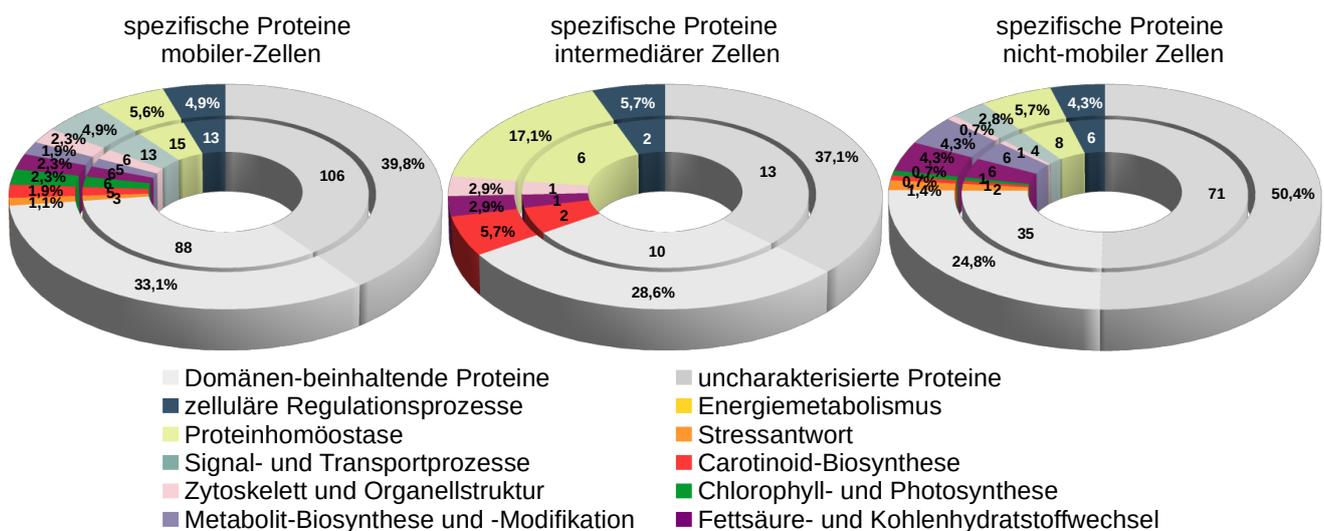


Abbildung 3.44: Häufigkeitsverteilung stadienspezifischer Proteine in individuellen Zuständen von *H. pluvialis* in metabolischen Kategorien

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge in der Verteilungen wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und metabolischen Kategorien zugeordnet. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass intermediäre Zellen einen erhöhten Anteil von Proteinen der Kategorien zelluläre Regulationsprozesse und Proteinhomöostase aufwiesen. In allen zellulären Zuständen wurden Proteine des Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsels sowie der Carotinoid-Biosynthese nachgewiesen, wobei die absolute Anzahl der Proteine in den mobilen Zellen am höchsten war (vgl. Abb. 3.44). Die Proteinverteilungen mobiler und nicht-mobiler Zellen wiesen auf einen nahezu identischen prozentualen Anteil von Proteinen der Kategorien zelluläre Regulationsprozesse, Proteinhomöostase, Signal- und Transportprozesse, Zytoskelett und Organellstruktur, Chlorophyll- und Photosynthese, Metabolit-Biosynthese und -Modifikation sowie der Stressantwort hin.

Im Anschluss wurde eine quantitative Analyse der Proteinabundanz zwischen den zellulären Zuständen von *H. pluvialis* durchgeführt. In Abhängigkeit der unterschiedlichen Kultivierungsparameter konnten zuvor individuelle Veränderungen der Abundanz ermittelt werden, welche anhand einer prozentualen Änderungsrate (dPQI) ausgewertet wurden. Anhand des Parameters war es möglich Proteine zu selektieren, welche einem höherem Maß an Regulation in den Zelltypen unterlagen und essentielle Funktionen erfüllen könnten. Die Berechnung des Parameters konnte aufgrund fehlender Vergleichswerte eines weiteren zellulären Subtyps in den Datensätzen stadienspezifischer Proteine nicht angewendet werden. Um eine relative quantitative Abschätzung der Proteinabundanz gewährleisten zu können, erfolgte die Berechnung einer stadieninternen Veränderungsrate der Proteinabundanz (dPQI_{int}). Hierzu wurden die Mittelwerte der Proteinabundanz aus den BR aufsteigend sortiert und das Minimum bzw. Maximum als Bezugsgröße verwendet. Anschließend wurde eine prozentuale Veränderung im Bereich von 0 - 100 % berechnet und weiterführend als Quantifizierungsmaß ausgewertet.

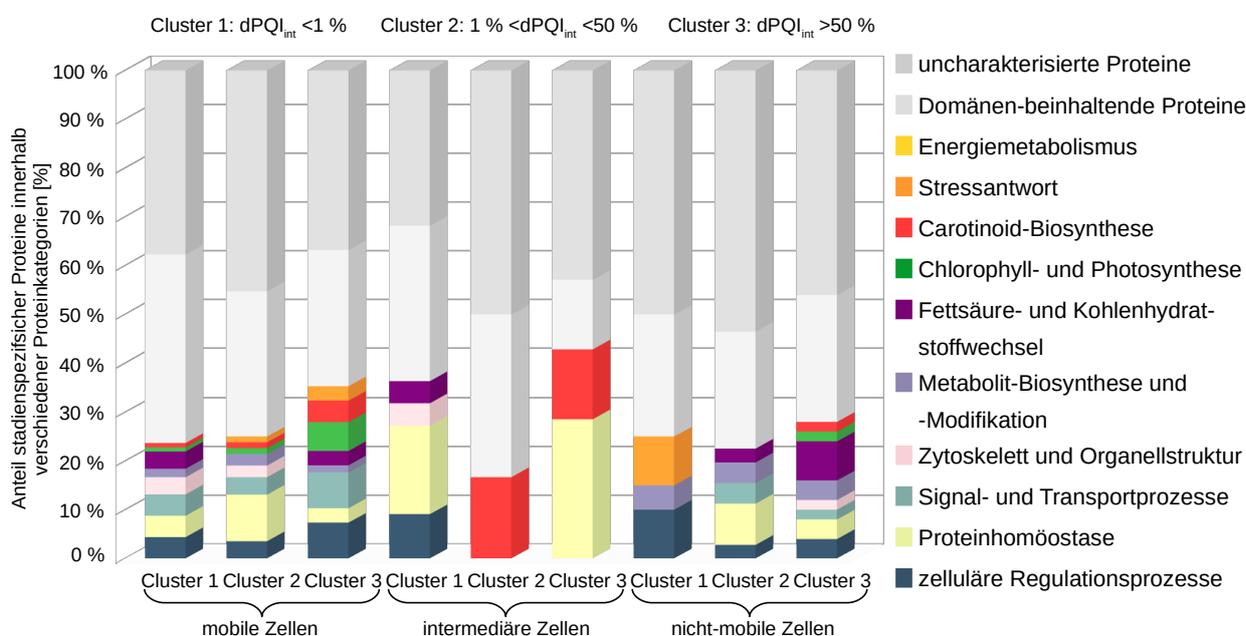


Abbildung 3.45: Stadieninterne Proteinabundanz in individuellen Zuständen von *H. pluvialis* mit Angabe der Abundanzlevel in metabolischen Kategorien

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und definierten metabolischen Kategorien zugeordnet. Cluster repräsentieren Proteindaten spezifischer Zellstadien, welche anhand interner Abundanzveränderungen abgegrenzt wurden. Cluster 1: dPQI_{int} < 1 %; Cluster 2: 1 % < dPQI_{int} < 50 %; Cluster 3: dPQI_{int} > 50 %. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten.

Bei der in Abb. 3.45 dargestellten Häufigkeitsverteilung stadienspezifischer Proteine von *H. pluvialis* wurden Cluster abgegrenzt, welche sich in Bezug auf die $dPQI_{int}$ unterschieden (vgl. Abb. 3.45 Cluster 1: $dPQI_{int} < 1\%$; Cluster 2: $1\% < dPQI_{int} < 50\%$; Cluster 3: $dPQI_{int} > 50\%$). In den Clustern der Zellen waren in Abhängigkeit der analysierten Stadien ca. 60 - 85 % der Proteine unbekannt. Die prozentualen Anteile der Proteine in den definierten Kategorien wiesen im Cluster 2 und 3 erhebliche Unterschiede zwischen den zellulären Zuständen auf. Auf Grundlage des stadieninternen Quantifizierungsmaßstabs wurden weiterhin nur Proteine des Clusters 3 (vgl. Abb. 3.45) analysiert. Die folgende Mengenverteilung stadienspezifischer Proteinkategorien des Clusters 3 basiert auf den in Abb. 7.16 dargestellten Datensätzen.

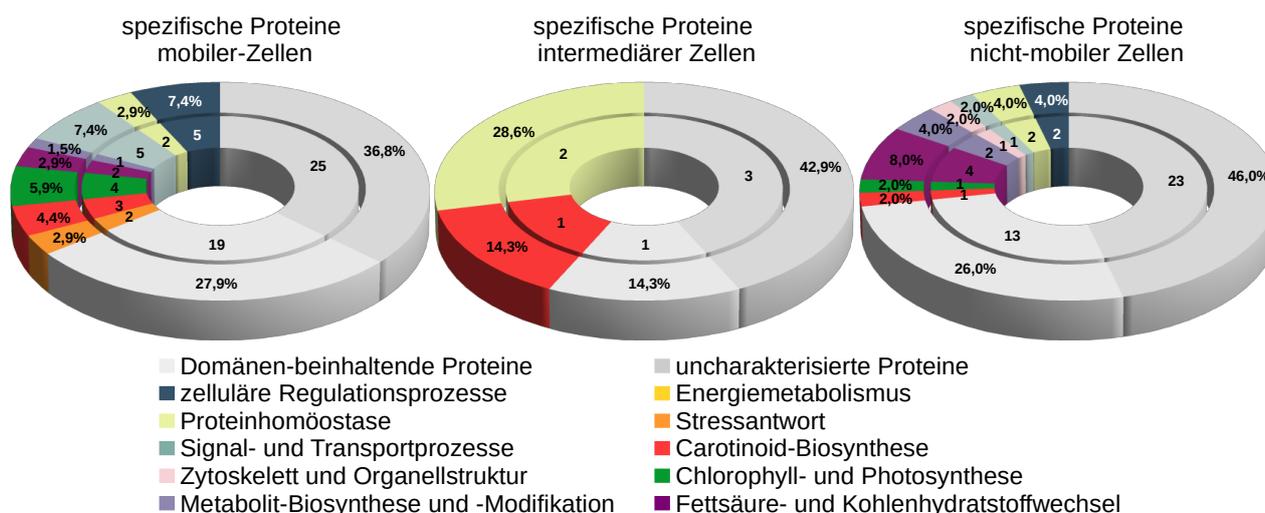


Abbildung 3.46: Häufigkeitsverteilung stadienspezifischer Proteine in individuellen Zuständen von *H. pluvialis* in metabolischen Kategorien

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge in der Verteilungen wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und metabolischen Kategorien zugeordnet. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten und einen $dPQI_{int} > 50\%$ innerhalb eines spezifischen Zustands aufwiesen.

Die Analyse der im Cluster 3 enthaltenen Proteine intermediärer Zellen zeigte, dass neben unbekanntem Proteinen ein Protein der Carotinoid-Biosynthese und zwei Proteine der Proteinhomöostase enthalten waren (vgl. Abb. 3.46 intermediäre Zellen). In den nicht-mobilen Zellen zeichnete sich ab, dass mind. ein Protein aus allen metabolischen Kategorien identifiziert werden konnte (vgl. Abb. 3.46 Ausnahme: Stressantwort, Energiemetabolismus). Analoge Ergebnisse konnten ebenfalls in mobilen Zellen beobachtet werden (Ausnahme: Energiemetabolismus, Zytoskelett und Organellstruktur). Mobile Zellen wiesen im Vergleich zu nicht-mobilen Zellen einen erhöhten Anteil von Proteinen der Kategorien Signal- und Transportprozesse, Chlorophyll- und Photosynthese sowie der Carotinoid-Biosynthese auf. In nicht-mobilen Zellen wurden Proteine aus Cluster 3 (vgl. Abb. 3.45) hingegen der Metabolit-Biosynthese und -Modifikation sowie dem Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsel zugeordnet (vgl. Abb. 3.46 mobile und nicht-mobilen Zellen). Die Veränderungen der Proteinabundanz, welche bereits in den Überschneidungsmengen von Proteinen zellulärer Zustände von *H. pluvialis* nachgewiesen wurden (Abschnitt 3.5.1 - 3.5.2), konnten in den Analysen stadienspezifischer Proteine bestätigt werden. Die gewählten Filterkriterien bedingten, dass die quantitative Einstufung einzelner Proteine nur auf Basis von zwei BR erfolgen konnte. Eine quantitative Analyse der Proteine war aus statistischer Sicht somit nicht gegeben.

Die Ergebnisse ermöglichten es trotz allem, weitere Schlussfolgerungen über molekulare Veränderungen der Zellen auf der Ebene des Proteoms zu beschreiben. Bisher erfolgten die Analysen der Proteom-Daten auf Grundlage der prozentualen Verteilungsmuster metabolischer Proteinkategorien. Weiterführend erfolgte eine Selektion des Proteom-Datensatzes. Die Auswahl von Proteinen erfolgte auf Grundlage der Transkripte, welche im Abschnitt 3.4 hinsichtlich der Genexpression von *H. pluvialis* untersucht wurden. Auf Grundlage von Sequenzinformationen konnten die Translationsprodukte der Transkripte in Datenbanken ermittelt und zugehörige Proteine identifiziert werden. Im folgenden Abschnitt wurden die relativen Transkript- und Proteinmengen in Abhängigkeit der Kultivierungsparameter gegenübergestellt.

3.5.4 Vergleichende Analysen des Einflusses der Kultivierungsparameter auf Ebene des Proteoms und des Transkriptoms

Für die Analysen wurden die relativen Transkriptmengen der Gene berechnet und den relativen Abundanzen der Proteine gegenübergestellt. Die Visualisierung der Daten erfolgte unter Verwendung von Heatmaps in Abb. 3.47. In den nicht-mobilen Zellen konnte eine relative Erhöhung der Transkript- bzw. Peptidmengen von Genen bzw. Proteinen des Carotinoid- und Fettsäure-Metabolismus sowie vereinzelter Vertreter des C- und N-Metabolismus nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.47 a) und b) Cluster 1 in nicht-mobilen Zellen). Die Analysen entsprechender Genprodukte in intermediären Zellen wiesen auf eine verringerte Abundanz hin (vgl. Abb. 3.47 a) und b) Cluster 1 in intermediären Zellen). Die relativen Transkriptmengen und Peptidabundanzen der Gene des Carotinoid-Metabolismus wiesen in den mobilen Zellen, verglichen zu den nicht-mobilen, ein reduziertes Level auf (vgl. Abb. 3.47 a) und b) Cluster 1 in mobilen Zellen). Hingegen wurde bei den Genen der Fettsäure-Biosynthese und der Stressantwort auf transkriptioneller und proteinbiochemischer Ebene ein erhöhtes Abundanzniveau nachgewiesen (vgl. Abb. 3.47 a) und b) Cluster 1 und 2 in mobilen Zellen). Weiterhin zeichnete sich in intermediären Zellen ab, dass ein geringer Anteil der Transkripte bzw. Proteine im gesteigerten Maße gebildet wurde. Auf Transkript- bzw. Proteom-Ebene konnten Genprodukte der Chlorophyllsynthese, Stressantwort und des C-Metabolismus mit einer erhöhten relativen Abundanz detektiert werden (vgl. Abb. 3.47 a) und b) Cluster 3 in intermediären Zellen). Die Erkenntnisse wiesen auf eine einheitliche Regulation der Transkripte bzw. Proteine in den Zellen hin. In mobilen und nicht-mobilen Zellen konnten jedoch ebenfalls Unterschiede der Regulationsmuster gezeigt werden. Nicht-mobile Zellen wiesen eine erhöhte Expression von Genen der Chlorophyll- und Photosynthese auf, wohingegen nur selten eine erhöhte Peptidabundanz detektiert wurde (vgl. Abb. 3.47 a) und b) Cluster 3 in nicht-mobilen Zellen). In mobilen Zellen wurden auf Ebene des Proteoms abundante Proteine der Stressantwort, Chlorophyll- und Photosynthese sowie des C- und N-Metabolismus beobachtet, wohingegen nur vereinzelte Transkripte eine erhöhte Abundanz aufwiesen (vgl. Abb. 3.47 a) und b) Cluster 3 in mobilen Zellen). Die Ergebnisse belegten, dass auf transkriptioneller und proteinbiochemischer Ebene gleichgerichtete Veränderungen stattgefunden haben. Andererseits wurde gezeigt, dass die regulatorischen Mechanismen Unterschiede in Bezug auf die relativen Transkript- bzw. Peptidmengen bedingen konnten. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurden regulatorische Mechanismen in den Zellen postuliert, welche im Abschnitt 4.5 diskutiert werden.

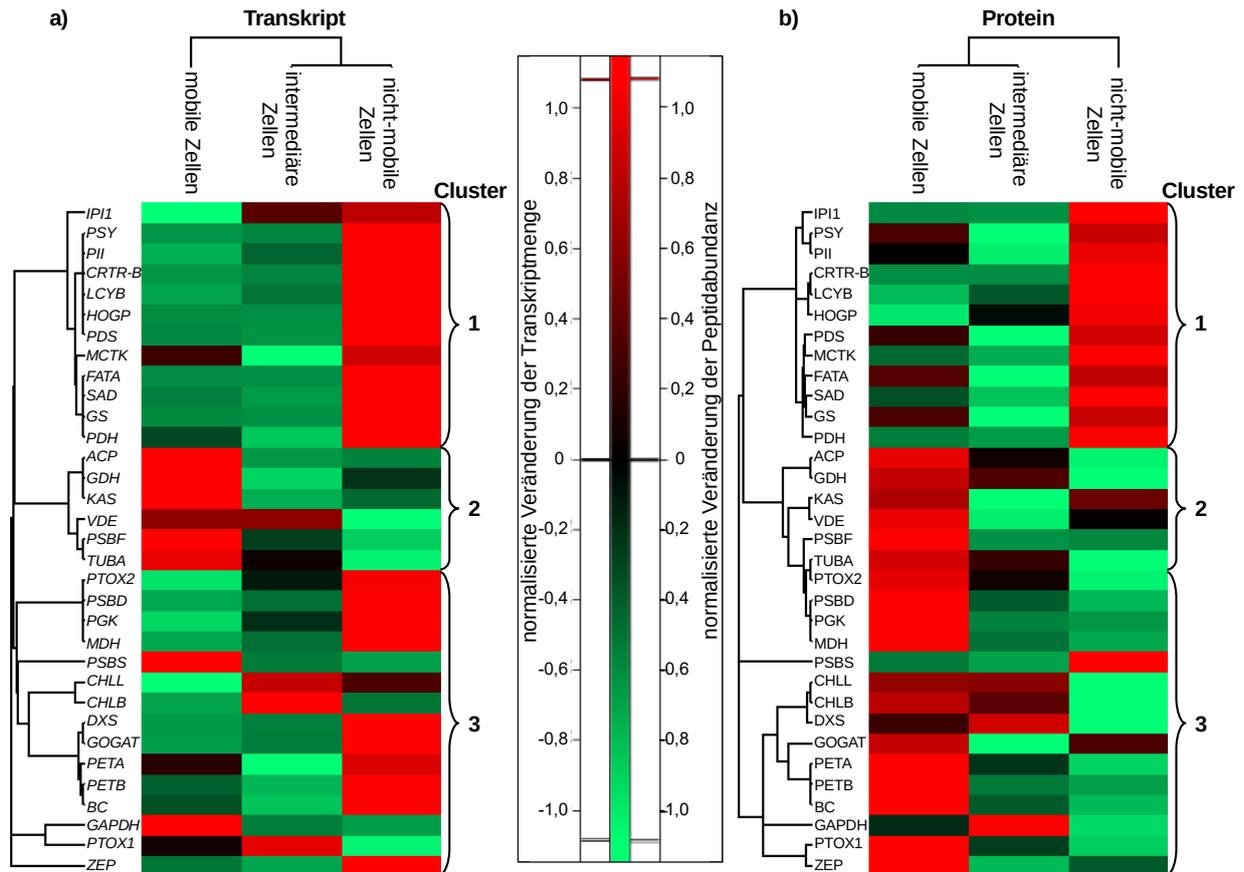


Abbildung 3.47: Vergleich des Transkriptoms und Proteoms dreier zellulärer Zustände von *H. pluvialis*

Normalisierte Mengenverhältnisse ausgewählter Transkripte und Proteine in mobilen, intermediären und nicht-mobilen Zellen von *H. pluvialis*. a) Abundanz ausgewählter Transkripte; b) Abundanz ausgewählter Peptide. Experimentelle Daten basieren auf Genexpressionsanalysen mittels qPCR bzw. massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Relative Transkriptmengen wurden aus den C_T -Werten der qPCR-Analysen ermittelt. Es wurden die Z-Score normalisierten Mittelwerte der relativen Transkript- bzw. Peptidmengen aus mind. zwei BR dargestellt. Das für die Erstellung der Heatmap durchgeführte Clustering erfolgte in den zellulären Zuständen auf Grundlage des Pearson- und in den Transkripten/Proteinen auf Grundlage des Spearman-Algorithmus. Die Farbverläufe repräsentieren die Dimensionen der normalisierten Transkript- bzw. Peptidmengen einer Datenreihe gemäß der Skala.

3.5.5 Identifikation co-regulierter Proteine dreier zellulärer Zustände von *H. pluvialis*

Das primäre Ziel der Proteom-Analysen bestand darin, die Veränderungen der Proteinspektren und die Verteilung unterschiedlicher Proteinkategorien zellulärer Subformen von *H. pluvialis* zu erlangen. Es wurden Regulationsmuster beschrieben, welche auf stadienspezifische Abundanzveränderungen definierter Proteinkategorien hinwiesen. Weiterhin konnten co-regulierte Proteine identifiziert werden, welche Funktionen im Zuge metabolischer Variationen der Zellen erfüllen könnten. Die im Abschnitt 3.5.1 - 3.5.3 beschriebenen Analysen zeigten weiterhin, dass der überwiegende Anteil der Daten aus unbekanntem Proteinen bestand (Domänen-beinhaltenes Protein, uncharakterisierte Proteine). Trotz der eingeschränkten Identifizierbarkeit konnte eine Bewertung der Abundanz dieser Proteine erfolgen. Die Daten der „Domänen-beinhaltenen Proteine“ enthielten weitere Informationen über deren potentielle Funktion. Um eine Übersicht der möglichen Funktionen und Abundanzinformationen der Proteine zu erhalten, wurde auf Grundlage der für Abb. 3.38 generierten Datenmatrix eine Übersicht erstellt (vgl. Abb. 3.48). Die Auswertung stadienspezifischer Daten führte zu dem Erkenntnis, dass in intermediären Zellen nur ein geringer Anteil an Proteinen mit einer erhöhten Abundanz gegenüber den anderen zellulären Zuständen nachgewiesen werden konnte.

Der überwiegende Anteil dieser bestand aus regulatorischen Proteinen und Enzymen primärer Stoffwechselaktivitäten, welche den Kategorien Proteinhomöostase, zelluläre Regulationsprozesse, Metabolit-Biosynthese und -Modifikation sowie dem Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsel zugeordnet wurden. Im Gegensatz wurde in mobilen Zellen der überwiegende Anteil bekannter Proteine, mit einer erhöhten Abundanz gegenüber den weiteren Zuständen, in die Kategorien des Kohlenhydratmetabolismus, der Photosynthese sowie der zellulären Regulationsprozesse eingeteilt. Weitere co-regulierte Proteine wurden den Prozessen des MEP-Weges, der Redox-Regulation sowie dem zellulären Transport über ABC-Transporter zugeordnet. Identische Analysen der nicht-mobilen Zellen führten zu der Erkenntnis, dass die bekannten Proteine den Kategorien der Proteinhomöostase, der Stressantwort und Photosynthese zuzuordnen waren. Darüber hinaus ergaben sich Informationen über co-regulierte Proteine der Kategorien Zellwand- und Kompartiment-Biosynthese, Redox-Regulation sowie zellulärer Transportprozesse durch ABC-Transporter (vgl. Abb. 3.48). Zusammenfassend konnten weitere essentielle Proteine individueller Zellstadien von *H. pluvialis* beschrieben werden. Die potentiellen Funktionen und Wirkungsweisen dieser werden weiterführend im Abschnitt 4.5 erläutert und diskutiert.

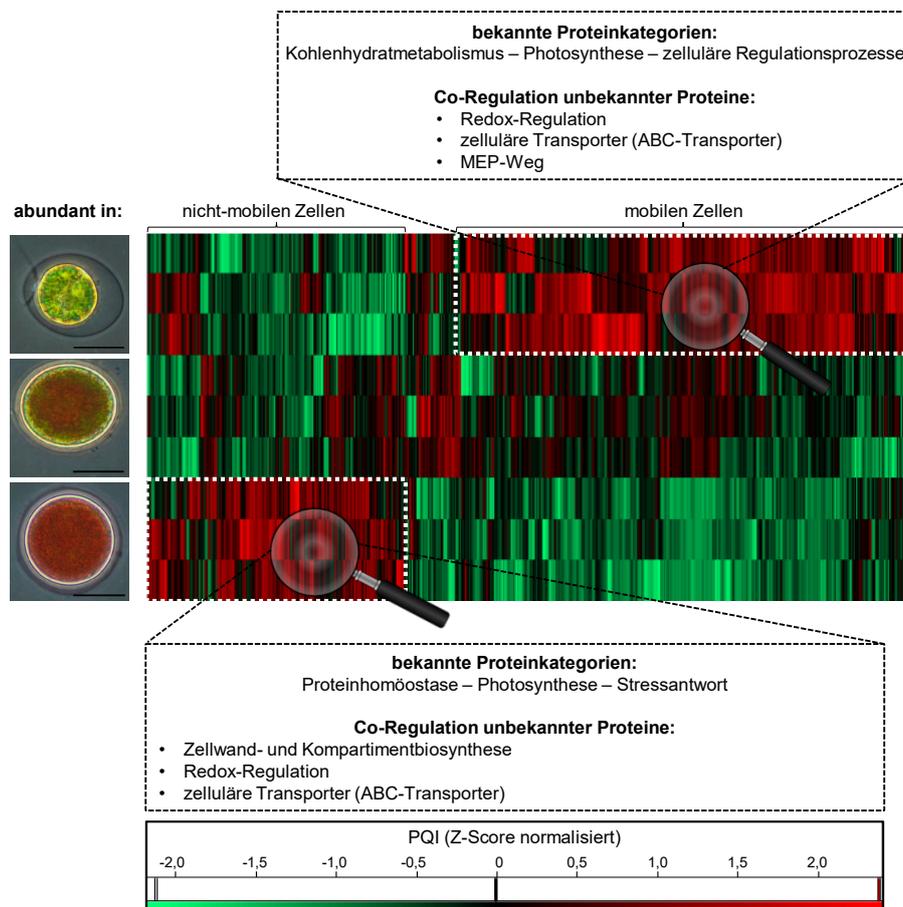


Abbildung 3.48: Proteinabundanzen identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von *H. pluvialis* (598 Proteine)

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Proteineinträge wurden unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert und hinsichtlich peptidspezifischer dPZI kategorisiert. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Heatmap verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten und einen dPZI > 50 % zwischen den Zuständen aufwiesen. Die Daten repräsentieren die Z-Score normalisierten Mittelwerte des PZI der BR. Das für die Erstellung der Heatmap durchgeführte Clustering erfolgte in den zellulären Zuständen auf Grundlage des Pearson- und in den Proteinen auf Grundlage des Spearman-Algorithmus. Die Farbverläufe repräsentieren die Dimensionen des normalisierten PZI einer Datenreihe gemäß der Skala. Maßstabsbalken in mikroskopischen Aufnahmen 20 µm.

4 Diskussion

Die Gesamtheit der in Abschnitt 3.1 - 3.5 beschriebenen Experimente verfolgten das Ziel, eine detaillierte Darstellung physiologischer und molekularer Veränderungen im Zuge des Übergangs von *H. pluvialis* in das nicht-mobile, Ax-bildende Zellstadium zu ermöglichen. Es wurde ein Versuchs-Setup etabliert, welches eine reproduzierbare Anzucht der Mikroalge in Abhängigkeit definierter Kultivierungsparameter ermöglichte. Auf Grundlage des Systems wurde der Einfluss unterschiedlicher Prozessparameter auf physiologische und molekulare Veränderungen in *H. pluvialis* analysiert. Die Experimentaldaten wurden statistisch ausgewertet und in Abschnitt 3 dargestellt. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse im sachlichen Kontext und in Bezug zur Fachliteratur diskutiert.

4.1 Etablierung definierter Kultivierungsstrategien

Die Untersuchung des Einflusses definierter Prozessparameter in Vorversuchen (vgl. Abschnitt 3.1) ermöglichten es, die in der Literatur beschriebenen Effekte des Nitratmangels sowie des Lichtstresses zu bestätigen [Fábregas *et al.*, 2001]. Analog zu den Arbeiten von Orosa *et al.* konnte eine Induktion der Ax-Biosynthese unter Nitratmangel beobachtet werden [Orosa *et al.*, 2005]. Weiterhin wurde gezeigt, dass sowohl die Lichtfarbe als auch die PFD, Veränderungen von Pigment- und Zellkonzentrationen hervorrufen konnten. Es wurde bestätigt, dass die Kultivierung mobiler Zellen von *H. pluvialis* in Abhängigkeit roter LED-Beleuchtung möglich ist, wohingegen die Applikation blauer LED-Beleuchtung für die Induktion der Ax-Biosynthese angewendet werden kann [Katsuda *et al.*, 2004; Xi *et al.*, 2016]. Zusammenfassend konnten Prozessparameter definiert werden, welche den kontrollierten Übergang von *H. pluvialis* in ein nicht-mobiles, Ax-produzierendes Zellstadium (induktive Bedingungen) sowie eine Kultivierung mobiler Zellen (nicht-induktive Bedingungen) ermöglichten. Die Parameter dienten als Grundlage zur Etablierung eines repräsentativen Versuchsaufbaus.

4.2 Vitalitäts- und Pigmentanalysen

Auf Grundlage des Versuchsaufbaus wurde der kombinatorische Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsparameter (Nitratverfügbarkeit im Kulturmedium, verschiedene Beleuchtungsregimes und CO₂-Begasung) auf physiologische und morphologische Veränderungen von *H. pluvialis* untersucht. Die Experimente wiesen auf individuelle Variationen der Kulturen hin, welche von einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität bis hin zu einer signifikanten Steigerung der Ax-Produktion reichten. Anhand der Analysen im Abschnitt 3.2 konnten drei Gruppen abgegrenzt werden, welche sich in Hinblick auf die individuellen Veränderungen definierter Eigenschaften kennzeichneten.

Die erste Gruppe setzte sich aus den Kulturen +N LL+C, -N LL-C und -N HL-C zusammen. Die Kulturen wiesen im Allgemeinen einen mobilen Phänotyp und ein nahezu identisches Verhältnis der Pigmentgehalte auf (vgl. Abb. 3.11 und 3.12). Unterschiede in den Kulturen konnten insbesondere hinsichtlich der Zellkonzentrations- und BTS-Veränderungen beobachtet werden. Die Kontrollansätze (+N LL+C) wiesen im Verlauf der Experimente eine signifikant steigende Tendenz auf, wohingegen die Kulturen -N LL/HL-C ein nahezu konstantes Verhältnis bezüglich der Analysegrößen zeigten (vgl. Abb. 3.13).

Der zweiten Gruppe wurden die Kulturen +N LL-C und +N HL-C zugeordnet, welche sich durch einen signifikant erhöhten Anteil toter Zellen sowie signifikant reduzierte Pigmentgehalte kennzeichneten. Eine mögliche Begründung für diese Beobachtungen könnte im nachgewiesenen erhöhten pH-Wert in den Kulturen liegen. In Abwesenheit der CO₂-Begasung stieg dieser am ersten Tag signifikant von pH 7 auf pH 9 - 10 an und blieb bis zum Abbruch der Experimente erhalten (vgl. Abb. 3.6). In der Literatur wird der Einfluss von CO₂ im Zuge der Mikroalgen-Kultivierung häufig diskutiert. Der Fokus liegt jedoch auf der Definition idealer CO₂-Konzentrationen zur Optimierung der Biomasse- und Wertstoffproduktion, sodass wenige Informationen über die Kultivierung in Abhängigkeit von CO₂-Mangel publiziert sind [Van Den Hende *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2016]. In Hinblick auf die Kultivierung von *H. pluvialis* konnte bspw. gezeigt werden, dass CO₂-Konzentrationen von mehr als fünf Prozent (v/v) negative Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen verursachen [Solovchenko und Khozin-Goldberg, 2013]. Es ist bekannt, dass in flüssigen Kultivierungssystemen ein chemisches Gleichgewicht zwischen den Oxidationsstufen der Carbonat-Ionen und CO₂ existiert, welches den pH-Wert des Mediums beeinflusst. Im Zuge der photosynthetischen CO₂-Fixierung wird das Gleichgewicht verschoben, woraus eine Basifizierung des Kulturmediums resultiert [Chi *et al.*, 2011]. Die Sachverhalte konnten unabhängig von der Nitratverfügbarkeit im Kulturmedium in der Gesamtheit genannter Proben („-C“) nachgewiesen werden. Trotz allem wurde festgestellt, dass der Rückgang der Zellvitalität der Proben -N LL/HL-C im Vergleich zu den Ansätzen +N LL/HL-C geringer ausgeprägt war. Die pH-Wert-Veränderung führte demnach nicht in jedem Fall zu einem signifikanten Vitalitätsverlust der Zellen. Die simultane Abwesenheit von Nitrat im Kulturmedium bei ausbleibender CO₂-Begasung verursachte keine weitreichenden morphologischen und physiologischen Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Eine Begründung könnte darin liegen, dass die Kulturen -N LL/HL-C, trotz der gesteigerten pH-Werte, alternative Stoffwechselaktivitäten aufgrund des Nitratmangels aufwiesen, welche den Erhalt der Zellpopulation gewährleisteten (z.B. Photorespiration). Chekanov *et al.* zeigten, dass photoautotrophe Organismen in Abhängigkeit der CO₂-Konzentrationen veränderte photosynthetische Aktivitätsparameter und eine erhöhte Expression von Genen der zellulären Stressantwort aufweisen [Chekanov *et al.*, 2017]. Die Analysen in Abschnitt 3.3 und 3.4 konnten diese Beobachtungen bestätigen. Es ist bekannt, dass ein Nitratmangel im Kulturmedium einen induktiven Effekt auf sekundäre Stoffwechselaktivitäten von Mikroalgen verursacht und zusätzlich zu den Beobachtungen beitragen könnte [Sun *et al.*, 2018]. Der kombinierte Einfluss des Nitrat- und CO₂-Mangels auf *H. pluvialis*-Kulturen wurde bisher nicht analysiert. Die durchgeführten Arbeiten bilden eine neuartige Datenbasis und beinhalten Informationen physiologischer und molekularer Veränderungen von *H. pluvialis* als Antwort auf die simultane Applikation der genannten Stressfaktoren.

Die Kulturen der dritten Gruppe (+N HL+C, -N LL+C und -N HL+C) wiesen einen intermediären bis hin zu einem nicht-mobilen Phänotyp auf und unterschieden sich durch die nachweisbare Ax-Produktion, von den Kulturen der Gruppen 1 und 2. Die Kulturen zeigten eine von der Zellkonzentration unabhängige Zunahme der GTS bzw. BTS sowie eine signifikante Abnahme des Chl- zu Car-Verhältnisses bei simultaner Zunahme des Ax- zu Car-Verhältnisses über den gesamten Analysezeitraum.

Hierbei zeigte sich, dass die Veränderungen in Abhängigkeit der kombinierten Applikation der induktiven Parameter (Nitratmangel und Lichtstress (HL)) in etwa zu einer Verdopplung der resultierenden Effekte im Vergleich zur separaten Applikation der Parameter führte (vgl. Abb. 3.11 und 3.12 -N HL+C mit -N LL+C bzw. +N HL+C). In der Literatur wurden diese Effekte bestätigt, wobei im Rahmen der Arbeiten stets mit unterschiedlichen Kultivierungssystemen bzw. -bedingungen gearbeitet wurde [Fábregas *et al.*, 2001]. Aus phänomenologischer Sicht konnten keine Unterschiede zwischen den Kulturen der Gruppe 3 beobachtet werden, welche in Abhängigkeit der separaten Applikation des Nitratmangels bzw. Lichtstresses (HL) kultiviert wurden (vgl. Abb. 3.17 -N LL+C und +N HL+C).

Die Analyse der insgesamt acht verschiedenen Parameterkombinationen über einen Zeitraum von zehn Kultivierungstagen eröffnete die Möglichkeit, den zeitlichen Einfluss einer Vielzahl von Stresssituationen nachstellen und analysieren zu können. Die phänomenologischen Beobachtungen konnten die in der Literatur verfügbaren Daten bestätigen und beinhalten weitere neuartige Informationen. Auf Grundlage der Daten und des reproduzierbar anwendbaren experimentellen Versuchsaufbaus erfolgte im weiteren Verlauf die Analyse der Veränderung photosynthetischer Aktivitätsparameter, welche im fachlichen Kontext zu den Daten der Vitalitäts- und Pigmentanalysen im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

4.3 Photosynthetische Aktivitätsparameter zeigen einen physiologischen Übergang an

Die Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz ermöglicht es, den photosynthetischen Status von Zellen analysieren und Rückschlüsse auf den Vitalitätsstatus dieser ermitteln zu können. Der Parameter wurde mit Hilfe zweier Experimentalsysteme analysiert und für die Berechnung repräsentativer Analysegrößen (F_v/F_M , F_v'/F_M' , NPQ) verwendet. Reproduzierende Zellsysteme weisen aufgrund heterogener Stoffwechselaktivitäten einen hohen Bedarf an Energie- und Reduktionsäquivalenten auf, welcher eine effektive photochemische Quantenverwertung voraussetzt [Chekanov *et al.*, 2017]. In einer Publikation von Scibilia *et al.* wurde die heterogene Ergebnislage publizierter Daten zur Analyse photosynthetischer Aktivitätsparameter in *H. pluvialis* verdeutlicht [Scibilia *et al.*, 2015]. Die Autoren verwiesen auf die Notwendigkeit der differenzierten Interpretation von Daten, welche in Abhängigkeit unterschiedlicher Stressfaktoren ermittelt wurden. Dies konnte in den durchgeführten Arbeiten bestätigt werden. Initiale Experimentalreihen zeigten zusätzlich, dass unterschiedliche Analysesysteme die Ergebnisse beeinflussen. Unter Verwendung zweier Systeme zur Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz (Imaging-PAM und FluorCam) konnte in Proben mit reduziertem Chl- zu Car-Verhältnis ein Unterschied der F_v/F_M -Werte ermittelt werden (vgl. Abb. 7.2). Die Beobachtungen könnten auf das Messlicht in den Systemen zurückzuführen sein (Imaging-PAM: blaue LEDs, 470 nm; FluorCam: rote LEDs, 617 nm). Die Applikation eines blauen Messlichtes geringer Intensität in Kulturen mit einem hohen Anteil an roten Farbpigmenten könnte eine Absorption des Lichtes bedingen, wodurch die Weiterleitung der Photonen zum PS II reduziert und das Grundprinzip der Messung beeinflusst wäre. Die Vermutung konnte durch die reduzierten F_v/F_M -Werte in Ax-produzierenden Kulturen bestätigt werden und stellt die Applikabilität des Systems (Imaging-PAM) zur Untersuchung carotinoidhaltiger Mikroalgen in Frage.

Die durchgeführten Analysen mit der FluorCam wiesen auf eine effektive photosynthetische Energieverwertung in den Kontrollansätzen (+N LL+C) hin. Die F_v/F_m -Werte, welche unter Verwendung des Analysesystems in den Kulturen ermittelt wurden, waren mit Literaturangaben (0,65 - 0,77) vergleichbar [Wang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2017]. Ähnliche Effekte wurden in den Ansätzen +N HL-C, welche eine signifikant verminderte Zellvitalität aufwiesen, beobachtet. In den Proben konnte eine Zunahme der F_v'/F_m' -Werte sowie der SBR bei gleichzeitiger Abnahme des NPQ gezeigt werden (vgl. Abb. 3.19 +N HL-C). Arbeiten von Chekanov *et al.* wiesen darauf hin, dass eine rasante Veränderung von Kultivierungsbedingungen eine hohe Mortalitätsrate in Mikroalgen-Kulturen verursacht, da die Stimuli nicht ausgeglichen werden können [Chekanov *et al.*, 2017]. Diese Aussagen konnten in den Analysen der Proben +N LL-C bestätigt werden. Die Kulturen wiesen neben einem signifikanten Rückgang des zellulären Vitalitätsstatus eine signifikante Reduktion der F_v/F_m - und F_v'/F_m' -Werte sowie des NPQ auf (vgl. Abb. 3.19 +N LL-C). Im Widerspruch hierzu standen die Ergebnisse der Ansätze +N HL-C, welche trotz des signifikanten Rückgangs der Zellvitalität, auf einen Anstieg der photochemischen Energieverwertung deuteten. Die Beobachtungen könnten auf eine Regeneration der Kulturen hinweisen, welche eine Anpassungsreaktion auf die Kultivierungsbedingungen darstellen würde.

Nach Zhang *et al.* ist bis zum vierten Tag nach Beginn der Applikation induktiver Kultivierungsbedingungen ein Anstieg der photosynthetischen Aktivität zu verzeichnen, welcher mit dem Übergang der Zellen in ein nicht-mobiles Stadium einhergeht [Chekanov *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017]. Im Anschluss kann ein Rückgang der photosynthetischen Aktivität gezeigt werden, welcher eine indirekte Proportionalität zur Ax-Biosynthese aufweist und durch eine erhöhte NPQ-Aktivität begleitet wird [Gu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017]. Es wird angenommen, dass die Erhöhung der NPQ-Level den Schutz der Photosysteme vor gesteigerten Lichtintensitäten gewährleistet, sodass die photochemische Energieverwertung aufrecht erhalten werden kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten diese Beobachtungen zum Teil bestätigen, standen andererseits jedoch teilweise im Widerspruch zu den Literaturdaten. Die Analysen der SBR wiesen auf eine Reduktion des Parameters in den Kulturen +N HL+C, -N LL+C und -N HL+C hin. Einen Hinweis darauf lieferten ebenfalls Chekanov *et al.*, welche auf einen verminderten Elektronentransport im Anschluss an das PS II der plastidären Elektronentransportkette verwiesen [Chekanov *et al.*, 2017]. Ein verminderter Elektronentransport weist auf eine verminderte CO_2 -Fixierung hin, wodurch die Entstehung von ROS begünstigt wird. Arbeiten von Gu *et al.* verwiesen auf eine zunehmende Aktivität des PS I gegenüber dem PS II in nicht-mobilen Zellen von *H. pluvialis* und konnten die These somit stützen [Gu *et al.*, 2013]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Elektronentransport im PS I sowie der Reduktionsgrad von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP^+) in nicht-mobilen Zellen erhöht war. Darüber hinaus konnte eine gesteigerte Proteinabundanz von PTOX (Coenzym von PDS und ZDS) nachgewiesen werden [Li *et al.*, 2008]. Der ermittelte Rückgang der SBR in nicht-mobilen Zellen von *H. pluvialis* bestätigte die Hypothese, dass Lichtenergie im Zuge eines zyklischen Elektronentransportes in den Photosystemen verwertet werden könnte. Durch die effiziente Elektronenübertragung im PS I sowie die Elektronenverwertung durch PTOX könnte Energie für morphologische Anpassungsreaktionen bereitgestellt und die Bildung von ROS unterbunden werden.

Die Analysen der Parameter F_V'/F_M' und NPQ bei $171 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ wiesen auf Variationen in Abhängigkeit der Nitratverfügbarkeit und des Beleuchtungsregimes in den Kulturen hin. In Anwesenheit von Nitrat (+N HL+C) konnten keine signifikanten Variationen der Parameter beobachtet werden, während unter Nitratmangel (-N LL/HL+C) nach einer initialen Reduktion ein signifikanter Anstieg der Analysegrößen nachgewiesen wurde (vgl. Abschnitt 2.1.6, 2.2.5, 2.3.1 Teil B). Darüber hinaus konnten signifikant verminderte F_V'/F_M' -Werte bei $\text{PFD} < 86 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ im Vergleich zu den Kontrollansätzen beobachtet werden. Die Applikation von $\text{PFD} > 171 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ bedingte hingegen vergleichbare F_V'/F_M' -Werte. Diese Beobachtungen stehen im Zusammenhang mit der niedrigen NPQ-Aktivität jener Kulturen. Die Ergebnisse weisen auf eine effiziente Lichtverwertung der Zellen bei $\text{PFD} > 171 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ hin. Elektronenmikroskopische Analysen konnten zeigen, dass im Zuge des Übergangs mobiler Zellen in das nicht-mobile Stadium, ein Abbau von Thylakoidmembranen sowie eine Zunahme von Lipidtröpfchen resultieren [Gu *et al.*, 2013]. Somit kann eine Reduktion des photochemischen Verwertungspotentials angenommen werden. Die verminderten F_V'/F_M' -Werte in nicht-mobilen Zellen bei $\text{PFD} < 86 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ konnten diese Hypothesen bestätigen und ermöglichten es, die lichtabschirmende Wirkung der Lipidtröpfchen zum Schutz der Photosysteme zu bestätigen. Gwak *et al.* konnten Veränderungen in der Lipidzusammensetzung zeigen, welche die Reduktion essentieller Bestandteile der Thylakoidmembran (MGDG und DGDG) belegten [Gwak *et al.*, 2014]. Weitere Analysen wiesen darauf hin, dass die Plastiden nicht-mobiler Zellen eine netzartige Struktur aufweisen, in deren Zwischenräumen die Lipidtröpfchen lokalisiert sind [Wayama *et al.*, 2013]. Die netzartige Struktur der Plastiden könnte einen Hinweis darauf geben, weshalb die Zellen in Abhängigkeit erhöhter PFD ($> 171 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) eine vergleichbare photochemische Quantenverwertung zu den Kontrollansätzen aufwiesen. Die Struktur könnte bedingen, dass Lichtquanten effektiv aufgenommen werden, ohne dass eine vollständige Abschirmung durch die Lipidtröpfchen erfolgt. In mobilen Zellen bewirkte die Applikation einer PFD von $403 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ eine Reduktion von F_V'/F_M' , welche auf das photoinhibitorische Potential dieser Lichtintensität hinweist.

In den Proben -N LL-C und -N HL-C konnte ab dem ersten Tag ein Anstieg der NPQ- und F_V'/F_M' -Werte beobachtet werden. Insbesondere die NPQ-Level wiesen in Abhängigkeit der PFD signifikante Unterschiede im Vergleich zu Ax-produzierenden Kulturen auf (vgl. Abb. 3.28 -N LL-C und -N HL-C). Unter Berücksichtigung der Pigmentanalysen aus Abschnitt 3.2.3 konnte gezeigt werden, dass die Kulturen jedoch keine gesteigerten Ax- bzw. Car-Konzentrationen aufwiesen. Die Applikation erhöhter PFD konnte demnach nicht durch lichtabschirmende Pigmente kompensiert werden. Durch die gewählten Prozessbedingungen war es möglich, den Effekt von Lichtstress (HL) und Nitratmangel auf Veränderungen photosynthetischer Aktivitätsparameter zu analysieren, ohne den Übergang der Zellen in das nicht-mobile Zellstadium zu induzieren. Die Experimente belegten, dass die Ax-Akkumulation der Zellen eine Reduktion der NPQ-vermittelten Stressantwort zur Folge hat und die Aufrechterhaltung des photosynthetischen Elektronentransportes gewährleisten könnte. Diese Beobachtungen wiesen auf einen in der Literatur postulierten Abwehrmechanismus hin, welcher die protektiven Funktionen von Ax während der morphologischen Umwandlung der Zellen beschreibt [Chekanov *et al.*, 2019].

Die Analysen photosynthetischer Aktivitätsparameter zeigten, dass diese im Zusammenhang mit den Kultivierungsbedingungen standen. Die Zunahme der SBR einzelner Kulturen verwies auf eine steigende photosynthetische Aktivität der Zellen. Aus physiologischer Sicht sollte eine steigende SBR mit verminderten NPQ und erhöhten photochemischen Quantenausbeuten einhergehen. Die Beobachtungen in Bezug auf die F_v'/F_m' -Werte und SBR standen jedoch zum Teil im Widerspruch zueinander. Darüber hinaus zeichnete sich eine mitunter gleichgerichtete Veränderung des NPQ und der F_v'/F_m' -Werte sowie der SBR der Zellen ab. Die Ergebnisse verdeutlichen die Komplexität der Anpassungsreaktionen im Zuge des Übergangs der Zellen aus einem mobilen in ein nicht-mobiles, Ax-produzierendes Zellstadium. Auf Grundlage des etablierten Versuchsaufbaus konnte eine Vielzahl dieser Prozesse nachgestellt und aus physiologischer Sicht charakterisiert werden. Um das Verständnis über die zugrundeliegenden molekularen Regulationsmechanismen zu vertiefen, wurde eine gerichtete Analyse der Expressionsunterschiede ausgewählter Gene unterschiedlicher Stoffwechselwege durchgeführt und die Ergebnisse im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.4 Änderung der Genexpression relevanter Stoffwechselwege beim physiologischen Übergang

Die Expressionsanalysen ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese ergaben, dass die Ax-produzierenden Kulturen +N HL+C eine signifikant erhöhte Expression von *CHLB* und *CHLL* aufwiesen. In der Literatur wird beschrieben, dass die codierten Proteine an der lichtunabhängigen Synthese von Chlorophyll beteiligt sind [Cahoon und Timko, 2000]. Im Gegensatz zu den Angaben der Literatur wurde ein Anstieg der Expression in Abhängigkeit induktiver Lichtbedingungen (HL) gezeigt, sodass ein alternativer Regulationsmechanismus in *H. pluvialis* angenommen werden kann. In Abhängigkeit induktiver Lichtbedingungen konnten weitere Unterschiede festgestellt werden, welche bspw. auf eine verminderte Expression von *PSBS*, einem essentiellen Bestandteil des PS II, hinwiesen. Weiterhin wurde eine signifikant erhöhte Expression von Genen des Cyt- b_6/f -Komplexes (*PSBF*, *PETA*, *PETB*) in Kulturen ohne CO₂-Begasung nachgewiesen. Im Beispiel der Kulturen -N HL-C wurde zusätzlich eine erhöhte Expression von *PTOX2* sowie eine Zunahme der NPQ-Aktivität bei simultaner Abnahme der SBR beobachtet. Untersuchungen von Gu *et al.* konnten zeigen, dass in Abhängigkeit induktiver Kultivierungsbedingungen eine Verschiebung des Elektronenflusses vom PS II in das PS I erfolgt [Gu *et al.*, 2013]. Weiterhin wurde auf Grundlage von Transkriptomanalysen in Abhängigkeit von Lichtstress eine erhöhte Expression ROS-inhibierender Systeme nachgewiesen, woraus eine Reduktion intrazellulärer ROS-Konzentrationen resultierte [Gwak *et al.*, 2014]. Wie bereits diskutiert, fungiert die Ax-Biosynthese in intermediären bzw. nicht-mobilen Zellen als alternative Stressantwort auf variierende Prozessbedingungen. Kulturen, welche aufgrund mangelnder CO₂-Begasung bei simultaner Applikation induktiver Kultivierungsbedingungen keine Biosynthese des Keto-Carotinoids aufwiesen, kennzeichneten sich durch einen Anstieg der NPQ-Aktivität (vgl. Abschnitt 3.2.3 und 3.3.2 -N LL/HL-C). Die zusätzliche CO₂-Begasung, bei Aufrechterhaltung der induktiven Kultivierungsbedingungen, ermöglichte dahingegen die effiziente Biosynthese von Ax, woraus signifikant verminderte NPQ-Level resultierten (vgl. Abschnitt 3.2.3 und 3.3.2 -N LL/HL+C, +N HL+C).

Die zusammenfassende Interpretation der Daten bestätigte die Hypothese, dass in Abhängigkeit von Lichtstress (HL) und CO₂-Mangel ein zyklischer Elektronentransport angenommen werden kann. Die transportierten Elektronen würden zyklisch zwischen dem Cyt-b₆f-Komplex und dem PS I transportiert werden, wodurch parallel ATP produziert werden könnte.

Eine im Jahr 2009 veröffentlichte Publikation von Wang *et al.* verweist auf die Existenz zweier Varianten von *PTOX* in *H. pluvialis* [Wang *et al.*, 2009]. Die Autoren zeigten, dass im Rahmen der Elektronenverwertung zur Bildung von Ax die Beteiligung von *PTOX1*, aufgrund der nachgewiesenen Co-Regulation zu *PDS*, wahrscheinlicher wäre, als die Beteiligung von *PTOX2*. Die ermittelten Ax-Konzentrationen (vgl. Abschnitt 3.2.3) konnten diese Annahmen bestätigen. In den Kulturen -N HL-C wurde trotz induktiver Bedingungen kein Ax nachgewiesen. Demnach ist anzunehmen, dass *PTOX2* keinen direkten Bezug zur Ax-Biosynthese aufweist. Weitere Analysen von *PTOX2* wiesen jedoch auf eine erhöhte Expression des Gens in Ax-produzierenden Kulturen +N HL+C und -N HL+C im Verlauf der Experimente hin. Im Gegensatz konnte die von Wang *et al.* beschriebene Zunahme der Expression von *PTOX1* in keiner der Ax-produzierenden Kulturen bestätigt werden, wohingegen die Expression von *PDS* in den Proben -N HL+C signifikant anstieg. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Expression von *PTOX2* in Abhängigkeit induktiver Lichtbedingungen kurzzeitig induziert wird und somit einem initialen Schutz vor photooxidativen Schädigungen zellulärer Photosysteme gewährleisten könnte. Weitere Analysen verwiesen auf den Einfluss induktiver Lichtbedingungen (HL) auf die Expression der im Xanthophyll-Zyklus beteiligten Gene *VDE* und *ZEP*. Die Expression von *ZEP* wurde in Abhängigkeit von Lichtstress (HL) signifikant reduziert. Im Allgemeinen konnte beobachtet werden, dass die Expressionänderungen genannter Gene vergleichsweise niedrig waren. Analysen der Pigmentzusammensetzung von *H. pluvialis* zeigten, dass in nicht-mobilen Zellen kein Zeaxanthin nachweisbar war [Gu *et al.*, 2013]. Die Ergebnisse bestätigten die These, dass dem Xanthophyll-Zyklus im Zuge der zellulären Stressantwort von *H. pluvialis* nur eine geringe Relevanz zuzuordnen ist.

Die Analysen zeigten weiterhin, dass die Expression von Genen der Carotinoid-Biosynthese in Abhängigkeit der Stressfaktoren variabel beeinflusst wurde. In Abhängigkeit von Lichtstress (+N HL+C, -N HL+C) war es möglich, eine erhöhte Expression von Genen initialer Schritte der Carotinoid-Biosynthese (*IPI1*, *IPI2*) sowie von *BKT1* nachzuweisen. Gwak *et al.* zeigten zusätzlich, dass alle Gene des MEP-Weges eine erhöhte Expression in Abhängigkeit von Lichtstress aufwiesen [Gwak *et al.*, 2014]. Weitere Arbeiten wiesen auf eine erhöhte Expression von *PSY*, *PDS* und *CRTR-B* in Abhängigkeit von Lichtstress hin [Vidhyavathi *et al.*, 2008; Gwak *et al.*, 2014]. Ähnliche Effekte konnten in den Proben -N HL+C ermittelt werden. Die relativen Transkriptmengen von *PSY*, *LCYB* und *CRTR-B* wiesen einen signifikanten Anstieg gegenüber den Kontrollreaktionen auf. Ma *et al.* konnten eine erhöhte Expression von *CRTR-B* und *LCYB* in Abhängigkeit blauer LED-Strahlung beobachten [Ma *et al.*, 2018]. Dies konnte anhand der Analysedaten von *CRTR-B* bestätigt werden (vgl. Proben: -/+N HL+C). Diese Beobachtungen traten simultan zum Expressionsanstieg von *PTOX2* auf, wodurch erneut auf die Co-Regulation der Gene hingewiesen werden konnte.

In den Ansätzen -N LL+C wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von *CRTR-B* nachgewiesen, wobei im Fall der Kulturen keine Co-Regulation zu *PTOX2* existierte. Analog zu den Ergebnissen in den Kulturen +N HL+C (3 - 7 dpi) konnten Ma *et al.* eine erhöhte Expression von *BKT2* in Abhängigkeit erhöhter Lichtintensitäten weißer LED-Strahlung nachweisen [Ma *et al.*, 2018]. Die Analysen der Behandlungsregimes +N LL/HL-C ergaben, dass die Expression von Genen der Carotinoid-Biosynthese (z.B. *PSY*, *CRTR-B*) im zeitlichen Verlauf teilweise bis auf das Niveau der Ax-produzierenden Kulturen (+N HL+C, -N LL+C) anstieg. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Abschnitts 3.2.3 konnten hingegen nur geringe Mengen Ax nachgewiesen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Zellen eine verminderte NPQ-Aktivität im Vergleich zu den Kulturen -N LL/HL-C aufwiesen. Die Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die Induktion von Genen des Carotinoid-Stoffwechsels auf transkriptioneller Ebene erfolgte und parallel eine Inhibition der NPQ-Aktivität verursachte, wobei die Ax-Biosynthese aufgrund mangelnder CO₂-Verfügbarkeit inhibiert wurde. Die verminderte NPQ-Aktivität könnte jedoch ebenfalls durch die erhöhte Mortalitätsrate der Kulturen begründet werden.

Die Analyse weiterer metabolischer Kategorien zeigte, dass in den Ax-produzierenden Kulturen eine erhöhte Expression von Genen der Fettsäure-Biosynthese nachgewiesen werden konnte. In einer Publikation aus dem Jahr 2015 beschrieben die Wissenschaftler Chen *et al.* einen möglichen Mechanismus, welcher die molekulare Verknüpfung der Ax- und Fettsäure-Biosynthese aufzeigen sollte. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Biosynthese der Carotinoide, bis auf die Stufe von β -Carotin, sowie die Fettsäure-Biosynthese im Plastiden der Zellen stattfindet und der weitere Transport der Intermediate über die plastidäre Membran in das ER erfolgt [Chen *et al.*, 2015]. Die Transportmechanismen für β -Carotin sind jedoch noch nicht bekannt. Eine Publikation von Roth *et al.* konnte anhand der Analyse des Genoms und Transkriptoms von *Chromochloris zofingiensis* (*C. zofingiensis*) eine erhöhte Abundanz von ABC-Transportern in Ax-produzierenden Zellen bei Lichtstress nachweisen. Die Autoren postulieren, dass diese am Transport von Intermediaten des Ax-Stoffwechsels beteiligt sein könnten [Roth *et al.*, 2017]. Im Anschluss an den Transport erfolgt die Umsetzung von β -Carotin zu Ax, welches durch die Aktivität von DGAT verestert wird und in Lipidtröpfchen akkumuliert [Zhekisheva *et al.*, 2005]. Der Prozess der Ax-Biosynthese wird auf Produktebene reguliert, sodass hohe intrazelluläre Konzentrationen freier Ax-Monomere den Fortschritt der Biosynthese inhibieren [Chen *et al.*, 2015]. Die Veresterung stellt einen wichtigen Modifikationsprozess dar, welcher das Fortschreiten der Ax-Biosynthese gewährleistet. Analysen von Kulturen ohne zusätzliche CO₂-Begasung verwiesen auf eine signifikante Expressionsverminderung von Genen der Fettsäure-Biosynthese. Im Gegensatz dazu wurde in den Kulturen -N LL/HL+C ein systematischer Anstieg der relativen Abundanz einer Vielzahl der analysierten Transkripte zu unterschiedlichen Zeitpunkten beobachtet. Hierbei ist die Expression der Gene *SAD* und *FATA* hervorzuheben, da diese an der Modifikation und dem Transport der Fettsäuren über die plastidäre Membran beteiligt sind. Untersuchungen der Fettsäurekomposition von *H. pluvialis* in Abhängigkeit von Lichtstress und Nitratmangel konnten zeigen, dass im Zuge der Ax-Produktion ein linearer Konzentrationsanstieg der Ölsäure (C18:1 Δ^9) sowie der Palmitinsäure (C16:0) zu verzeichnen ist [Zhekisheva *et al.*, 2002]. Die katalytische Funktion von *SAD* besteht in der Reduktion von Stearinsäure (C18:0) zu Ölsäure (C18:1 Δ^9), wodurch die erhöhte Expression von *SAD* begründet werden könnte.

Ma *et al.* zeigten, dass die Expression von *DGAT* und *FATA* in Abhängigkeit von weißer LED-Strahlung erhöht wurde, wobei die Expression von *DGAT2A* lediglich in Abhängigkeit blauer LED-Strahlung anstieg. Die Zunahme der relativen Transkriptabundanz von *DGAT2A* ging mit einem Anstieg der Konzentration von Ax-Estern einher, wodurch die Bedeutung des Enzyms während der Veresterungsprozesse verdeutlicht werden konnte [Ma *et al.*, 2018]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Expression von Genen der Fettsäure-Biosynthese in den Proben -N LL+C signifikante Unterschiede zu jenen der weiteren Ax-produzierenden Kulturen (+N HL+C, -N HL+C) aufwies. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die erhöhte Expression der Gene in den Kulturen -N LL+C nicht ausschließlich der Bereitstellung von Fettsäuren für die Ax-Modifikation dienen musste. Die Kultivierung von *H. pluvialis* unter nicht-induktiven Lichtbedingungen und Nitratmangel könnte demnach eine alternative biotechnologische Verwertung der Mikroalge zur Biosynthese von Fettsäuren darstellen. Weiterhin ergeben sich aus den Beobachtungen mögliche Ansätze, welche die Erarbeitung neuartiger Kultivierungsstrategien zur Optimierung der Ax-Ausbeute ermöglichen. Diesbezügliche Arbeiten von Niizawa *et al.* belegten, dass intrazelluläre Ax-Konzentrationen, in Abhängigkeit einer verzögerten Applikation des Nitratmangels und des Lichtstresses, um bis zu 25 % gegenüber Kulturen erhöht werden konnten, welche bei simultaner Applikation der Stressparameter kultiviert wurden [Niizawa *et al.*, 2018]. Die Kultivierung der Zellen bei geringen Lichtintensitäten in Abwesenheit von Nitrat bedingt eine effiziente photochemische Verwertung der eingestrahlten Lichtenergie, wodurch zunächst eine erhöhte Fettsäureproduktion gewährleistet werden könnte. Die zeitlich versetzte Applikation von Lichtstress würde im weiteren Verlauf die Expression von Genen der Ax-Biosynthese induzieren, wobei die niedrigen NPQ-Level sowie ein zyklischer Elektronentransport eine kontinuierliche Energiebereitstellung ermöglichen würden. Die entstehenden Ax-Moleküle könnten infolgedessen durch die Aktivität von *DGAT* mit Fettsäuren verestert werden, wodurch der von Chen *et al.* postulierte Prozess der Produktinhibierung durch hohe Konzentrationen freier Ax-Monomere unterbunden wäre [Chen *et al.*, 2015].

Eine abschließende Analyse der Genexpressionsänderung zeigte erneut, dass die molekularen Unterschiede zum überwiegenden Teil in den Ax-produzierenden Kulturen beobachtet werden konnten. Die Ergebnisse gingen aus einer Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis* (PCA)) hervor (vgl. Abb. 4.1). Das Ziel einer PCA besteht darin, die Hauptkomponenten einer Datenmatrix auf Grundlage der enthaltenen Informationen zu strukturieren, um Rückschlüsse auf wesentliche Unterschiede in den Matrizes zu erlangen [Pearson, 1901]. Es wurde gezeigt, dass die Kulturen insbesondere in Bezug auf die Expression ausgewählter Gene der Ax-Biosynthese (*PSY*, *BKT1*, *BKT2*, *CRTR-B*) sowie der durch *PTOX1* bzw. *PTOX2* vermittelten Stressantwort variable Regulationsmuster aufwiesen (vgl. Abb. 4.1). Die Beobachtungen deuten erneut auf die Verbindung von *PTOX* zur Biosynthese von Ax hin und verdeutlichen den wissenschaftlichen Fortschritt, welcher durch die Aufklärung der zugrundeliegenden Funktionen genannter Gene erlangt werden könnte. Ein möglicher Ansatz für die Aufklärung dieser Problematik könnte bspw. auf der Grundlage einer ungerichteten Proteom-Analyse basieren. Diesbezügliche Analysen der vorliegenden Arbeit zielten zusätzlich darauf ab, potentielle Proteine zu identifizieren, welche im Zuge des Übergangs der Mikroalge in ein nicht-mobiles, Ax-bildendes Zellstadium essentielle Funktionen erfüllen könnten.

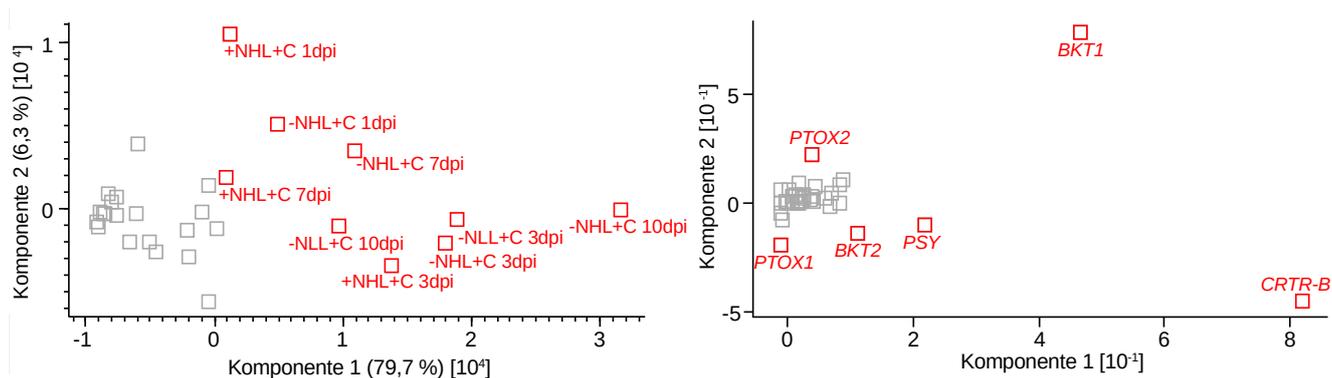


Abbildung 4.1: Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsunterschiede von *H. pluvialis* im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi)

Relative Expressionsänderungen ausgewählter Gene in *H. pluvialis* wurden mit qPCR-Analysen von Zellen ermittelt, welche in Abhängigkeit verschiedener Parameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO₂, Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt wurden (1 - 10 dpi, n = 3). Die Analyse relativer Expressionsunterschiede erfolgte in Bezug zu einer Kontrollprobe (+N LL+C). Die PCA wurde mit dem Programm Perseus erstellt. Es wurden die Hauptkomponenten (zelluläre Zustände (links), Gene (rechts)) mit den größten signifikanten Unterschieden dargestellt (Varianz > 95 %). Rot hervorgehoben sind Ax-produzierende Kulturen (links) bzw. essentielle Transkripte der Ax-Biosynthese und Stressantwort von *H. pluvialis* (rechts).

4.5 Ungerichtete Proteom-Analyse zeigt Stoffwechselübergänge und unbekannte Proteine

Proteom-Analysen ermöglichen es, vielfältige bioinformatische Informationen über metabolische Veränderungen von Organismen zu erlangen. Bisher wurde eine Vielzahl von Daten über die Veränderungen von *H. pluvialis* auf transkriptioneller und metabolischer Ebene in Abhängigkeit chemischer und physikalischer Einflüsse publiziert [Gwak *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2018]. Weiterhin wurden Variationen auf Proteom-Ebene untersucht, wobei auf eine posttranslationale Regulation von Enzymen des Ax-Metabolismus verwiesen wurde [Gao *et al.*, 2016]. Veränderungen auf Ebene des Proteoms von *H. pluvialis* wurden für spezifische Zellbestandteile (Zellwand, Thylakoidmembran) untersucht [Wang *et al.*, 2004(2); Gu *et al.*, 2014]. Die Proteom-Analyse unterschiedlicher zellulärer Zustände der Mikroalge eröffnete die Möglichkeit, unbekannte Proteine und Enzyme zu identifizieren, welche bspw. an morphologischen Umwandlungsprozessen der Zellen beteiligt sein könnten (vgl. Abschnitt 3.5). Es wurden vergleichende Analysen von Veränderungen der Abundanz spezifischer Transkripte und zugehöriger Proteine durchgeführt (vgl. Abb. 3.47). Hierbei wurde gezeigt, dass die Abundanz von Genprodukten des Carotinoid- und Fettsäure-Metabolismus sowie des C- und N-Metabolismus nicht-mobiler Zellen, verglichen zu mobilen und intermediären Zellen, erhöht war. Mobile Zellen hingegen wiesen eine erhöhte Abundanz von Transkripten bzw. Proteinen der Fettsäure-Biosynthese und Stressantwort auf. Weiterhin wurden Unterschiede der Transkript- und Protein-abundanzen in den unterschiedlichen zellulären Zuständen von *H. pluvialis* nachgewiesen. Die Effekte deuteten darauf hin, dass kurzlebige Transkripte in den Zellen effizient translatiert wurden, wohingegen erhöhte Transkriptmengen keine Zunahme relativer Peptidabundanzen bedingen mussten. Verminderte Transkriptmenge bei erhöhten Peptidabundanzen könnten darauf hinweisen, dass die Transkripte nach deren Translation degradiert werden, wohingegen die synthetisierten Proteine eine höhere Stabilität aufweisen. Im umgekehrten Fall wäre es möglich, von einer posttranskriptionellen Genregulation auszugehen, wodurch die Translation beeinflusst bzw. inhibiert werden könnte.

Zur Aufklärung möglicher Mechanismen wurden die Proteom-Daten auf Komponenten der RNA-Interferenz untersucht. In den Datensätzen mobiler und nicht-mobiler Zellen wurden Einträge von Argonautenproteinen identifiziert, welche während des posttranskriptionellen Regulationsmechanismus der RNA-Interferenz an der Ausbildung von *RNA-induced-silencing-complexes* (RISCs) beteiligt sind [Hutvagner und Sinard, 2008]. Molnár *et al.* verwiesen auf die Bedeutung der RNA-Interferenz bei der posttranskriptionellen Genregulation von *C. reinhardtii*, sodass die Relevanz des Mechanismus ebenfalls in *H. pluvialis* möglich wäre [Molnár *et al.*, 2007].

Weiterführend wurde ein Vergleich des gesamten Proteom-Datensatzes dreier zellulärer Subformen von *H. pluvialis* durchgeführt welcher ergab, dass der überwiegende Anteil der Proteine keine eindeutige funktionelle Zuordnung erhalten konnte (vgl. Abb 3.35). Die Analyse der Proteine mit einer erhöhten Abundanz in intermediären Zellen ergab, dass insbesondere Proteine aus den Kategorien der Proteinhomöostase, zellulärer Regulationsprozesse, Metabolit-Biosynthese und -Modifikation sowie dem Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsel identifiziert werden konnten. Dies könnte bspw. damit begründet werden, dass beim Übergang aus dem mobilen in ein nicht-mobiles Zellstadium physiologische und metabolische Variationen stattfinden, welche einer komplexen Regulation unterliegen. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass im Zuge des Umwandlungsprozesses insbesondere Proteine zur Aufrechterhaltung regulärer Zellfunktionen und Stoffwechselaktivitäten benötigt werden. Proteom-Analysen von *C. reinhardtii* zeigten, dass im Zuge der zellulären Stressantwort eine Reduktion der Abundanz einer Vielzahl von Proteinen nachweisbar war [Förster *et al.*, 2006; Mahong *et al.*, 2011]. Weiterhin wurde die *de-novo*-Proteinsynthese beobachtet, welche im Verlauf der Stressapplikation kontinuierlich anstieg [Mastrobuoni *et al.*, 2012]. Zusammenfassend konnte aus den Analysen intermediärer Zellen abgeleitet werden, dass im Zuge der Stressapplikation verstärkt regulatorische Veränderungen auf Proteom-Ebene resultierten. Die Zellen des Behandlungsregimes (+N HL+C) kennzeichneten sich durch eine hohe Proteindynamik sowie intermediäre Proteinlevel, welche durch die *de-novo*-Proteinsynthese und der Degradation synthetisierter Proteine begründet werden könnten.

Analysen von Wang *et al.* zeigten eine Reduktion der Abundanz von Proteinen der Photosynthese sowie der Stickstoffassimilation als Reaktion mobiler Zellen auf die Applikation von Eisen(II)-Ionen, Acetat und Lichtstress [Wang *et al.*, 2004(1)]. Die Analysen des Proteoms von *H. pluvialis* bestätigten die Beobachtungen dadurch, dass der überwiegende Teil abundanter Proteine des mobilen Zellstadiums den Kategorien der Photosynthese, der photosynthetischen CO₂-Fixierung (resp. Kohlenhydratstoffwechsel) sowie zellulären Regulationsprozessen zugeordnet werden konnte. Weitere Recherchen über die Funktionen von Einträgen der Kategorie Domänen-beinhaltende Proteine zeigten, dass Proteine der Redox-Regulation, zellulärer Transportprozesse sowie der Biosynthese isoprenoider Grundkörper über den MEP-Weg eine erhöhte Abundanz aufwiesen. Neben Proteinen des MEP-Weges wurden Enzyme initialer Schritte der Carotinoid-Biosynthese mit erhöhter Abundanz nachgewiesen, wodurch die Wichtigkeit des Carotinoid-Stoffwechsels für die photosynthetische Aktivität der Zellen belegt werden könnte. Die erhöhte Abundanz des Enzyms Stärke-Synthase (A0A6A0ADC2) in mobilen Zellen verwies auf die Akkumulation von Polysacchariden unter nicht-induktiven Bedingungen.

Anhand eines auf Transkriptom- und Metabolomdaten basierenden Modells wurde postuliert, dass die Kultivierung von *H. pluvialis* unter Nitratmangel und Lichtstress eine Veränderung der metabolischen Flussrichtung von Kohlenstoff bedingt. Im Zuge der Stressantwort wurde eine erhöhte Abundanz von Intermediaten des Citrat-Zyklus sowie ein Abbau von Stärke und die Bildung neuer Fettsäuren nachgewiesen [Recht *et al.*, 2014]. Die erhöhte Abundanz relevanter Transkripte des Citrat-Zyklus sowie der Abbau von Stärke zur Bildung neuer Fettsäuren könnte auf den Prozess der Kohlenstoff-Partitionierung hindeuten, welcher bereits auf Grundlage elektronenmikroskopischer Analysen von Wayama *et al.* postuliert wurde [Wayama *et al.*, 2013]. Die Proteom-Daten können diese These stützen. In nicht-mobilen Zellen wurden Enzyme mit erhöhter Abundanz identifiziert, welche am Abbau von Polysaccharidstrukturen beteiligt sein könnten (vgl. Teil C A0A699ZLG1, A0A6A0A525, A0A699ZLZ3).

Eine quantitative Proteom-Analyse der Thylakoidmembranen von *H. pluvialis* belegte, dass in Abhängigkeit von Lichtstress eine Reduktion von Proteinen der plastidären Elektronentransportkette, insbesondere des Cyt- b_6/f -Komplexes, resultiert [Gu *et al.*, 2014]. Auf Grundlage der Daten wurde postuliert, dass kein linearer Elektronentransport stattfinden kann, sodass die Produktion von Energie- und Redoxäquivalenten über alternative Mechanismen (z.B. Pentosephosphatweg) stattfinden muss. Die These stützte sich zusätzlich auf Daten von Wang *et al.*, welche eine erhöhte Aktivität von Proteinen des Pentosephosphatweges und der Glykolyse in Abhängigkeit oxidativer Stressbedingungen zeigten [Wang *et al.*, 2004(1)]. In intermediären und nicht-mobilen Zellen konnte die Reduktion der Abundanz von Proteinen des Cyt- b_6/f -Komplexes nur eingeschränkt bestätigt werden. Hingegen wurde eine erhöhte Abundanz von Proteinen des PS I, bei gleichzeitiger Reduktion struktureller Proteine des PS II, in nicht-mobilen Zellen nachgewiesen. Diese Beobachtungen verwiesen erneut auf die Relevanz des zyklischen Elektronentransportes in Zellen des nicht-mobilen Stadiums von *H. pluvialis*. Die durch Recht *et al.* beschriebene Erhöhung der Abundanz von Transkripten und Intermediaten grundlegender Schritte des C-Metabolismus konnte weder auf Proteom- noch auf Transkriptom-Ebene bestätigt werden [Recht *et al.*, 2014]. Dennoch wurde eine erhöhte Abundanz des Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Pentosephosphatweges katalysiert, in Abhängigkeit induktiver Bedingungen (-N HL+C) gezeigt. Der von Recht *et al.* postulierte Mechanismus könnte ebenfalls eine entscheidende Funktion bei der Bereitstellung von Redoxäquivalenten im Zuge des morphologischen Umwandlungsprozesses der Zellen darstellen. Die Autoren verwiesen auf einen Widerspruch der These in Bezug auf die von Chen *et al.* nachgewiesene Erhöhung der Abundanz des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO), welche mit ansteigenden Ax-Konzentrationen der Zellen korrelierte [Chen *et al.*, 2012]. Die Transkriptom- und Proteom-Daten der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse unabhängig vom zellulären Status bestätigen. Eine erhöhte Aktivität von RuBisCO würde in Abhängigkeit eines verminderten photosynthetischen Elektronentransportes eine stöchiometrische Entkopplung der lichtabhängigen und lichtunabhängigen Reaktion der Photosynthese bedingen. Für die Interpretation muss berücksichtigt werden, dass im Zuge der Stoffwechselprozesse die Synthese von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat gewährleistet werden muss. Die Intermediate sind essentiell für die Biosynthese von Ax und die zur Veresterung notwendigen Fettsäuren.

Der Mengenbedarf an C-3-Körpern könnte auf Grundlage der Aminosäuredegradation gewährleistet werden. Hu *et al.* konnten eine Reduktion der Konzentration von Aminosäuren in Abhängigkeit von Lichtstress in *H. pluvialis* nachweisen [Hu *et al.*, 2020]. Die vorliegenden Proteom-Daten wiesen auf die Existenz von Aminotransferasen (A0A699ZV99, A0A6A0AIW1, A0A699YSG9) sowie aminosäurespezifischer Hydrolasen (A0A699YHS4) und Acetyltransferasen (A0A699YD62, A0A6A0A2H6) hin, welche den Aminosäureabbau und die Bereitstellung der C-3-Körper gewährleisten könnten.

In phototrophen Organismen wie Mikroalgen existieren Redox-Systeme, welche die Erkennung und den Abbau von ROS gewährleisten. ROS können zu irreversiblen Modifikationen von Makromolekülen führen und Schädigungen des Metabolismus verursachen [Ugya *et al.*, 2020]. Andererseits verfügen ROS über stimulierende Eigenschaften und konnten im Zuge der Ax-Biosynthese von *H. pluvialis* als Mediatoren regulatorischer Prozesse nachgewiesen werden [Kobayashi *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2008]. Die Entstehung von ROS kann bspw. durch eine Elektronensättigung von Photosystemen in Abhängigkeit von Lichtstress resultieren. Im Vorfeld wurden Mechanismen diskutiert, welche den schädigenden Einfluss von erhöhten Lichtintensitäten unterbinden könnten. Hierbei wurde insbesondere auf die transkriptionelle Co-Stimulation von *PTOX1* und *PTOX2* im Zusammenhang mit der Ax-Biosynthese, in Kombination mit einem zyklischen Elektronentransport der Photosysteme, hingewiesen. Die Ergebnisse der vorliegenden Proteom-Analysen ergaben, dass *PTOX1* und *PTOX2* (A5GZV5, A8HK50) mit einer erhöhten Abundanz in mobilen Zellen von *H. pluvialis* nachgewiesen werden konnten. Weiterhin wurden Proteine des Glutathion-Systems sowie des Peroxiredoxin-Thioredoxin-Systems in mobilen und nicht-mobilen Zellen nachgewiesen. Beide Systeme dienen dem Abbau von ROS und könnten Funktionen in *H. pluvialis* erfüllen [Cejudo *et al.*, 2021]. In mobilen Zellen könnten diese den Schutz von Photosystemen durch den Abbau von ROS gewährleisten und den Redox-Status, der im Stroma lokalisierten Enzyme des Calvin-Zyklus, in Abhängigkeit der Lichtverfügbarkeit regulieren. Die Mechanismen konnten in Studien zu den Funktionen in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden [Cejudo *et al.*, 2019]. Im Rahmen der Ax-Akkumulation nicht-mobiler Zellen hingegen könnten die Systeme der Regulation intrazellulärer ROS-Konzentrationen dienen und eine kontrollierte ROS-vermittelte Signaltransduktion gewährleisten. Die Hypothesen basieren auf den Arbeiten von Kobayashi *et al.*, welche den direkten Einfluss von ROS auf die Ax-Biosynthese nachweisen konnten [Kobayashi *et al.*, 1993]. Arbeiten von Li *et al.* verwiesen auf Mechanismen, welche ROS als direkte Substrate für die Ax-Biosynthese postulierten und weiterhin die ROS-vermittelte Aktivierung der Carotinoid-Biosynthese beschrieben [Li *et al.*, 2008]. Die vorliegenden Analysen konnten Hinweise auf die Funktionen des Glutathion- und Peroxiredoxin-Thioredoxin-Systems in *H. pluvialis* geben, welche in zukünftigen Forschungsarbeiten untersucht werden könnten.

In nicht-mobilen Zellen konnten Proteine identifiziert werden, welche am Aufbau von Membran- und Matrixstrukturen beteiligt sein könnten. Die potentiellen Funktionen der Proteine (Expansin, Pherophorin) wurden auf Grundlage von Informationen aus phototrophen Organismen abgeleitet und diskutiert. Expansine gewährleisten neben der Stabilität der pflanzlichen Zellwand deren Plastizität. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Proteine an vielfältigen stoffwechselphysiologischen Prozessen von Pflanzen beteiligt sind [Marowa *et al.*, 2016].

Eine Funktion der Proteine in *H. pluvialis* könnte darin bestehen, die Stabilität der Zellwand während der zellulären Expansions und der einhergehenden Volumenzunahme zu gewährleisten. Pherophorine hingegen sind Matrix-Glykoproteine, welche am Aufbau der extrazellulären Matrix von Vertretern der Ordnung Chlamydomonadales beteiligt sind. Nicht-mobile Zellen von *H. pluvialis* kennzeichnen sich durch einen komplexen Aufbau extrazellulärer Matrixbestandteile deren Konstitution durch die Funktionen der Pherophorine (Quervernetzung und Polysaccharidbindung) beeinflusst werden könnte [Hallmann, 2006].

Weiterhin wurde eine erhöhte Abundanz des Proteins *Oil globule associated protein* nachgewiesen, welche im Vorfeld auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden konnte (*HOGP*). Die Proteine wurden erstmals von Peled *et al.* aus Lipidtröpfchen von *H. pluvialis* isoliert und konnten in Abhängigkeit unterschiedlicher Stressfaktoren induziert werden [Peled *et al.*, 2011]. Es wird angenommen, dass diese die Stabilität der Lipidtröpfchen gewährleisten. Die Lipidtröpfchen werden im Zuge der gesteigerten Ax-Biosynthese, ausgehend von der Membran des ER durch die Interaktion mit den Plastiden gebildet und dienen der finalen Deposition synthetisierter Ax-Ester [Murphy, 2001; Pick *et al.*, 2018]. Die Umwandlung von β -Carotin zu Ax findet laut den Angaben von Grünewald und Hagen im ER der Zellen statt [Grünewald und Hagen, 2001]. Die Annahmen wurden durch Analysen zur intrazellulären Lokalisation von β -Carotin und Ax bestätigt [Collins *et al.*, 2011]. Diese zeigten, dass β -Carotin sowohl im Chloroplasten als auch in den Lipidtröpfchen lokalisiert ist, wohingegen Ax ausschließlich in Lipidtröpfchen nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass hohe intrazelluläre Konzentrationen freier Ax-Monomere die Biosynthese von Carotinoiden im Plastiden der Zellen inhibieren [Chen *et al.*, 2015]. Auf Grundlage dieser Hypothese könnte angenommen werden, dass freie Ax-Monomere aus dem ER in den Plastiden transportiert werden müssten. Zum derzeitigen Stand der Forschung existiert kein bekannter Mechanismus, welcher den Hin- und Rücktransport von Carotinoiden über plastidäre Membranen beschreibt. Wie zuvor diskutiert wurde, verwiesen Roth *et al.* auf die erhöhte Expression von ABC-Transportern in Ax-produzierenden Zellen von *C. zofingiensis* [Roth *et al.*, 2017]. In den vorliegenden Proteom-Analysen wurde eine Vielzahl von ABC-Transportern mit einer erhöhten Abundanz in individuellen zellulären Zuständen von *H. pluvialis* nachgewiesen. Die Ergebnisse ermöglichen es, eine auf Transkriptom- und Proteom-Daten basierte Hypothese aufzustellen, welche den aktiven Transport von Carotinoiden über die plastidäre Membran unter Beteiligung von ABC-Transportern postuliert. Die Identifikation eines carotinoidspezifischen Transportsystems würde einen Meilenstein in der naturwissenschaftlichen Erschließung des stressinduzierten Sekundärmetabolismus phototropher Organismen darstellen. Carotinoide erfüllen Funktionen im Zuge der zellulären Stressantwort und sind strukturell am Aufbau von Photosystemen und intrazellulärer Membranen beteiligt [Pick *et al.*, 2018].

In einer Publikation von Mascia *et al.* wurde postuliert, dass steigende intrazelluläre Ax-Konzentrationen eine Destabilisierung von PS I und II bedingen. Die Hypothese basiert auf dem Nachweis von Ax im Plastiden, welches durch das am Aufbau der Photosysteme beteiligte β -Carotin ausgetauscht wird und ebenfalls auf den Transport von Ax über die Plastidenmembran hinweisen könnte [Mascia *et al.*, 2017]. Alternativ wäre es möglich, dass eine Umwandlung von β -Carotin im Plastiden erfolgt. Es wurde gezeigt, dass Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme) strukturelle Ähnlichkeiten zu BKT und CRTR-B aufweisen.

Diese katalysieren die finale Umwandlung von β -Carotin zu Ax (BKT/CYP: Ketolase-Funktion und CRTR-B/CYP: Hydroxylase-Funktion) [Cui et al., 2013; Schoefs et al., 2001]. Die Existenz von CYP-Enzymen in *H. pluvialis* konnte anhand des Proteom-Datensatzes bestätigt werden (vgl. J7I854, J9R016, J9R4T0 Teil C). Datenbankinformationen verweisen mitunter auf die intrazelluläre Lokalisation der Enzyme im Plastiden. Die diskutierten Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit anschließender Analysen zur Charakterisierung der Funktionen und Lokalisation der Proteine in der Mikroalge. Die mögliche Funktion der Proteine ist abschließend in Abb. 4.2 dargestellt. Eine erhöhte Abundanz von CYP-Enzymen und ABC-Transportern, welche in Abhängigkeit definierter Kultivierungsparameter synthetisiert werden, könnte auf die Identifikation bisher unbekannter Komponenten der Ax-Biosynthese in *H. pluvialis* hindeuten.

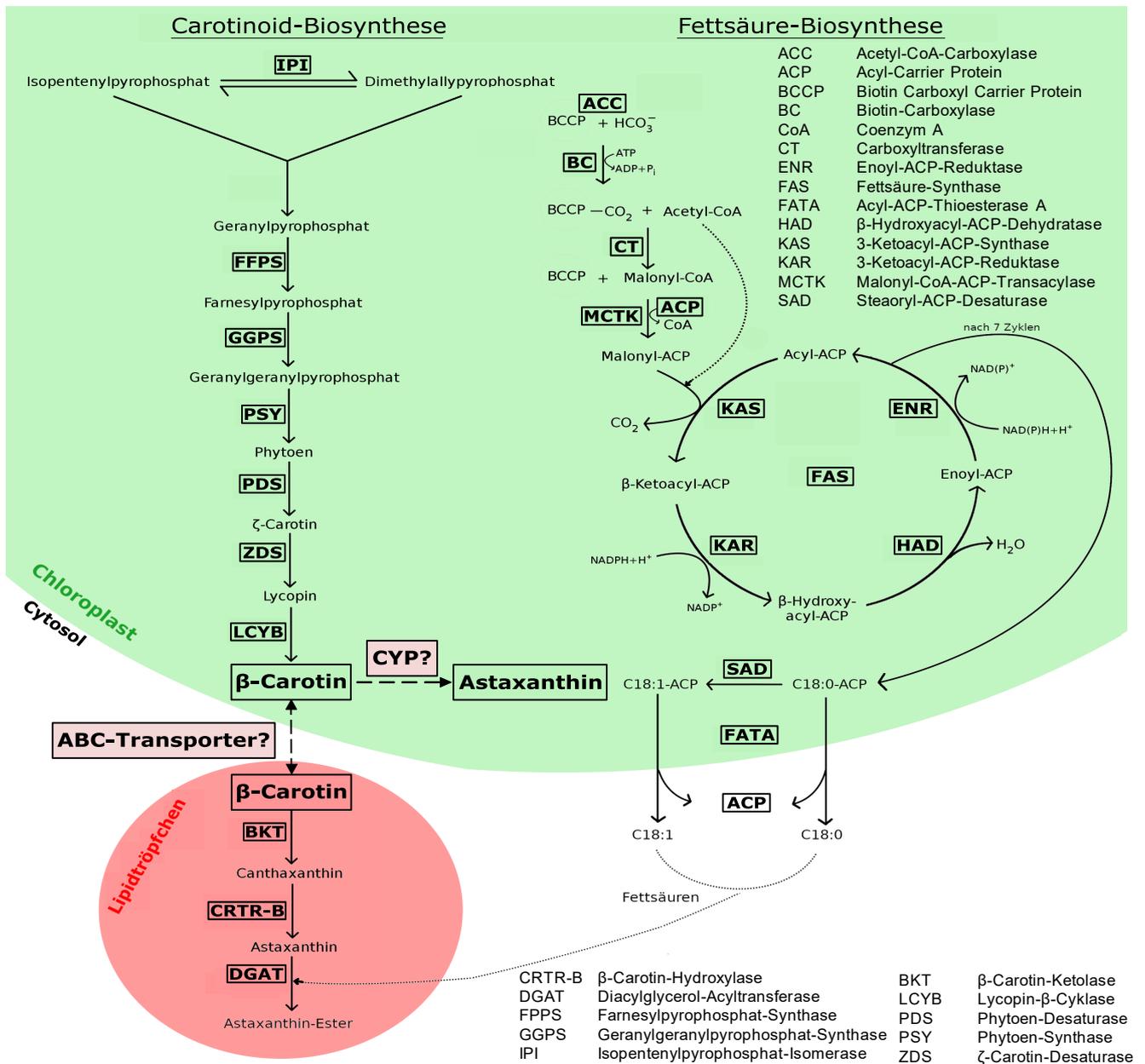


Abbildung 4.2: Postulierte Funktionen von ABC-Transportern und CYP-Enzymen in *H. pluvialis*

Schema der Ax- und Fettsäure-Biosynthese von *H. pluvialis*. Angabe möglicher Funktionen von ABC-Transportern und CYP-Enzymen bei der Ax-Biosynthese. ABC-Transporter könnten als Translokatoren den intrazellulären Transport von β -Carotin zwischen den Chloroplasten und den Lipidtröpfchen der Zellen regulieren. Plastidär codierte CYP-Enzyme könnten an der intraplastidären Umwandlung von β -Carotin zu Ax beteiligt sein.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Mikroalge *H. pluvialis* gilt als die reichhaltigste natürliche Quelle des sekundären Keto-Carotinoids Ax, welches eine Vielzahl gesundheitsfördernder Eigenschaften aufweist und ein hochwertiger Sekundärmetabolit für die grüne Biotechnologie ist. Die Biosynthese des Wertstoffes Ax kann in *H. pluvialis* durch physikalische und chemische Stressfaktoren induziert werden, wodurch eine intrazelluläre Anreicherung auf bis zu 5,9 % der BTS erzielt werden kann. Die Ax-Produktion geht mit morphologischen und physiologischen Veränderungen der Zellen einher, welche auf molekulare Regulationsmechanismen zurückgeführt werden können. Eine vollständige Aufklärung der zugrundeliegenden Interaktionsnetzwerke ist bisher nicht erfolgt.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit verfolgten das Ziel, physiologische und molekulare Veränderungen im Zuge des Übergangs von *H. pluvialis* in das nicht-mobile, Ax-bildende Zellstadium zu analysieren. Ein experimenteller Versuchsaufbau wurde etabliert, unter dessen Verwendung zelluläre Veränderungen reproduzierbar abgebildet werden konnten. Es wurde gezeigt, dass die individuelle Applikation von Lichtstress bzw. Nitratmangel im Kulturmedium zur Induktion der Ax-Biosynthese führte, woraus zusätzlich Veränderungen der photosynthetischen Zellaktivität und weiterer physiologischer bzw. molekularer Marker resultierten. Die simultane Applikation der Stressfaktoren bedingte eine Verdopplung intrazellulärer Ax-Konzentrationen, welche mit einem Expressionsanstieg von Genen des Ax- und Fettsäuremetabolismus einhergingen. Die transkriptionellen Veränderungen konnten auf Proteom-Ebene bestätigt werden. Zusätzlich wurden Unterschiede relativer Transkript- bzw. Proteinabundanzen in mobilen, intermediären und nicht-mobilen Zellen von *H. pluvialis* beobachtet, welche auf posttranskriptionelle und posttranslationale Regulationsmechanismen hindeuteten.

Weitere Analysen ergaben, dass in mobilen und nicht-mobilen Zellen von *H. pluvialis* abundante Proteine der Redox-Regulation existieren, welche bisher unbekannte Funktionen im Zuge der Ax-Biosynthese vermitteln könnten. Zusätzlich wurden ABC-Transportproteine identifiziert, welche bspw. den Transport von Carotinoiden über plastidäre Membranstrukturen gewährleisten könnten. Der Transportmechanismus von β -Carotin aus dem Plastiden stellt einen essentiellen Schritt der Ax-Biosynthese dar und konnte bislang nicht eindeutig aufgeklärt werden.

Es wäre möglich, dass die finale Umwandlung von β -Carotin zu Ax durch die Aktivität plastidär codierter CYP-Enzyme gewährleistet werden könnte, wodurch die bisherigen Annahmen über die temporäre und lokale Regulation der Ax-Biosynthese überdacht werden müssten. Die funktionelle Charakterisierung der Proteine könnte das molekulare Verständnis über die Ax-Biosynthese von *H. pluvialis* erweitern. Neben dem theoretischen Wissenszuwachs könnten die Ergebnisse aus biotechnologischer Sicht eine Optimierung der Ax-Bildungsraten von *H. pluvialis*-Kulturen durch die gezielte Anpassung von Prozessparametern gewährleisten.

6 Summary and Outlook

The microalga *H. pluvialis* is a rich natural source of the secondary keto-carotenoid ax, which has a variety of health-stimulating properties and is an important secondary metabolite for green biotechnology. The biosynthesis of the valuable substance Ax can be induced in the microalga by physical and chemical stress factors, and an intracellular accumulation of up to 5.9 % per dry weight of the microalga can be achieved. In the course of ax production, morphological and physiological changes take place, which can be traced back to molecular regulatory mechanisms. Up to now the underlying interaction networks have not yet been fully understood.

The experiments of the present work pursued the goal of being able to simulate and analyze physiological and molecular changes in the course of the transition of *H. pluvialis* to the non-motile, ax-forming cell stage. An experimental set-up was established which was used to reproducibly induce and analyze cellular changes. It was shown that individual application of light stress or nitrate deficiency in the culture medium led to the induction of ax biosynthesis, which also resulted in changes of photosynthetic cell activity and further profound differences at the physiological and molecular level. The simultaneous application of these stress factors caused doubling of intracellular ax concentrations, which was accompanied by an increased expression of genes of the ax and fatty acid metabolism. These transcriptional changes could also be confirmed on the level of proteome. In addition differences in relative transcript and protein abundances in motile, intermediate and non-motile cells of *H. pluvialis* were observed, which indicate post-transcriptional and post-translational regulatory mechanisms.

Further analyses showed that abundant proteins of redox regulation existed in motile and non-motile cells of *H. pluvialis*, which could convey previously unknown functions in the course of ax biosynthesis. In addition ABC transport proteins were identified which, for example, could ensure the transport of carotenoids across plastid membrane structures. The transport mechanism of β -carotene from the plastid is an essential step in ax biosynthesis and has not been entirely elucidated, yet. It is possible that the final conversion of β -carotene to ax could be ensured by the activity of plastid-encoded CYP enzymes, which would require reconsideration of the previous assumptions about the temporary and local regulation of ax biosynthesis. Functional characterization of these proteins could expand the molecular understanding of ax biosynthesis in *H. pluvialis*. From a biotechnological point of view, the results could possibly ensure an optimization of ax formation rates in *H. pluvialis* cultures through the specific adjustment of process parameters.

7 Anhang

7.1 Anhang Abbildungen

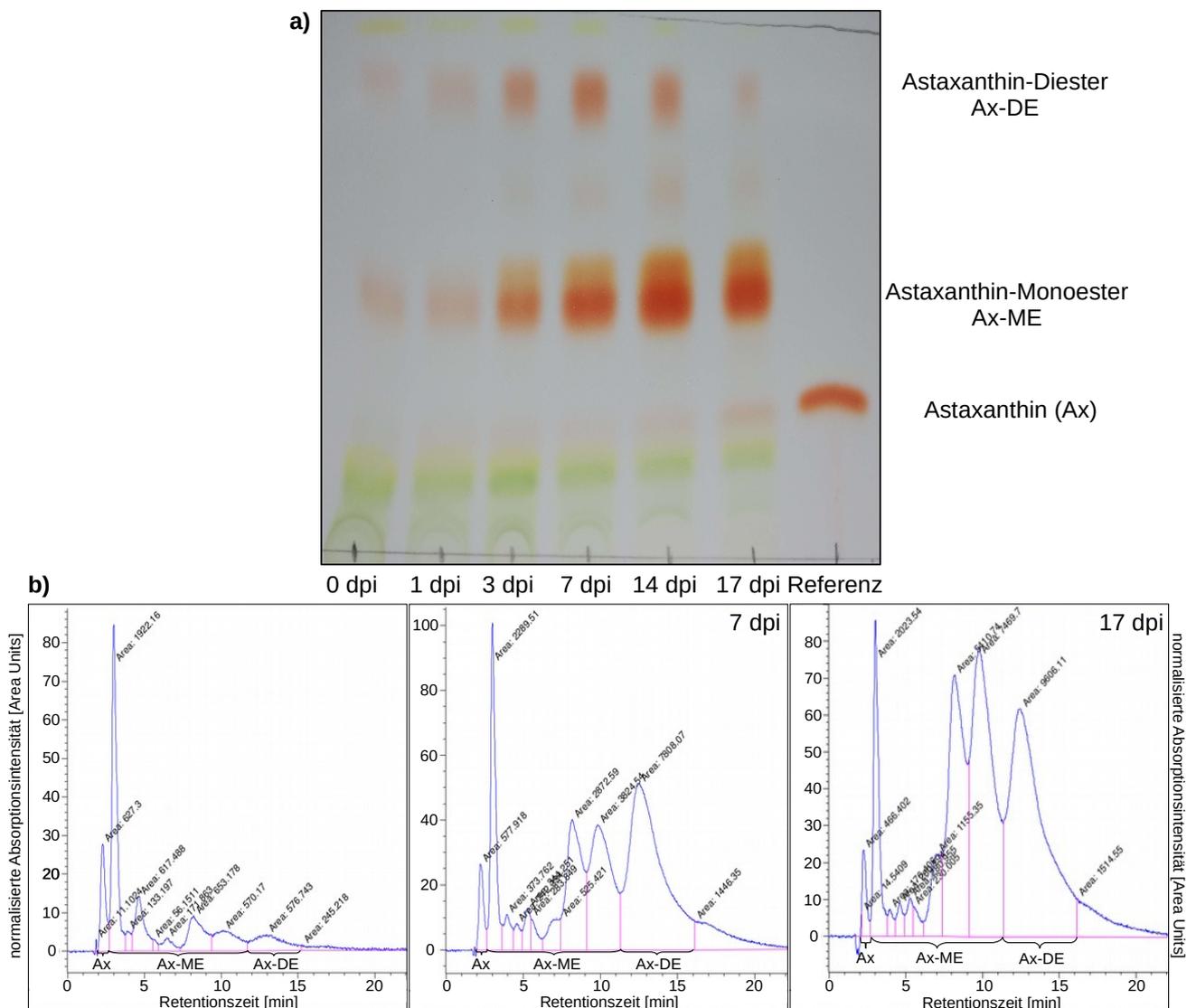


Abbildung 7.1: Chromatografische Identifikation von Ax und verschiedenen Ax-Derivaten

Carotinoidepektrum von *H. pluvialis* in Abhängigkeit von Nitratmangel im Kulturmedium und Lichtstress (-N HL+C). Proben wurden gemäß der Angaben in Abschnitt 2.2.6 vorbereitet und mit Hilfe verschiedener chromatografischer Analysen hinsichtlich der enthaltenen Ax-Derivate im zeitlichen Verlauf der Kultivierung analysiert. a) Ergebnisse einer DC unter Verwendung eines Laufmittels bestehend aus Aceton und Cyclohexan (3:7). b) HPLC-Spektrum unter Verwendung eines Laufmittels bestehend aus Methanol:1-Propanol:Aceton (75:20:5) bei einer Durchflussrate von 1,7 ml/min, Säule: Reversed-Phase C18 mit Vorsäule, Detektion: DAD bei 450 nm. Die Retentionszeit des analysierten Ax-Standards betrug unter Verwendung des angegebenen Protokolls 2,14 min.

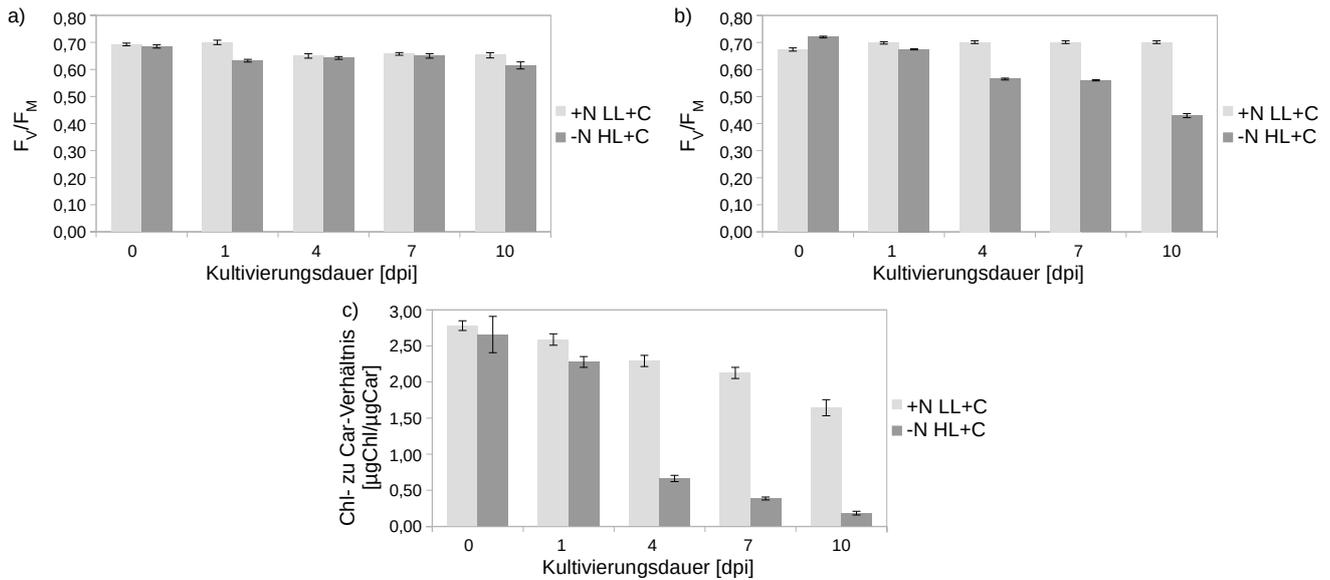


Abbildung 7.2: F_v/F_m -Werte und Chl- zu Car-Verhältnis von *H. pluvialis* in Abhängigkeit von Kultivierungsbedingungen und Messsystemen

F_v/F_m -Werte und Chl- zu Car-Verhältnis von *H. pluvialis* in Abhängigkeit induktiver (-N HL+C) und nicht-induktiver (+N LL+C) Kultivierungsbedingungen. F_v/F_m -Werte wurden unter Verwendung verschiedener Messsysteme ermittelt. Für die Messungen wurden 6×10^5 Zellen auf Filtermembranen immobilisiert und dunkeladaptiert. a) F_v/F_m -Werte mit Messsystem FluorCam. b) F_v/F_m -Werte mit Messsystem Imaging-PAM Fluorometer (c) Chl- zu Car-Verhältnis. Diagramme in a), b) und c) zeigen Analysegrößen während der Kultivierung von *H. pluvialis* unter induktiven und nicht-induktiven Bedingungen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei technischen Replikaten.

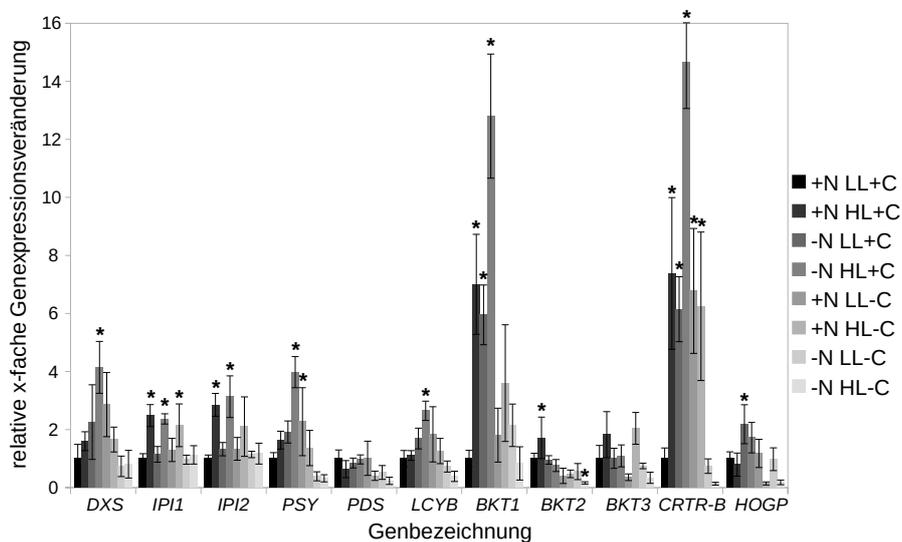


Abbildung 7.3: Expression ausgewählter Gene der Carotinoid-Biosynthese in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (7 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Carotinoid-Biosynthese (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 7 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellem ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.1.1 - 3.1.11 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

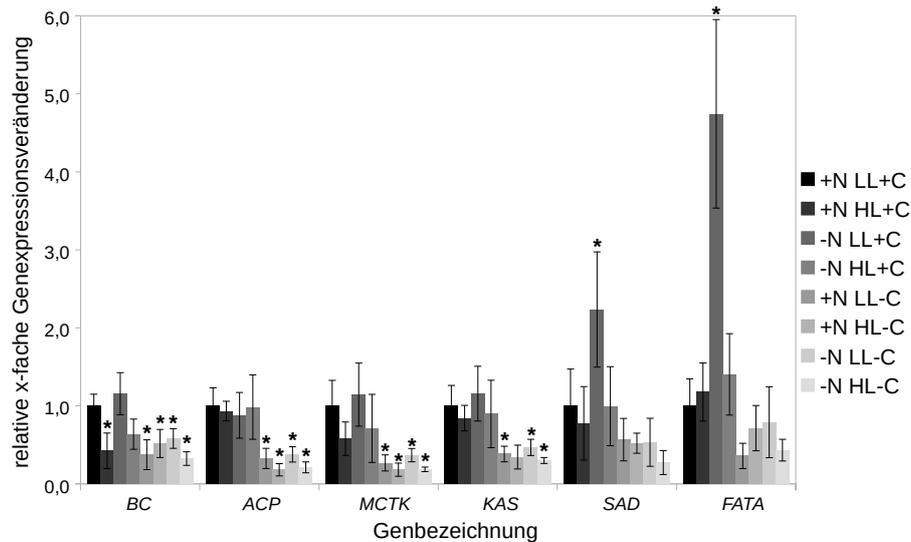


Abbildung 7.4: Expression ausgewählter Gene des Fettsäurestoffwechsels in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (3 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_t -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte des Fettsäurestoffwechsels (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 3 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; $* p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.2.1 - 3.2.6 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

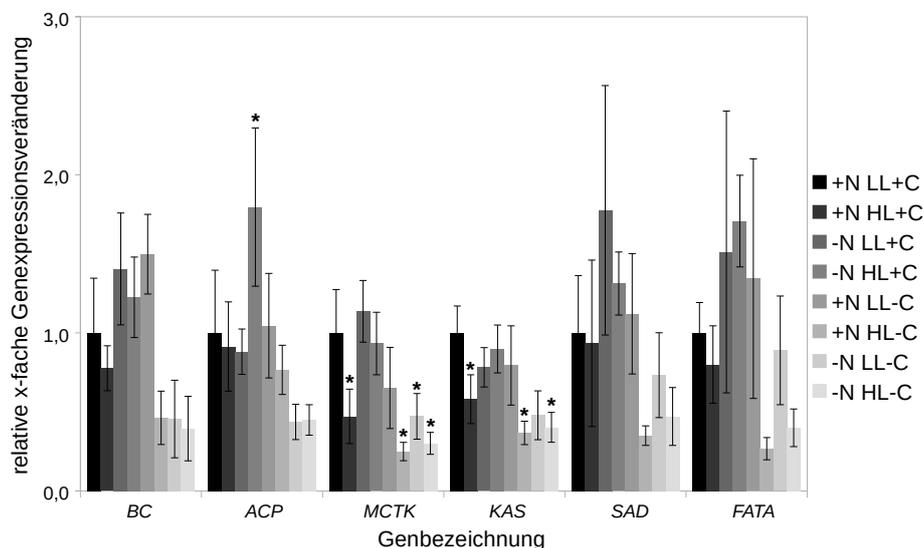


Abbildung 7.5: Expression ausgewählter Gene des Fettsäurestoffwechsels in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (7 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_t -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte des Fettsäurestoffwechsels (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 7 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; $* p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.2.1 - 3.2.6 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

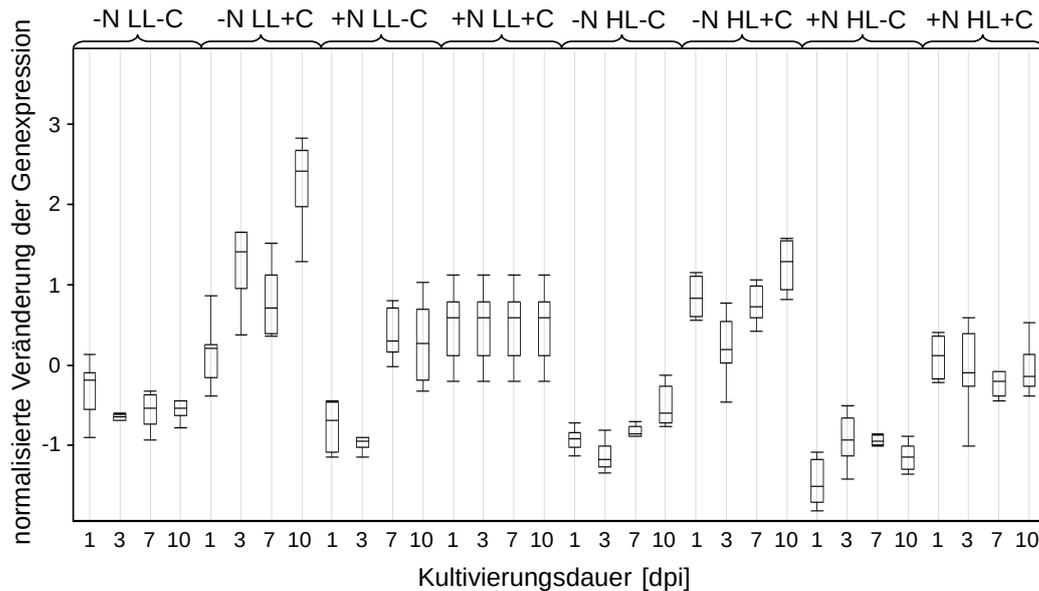


Abbildung 7.6: Expressionsprofile ausgewählter Gene des Fettsäurestoffwechsels in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi)

Häufigkeitsverteilung normalisierter Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die mit Hilfe eines Z-Scorings normalisierten ddC_t -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Veränderung der Gesamtheit relevanter Transkripte des Fettsäurestoffwechsels (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf unabhängiger Experimentalreihen (1 - 10 dpi). Aus den gemittelten ddC_t -Werten der Transkripte wurde eine Häufigkeitsverteilung erstellt und für die Visualisierung der dargestellten Box-Plots verwendet ($n = 3$).

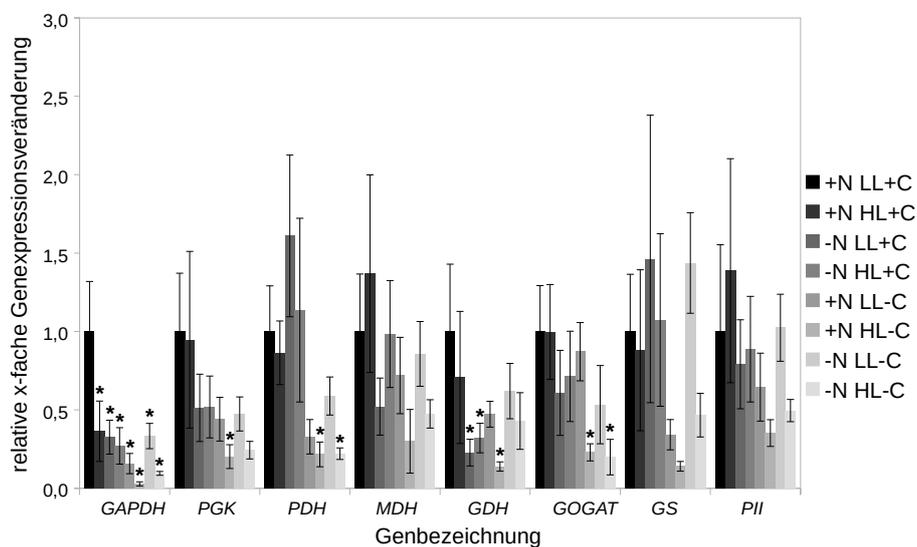


Abbildung 7.7: Expression ausgewählter Gene des C- und N-Metabolismus in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (3 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_t -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte des C- und N-Metabolismus (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 3 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellem ANOVA (Tukey-HSD; $*p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.3.1 - 3.3.8 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

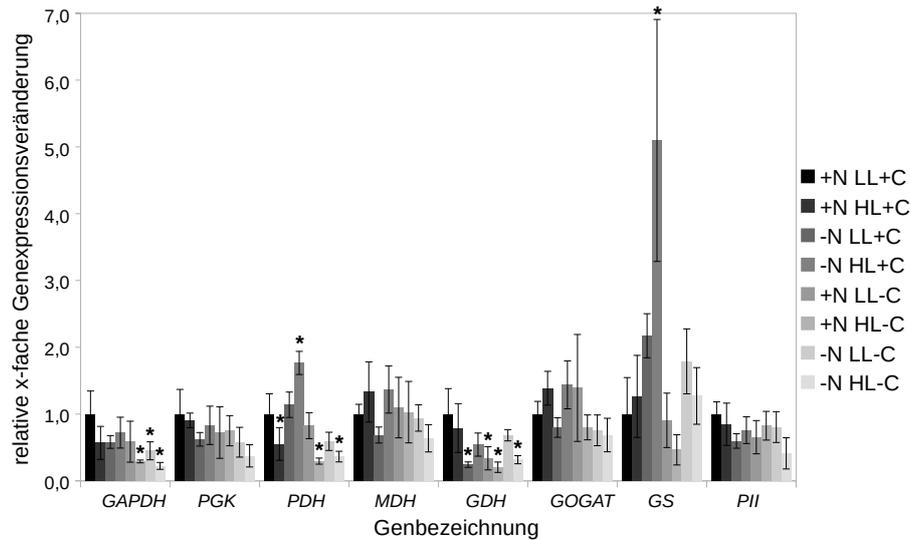


Abbildung 7.8: Expression ausgewählter Gene des C- und N-Metabolismus in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (7 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte des C- und N-Metabolismus (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 7 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellem ANOVA (Tukey-HSD; $*p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.3.1 - 3.3.8 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

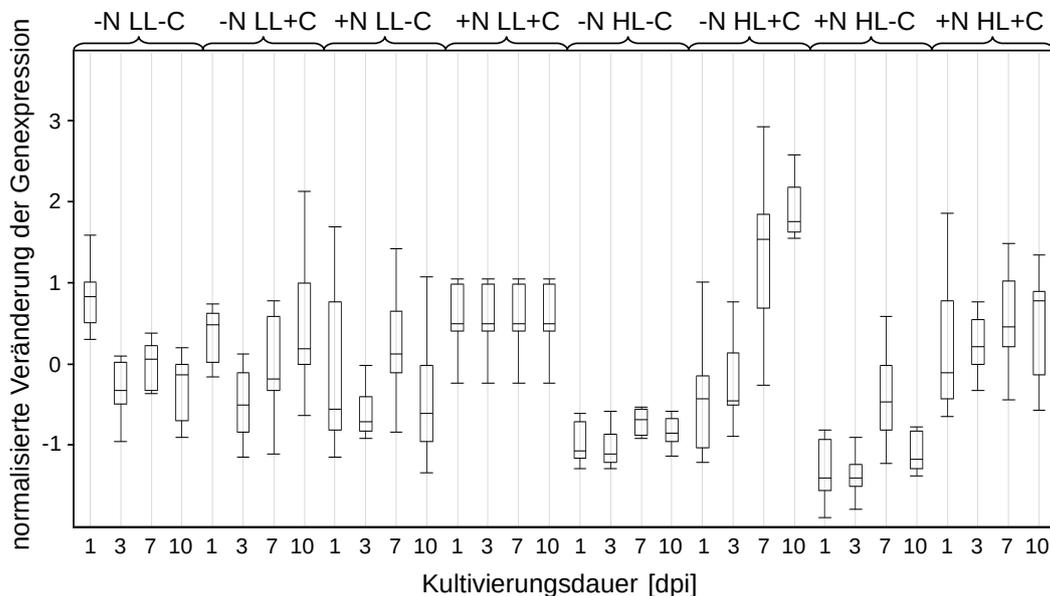


Abbildung 7.9: Expressionsprofile ausgewählter Gene des C- und N-Metabolismus in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi)

Häufigkeitsverteilung normalisierter Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die mit Hilfe eines Z-Scorings normalisierten ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Veränderung der Gesamtheit relevanter Transkripte des C- und N-Metabolismus (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) im zeitlichen Verlauf unabhängiger Experimentalreihen (1 - 10 dpi). Aus den gemittelten ddC_T -Werten der Transkripte wurde eine Häufigkeitsverteilung erstellt und für die Visualisierung der dargestellten Box-Plots verwendet ($n = 3$).

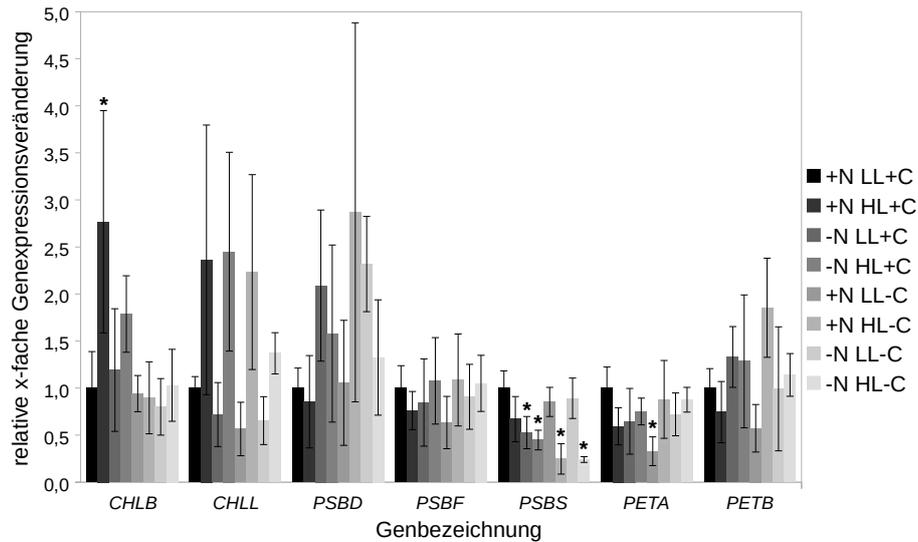


Abbildung 7.10: Expression ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (3 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Chlorophyll- und Photosynthese (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 3 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.4.1 - 3.4.7 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

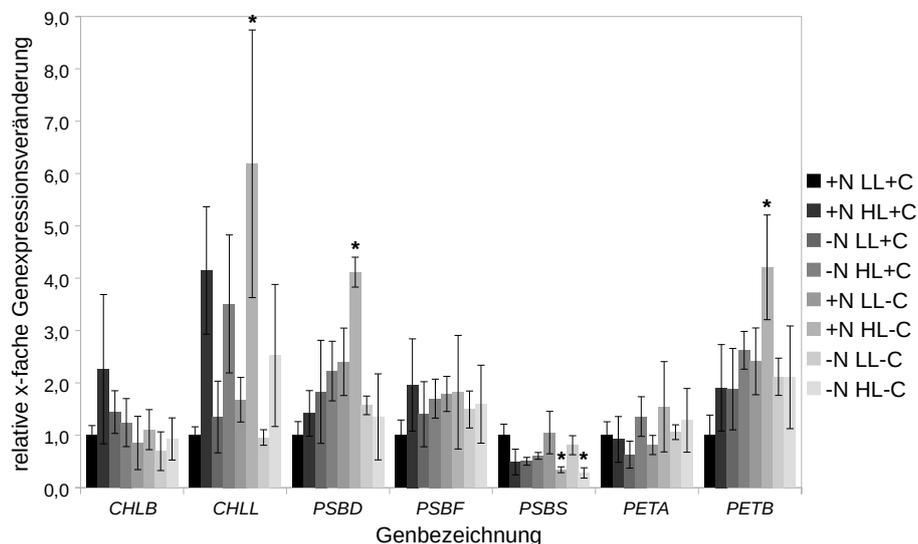


Abbildung 7.11: Expression ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (7 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Chlorophyll- und Photosynthese (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 7 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienen. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen allen dargestellten Proben kann Abschnitt 3.4.1 - 3.4.7 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

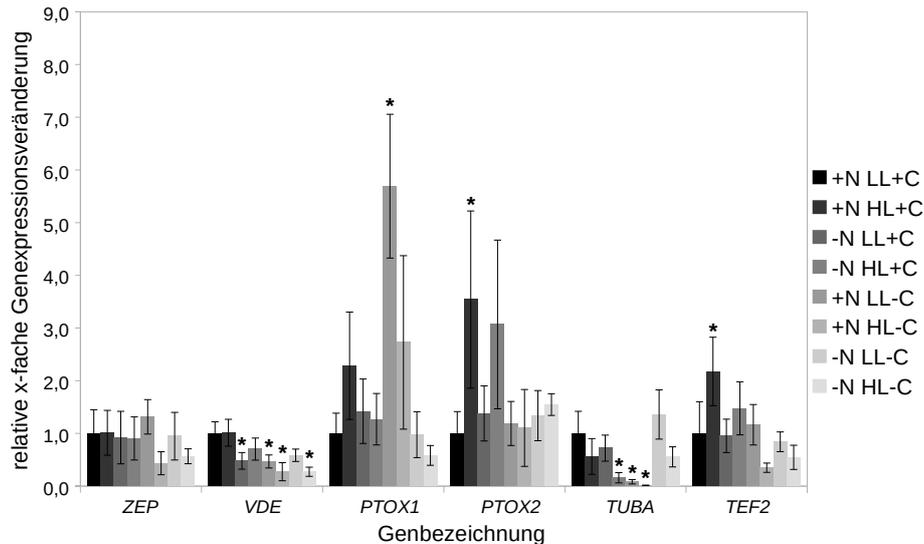


Abbildung 7.12: Expression ausgewählter Gene der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (3 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 3 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede aller Proben kann Abschnitt 3.5.1 - 3.5.6 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

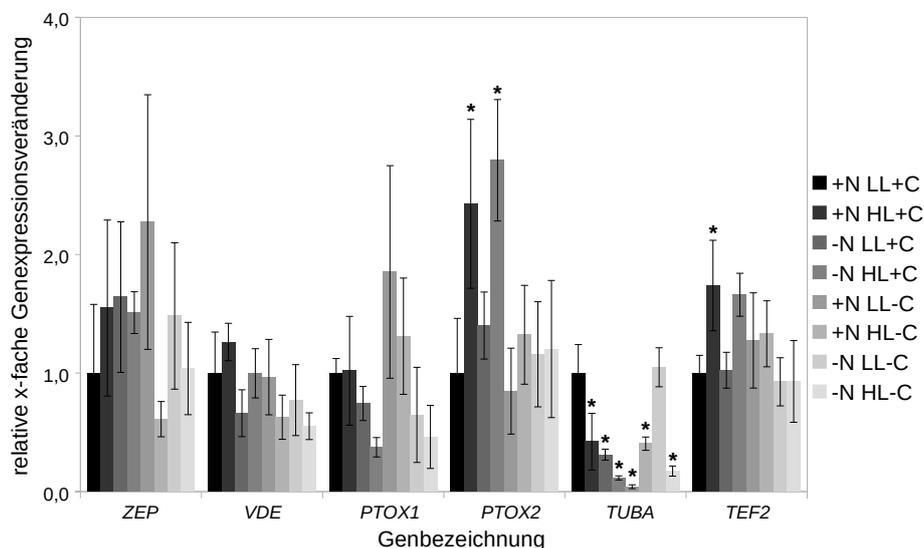


Abbildung 7.13: Expression ausgewählter Gene der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (7 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 7 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellen ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede aller Proben kann Abschnitt 3.5.1 - 3.5.6 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

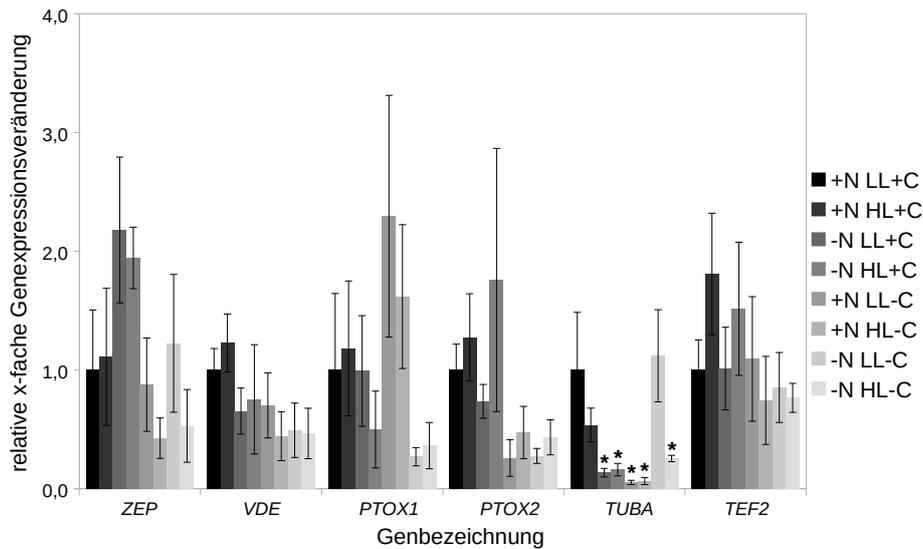


Abbildung 7.14: Expression ausgewählter Gene der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse in *H. pluvialis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (10 dpi)

Relative Transkriptabundanz von *H. pluvialis* anhand von qPCR-Experimenten. Die ddC_T -Werte verschiedener Amplifikate repräsentieren die relative Abundanz relevanter Transkripte der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse (ermittelt nach Abschnitt 2.2.16). Die quantitative Analyse der Transkriptabundanz erfolgte in acht verschiedenen Proben und in Abhängigkeit der Kombination unterschiedlicher Prozessparameter (Nitratmangel im Kulturmedium, Begasung mit CO_2 , Applikation verschiedener Beleuchtungsregime) zum Zeitpunkt 10 dpi. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei BR. Statistische Unterschiede basieren auf einer einfaktoriellem ANOVA (Tukey-HSD; * $p \leq 0,05$), wobei die zur Normalisierung der Daten verwendeten Proben des Behandlungsregimes +N LL+C als Bezugswerte dienten. Eine vollständige Auswertung der statistischen Unterschiede aller Proben kann Abschnitt 3.5.1 - 3.5.6 des statistischen Anhangs (Teil B) entnommen werden.

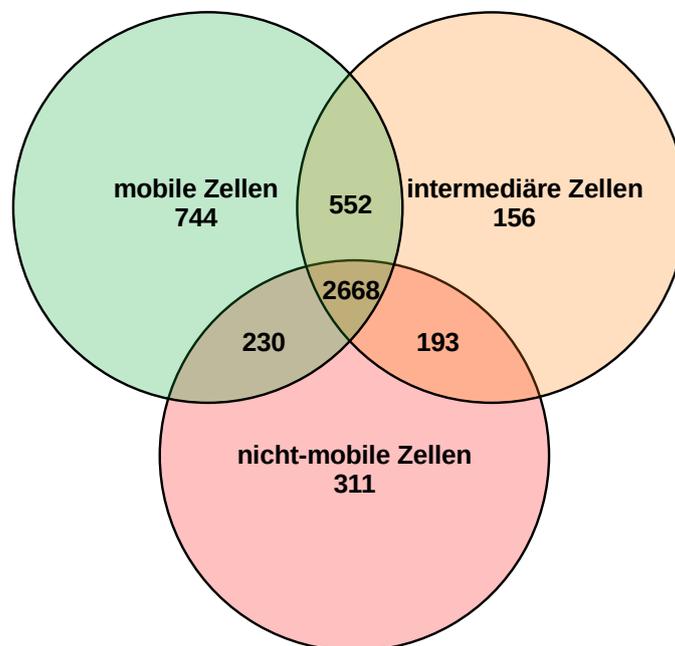


Abbildung 7.15: Mengenverteilung von Proteinen in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von *H. pluvialis*

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Überschneidungsmengen geben die Anzahl identischer Proteine an, welche unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert wurden. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. einem BR nachgewiesen werden konnten.

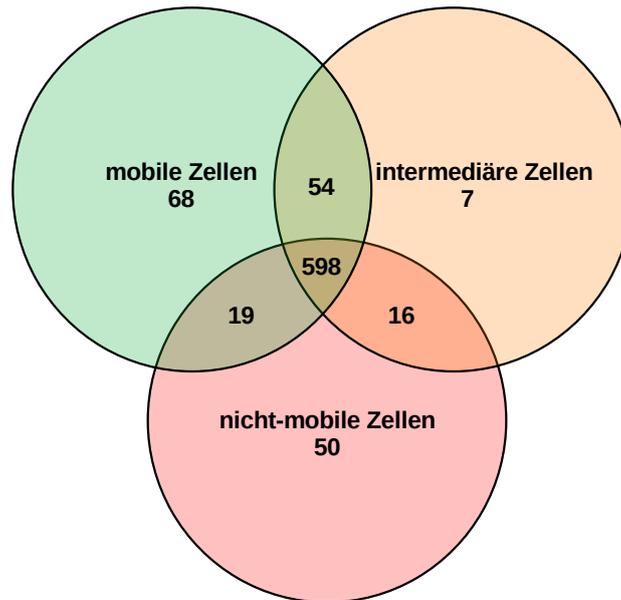


Abbildung 7.16: Mengenverteilung von Proteinen in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von *H. pluvialis*

Experimentelle Daten basieren auf einer massenspektrometrischen Peptidanalyse von drei BR der zellulären Zustände. Überschneidungsmengen geben die Anzahl identischer Proteine an, welche unter Berücksichtigung von Filterkriterien aus den Rohdaten der Analyse extrahiert wurden. Bei der Datenauswertung wurden Proteine für die Erstellung der Mengenübersicht verwendet, welche in mind. zwei BR nachgewiesen werden konnten und einen dPQI > 50 % zwischen den Zuständen bzw. $dPQI_{int} > 50\%$ innerhalb eines spezifischen Zustands aufwiesen.

7.2 Anhang Tabellen

7.2.1 Materialien und Geräte

Tabelle 7.1: Chemikalien inklusive Herstellerangaben

Chemikalien (fest)	Hersteller	Chemikalien (flüssig)	Hersteller
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	DEPC-behandeltes Wasser	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure Monohydrat		Essigsäure	
Dithiothreitol		Borsäure	
Calciumchlorid Dihydrat	CHEMSOLUTE, Th.Geyer, Renningen, Deutschland	1-Propanol	CHEMSOLUTE, Th.Geyer, Renningen, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat		Aceton	
Methylenblau		Acetonitril	
Tris-Base	Ferak, Berlin, Deutschland	Dichlormethan	
Ammoniumeisen-(III)-Citrat	Fluka Analytical, Steinheim, Deutschland	Ethanol	
Ammoniumheptamolybdat	Merck, Darmstadt, Deutschland	Methanol	
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat		Natriumhydroxid	
Kupfersulfat Pentahydrat		Salzsäure	
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat		Harnstoff	
Zinksulfat Heptahydrat	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland	Midori Green Advance DNA stain	
Natriumnitrat		Midori Green Xtra	
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	DNA-ExitusPlus™	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose pEq Gold Universal	VWR, Haasrode, Belgien	Astaxanthin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
EDTA (Dinatriumsalz)		β-Mercaptoethanol	
Natriumcarbonat		Tween 100	
Chemikalien (gasförmig)	Hersteller	Tween-20	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kohlenstoffdioxid	Linde GmbH, Pullach, Deutschland	Ethidiumbromid	

Tabelle 7.2: Puffer und Lösungen inklusive Angaben zur Zusammensetzung

Bezeichnung Puffer bzw. Lösung	Bezeichnung Chemikalie	c bzw. V für Stammlösung
TAE-Puffer (50x) pH 8,3	Tris-Base	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA (pH 8,0)	50 mM
Methylenblau-Stammlösung	Methylenblau	2,00 %
	70% Ethanol	100 ml
Methylenblau-Färbelösung	Methylenblau-Stammlösung	30 ml
	destilliertes Wasser	69 ml
	1% NaOH	1 ml
Laufmittel HPLC	Methanol	750 ml
	1-Propanol	200 ml
	Aceton	5 ml
Extraktionspuffer 1 (EB1) pH 8	Tris-Base	50 mM
	EDTA (pH 8,0)	10 mM
	Dithiothreitol	10 mM
	SDS	4,00 %
	Protease-Inhibitor Lösung	1,50 %
Harnstoff-Lösung (UA) pH 8	Tris-Base	50 mM
	Harnstoff	8 M
Reduktionslösung (UAD) pH 8	Tris-Base	50 mM
	Harnstoff	8 M
	Dithiothreitol	100 mM
Alkylierungslösung (UAI) pH 8	Tris-Base	50 mM
	Harnstoff	8 M
	Iodoacetamide	50 mM
Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (ABC)	Ammoniumhydrogencarbonat	50 mM

Tabelle 7.3: Nährmedien inklusive Angaben zur Zusammensetzung

Bezeichnung Nährmedium	Bezeichnung Chemikalie	Menge der Chemikalie
BG-11 (20x)	Natriumnitrat	30,00 g/l
	Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	0,80 g/l
	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1,50 g/l
	Calciumchlorid Dihydrat	0,72 g/l
	Citronensäure Monohydrat	0,13 g/l
	Ammoniumeisen-(III)-Citrat	0,12 g/l
	EDTA (Dinatriumsalz)	0,02 g/l
	Natriumcarbonat	0,40 g/l
	Spurenelementelösung	2,00 %
Spurenelementelösung	Borsäure	1,25 g/l
	Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	0,75 g/l
	Zinksulfat Heptahydrat	1,00 g/l
	Kupfersulfat Pentahydrat	0,05 g/l
	Ammoniumheptamolybdat	1,25 g/l
1x BG-11-Agar	Agar-Agar	10 g/l
	1x BG-11	100 ml

Tabelle 7.4: Enzyme inklusive Herstellerangaben

Bezeichnung Enzym	Enzymkonzentration	Hersteller
DreamTaq DNA Polymerase	5 Units/ μ l	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DNase I	1 Unit/ μ l	
Lys-C Protease	0,2 mg/ml	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Trypsin	0,1 mg/ml	

Tabelle 7.5: Kits inklusive Herstellerangaben und Verwendung

Verwendung	Bezeichnung Kit	Hersteller
Nukleinsäureisolation	innuSPEED Bacteria-Fungi RNA Kit	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
	innuPREP Bacteria DNA Kit	
Reverse Transkription	FastGene Scriptase Basic cDNA Kit	Nippon Genetics, Düren, Deutschland
DNase I-Verdau und Aufreinigung	DNase I, Rnase-frei	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
	RapidOut DNA Removal Kit	
qPCR-Analysen	qPCRBIO SyGreen Blue Mix	PCR Biosystems Inc., Wayne, Pennsylvania, USA
Protease-Inhibition	Protease-Inhibitor Lösung für Pflanzen	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Proteinkonzentrationsmessung	2-D Quant Kit	

Tabelle 7.6: Größenstandards inklusive Herstellerangaben und Verwendung

Verwendung	Bezeichnung Standard	Hersteller
Molekularbiologie (Gelelektrophorese)	FastGene 100 bp DNA Ladder RTU	Nippon Genetics, Düren, Deutschland
	1 kb Plus DNA Ladder	
	GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	
	GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	
HPLC/DC	Astaxanthin (SML0982)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 7.7: Primer inklusive Sequenzangaben, PCR-Effizienzen und Hybridisierungstemperatur

Bezeichnung	Hybridisierungstemperatur	Sequenz (5' → 3')	PCR-Effizienz
<i>PSY forward</i>	60 °C	CGATACCAGACCTTCGACG	1,01
<i>PSY reverse</i>		TGCCTTATAGACCACATCCAT	
<i>BKT2 forward</i>		TGCGCTAAAGCACGCCTAC	0,89
<i>BKT2 reverse</i>		AAGCTGGGCTGTGGCTTCGG	
<i>BKT1 forward</i>		ACGTACATGCCCCACAAG	0,84
<i>BKT1 reverse</i>		CAGGTCTGAAGTGGTAGCAGGT	
<i>IPI1 forward</i>		GCGAGCACGAAATGGACTAC	0,93
<i>IPI1 reverse</i>		GCTGCATCATCTGCCGCA	
<i>GS forward</i>		GGAACACTACGATGGTTCCTC	0,8
<i>GS reverse</i>		TACTCCTGCTCAATCCCAAAC	
<i>SAD forward</i>		CCGAGCCCAAGCTTCTAGTG	0,94
<i>SAD reverse</i>		TTTGCCTCCATGTAATCCCC	
<i>KAS forward</i>		CACCCCACTCTGAACCAGGA	0,76
<i>KAS reverse</i>		GACCTCCAAACCCGAAGGAG	
<i>ACP forward</i>		CAGCTCGGCACTGACCTTG	1,00
<i>ACP reverse</i>		CAAGGGTCAGCTCGAATTCTC	
<i>FATA forward</i>		AGACTCGTTCAGCGAGGAGC	0,86
<i>FATA reverse</i>		CATGCCACAGCATGGTTC	
<i>MCTK forward</i>		GGTGAGGACAAGGCGGTG	0,97
<i>MCTK reverse</i>		TCATCCTGGCCTTGAAGCTC	
<i>BC forward</i>		CAAGAAGGTGATGATCGCCA	0,89
<i>BC reverse</i>		GACGTGCAGCGAGTTCTTGTC	
<i>IPI2 forward</i>		AACACGAGGATTGGGGAACG	0,98
<i>IPI2 reverse</i>		TGCACCATTGACTCTAGCTCTG	
<i>CRTR-B forward</i>		GCGGGCGATGAGCACAG	0,80
<i>CRTR-B reverse</i>		CAGGTAGGTGGCGAAGATGG	
<i>ZEP forward</i>		CTACCAGGATCAGCGCATCA	0,83
<i>ZEP reverse</i>		TGCTTCCAGCTTGTCAAGTGT	
<i>PSBD forward</i>		GCGTTTTTCAGCCCCTATTGC	0,96
<i>PSBD reverse</i>		CAAGAACCCCAAGCTACACCC	
<i>PSBF forward</i>		GTTGGTTGGCTATTCACGGA	0,86
<i>PSBF reverse</i>		GGGTCTTTGTTTATCAGCCC	
<i>Pll forward</i>	ACCTCAGCAAGGAAGGCATC	0,89	
<i>Pll reverse</i>	CGTCACTATGTCCACCTGGG		
<i>HOGP forward</i>	CATCCTGAACACCACCGACA	0,73	
<i>HOGP reverse</i>	GTCAGTTGCCTCTTGAGCCT		

Bezeichnung	Hybridisierungstemperatur	Sequenz (5' → 3')	PCR-Effizienz
<i>CHLL forward</i>	60 °C	CGGTTGTGGCGGTTATGTAG	0,89
<i>CHLL reverse</i>		GCACAGAAGCAGCAATACGA	
<i>CHLB forward</i>		GCGGCAGTGTACATCTTTA	0,87
<i>CHLB reverse</i>		CGTGGGAAGAGCTAAGGGAA	
<i>PETA forward</i>		GCAAATGGCGAAACGGTTAC	0,82
<i>PETA reverse</i>		CCTTGACACGTGCTGGATT	
<i>PETB forward</i>		TTCGGGTGGTTAATACGTTCT	0,90
<i>PETB reverse</i>		TGGAATTGCTTCTGGAACACC	
<i>VDE forward</i>		ACCCAGCCTACGACTTCTTC	0,89
<i>VDE reverse</i>		CATTGTCCAGCACCGTGAAA	
<i>BKT3 forward</i>		GGCATTGAGAGGGCTAAGT	0,96
<i>BKT3 reverse</i>		CCTTGCTGACCAGGTTTTCAT	
<i>DXS forward</i>		TGCTCAACGAGGTGAAGAT	0,98
<i>DXS reverse</i>		GTCTTGGTCGTGACTGCTG	
<i>GDH forward</i>		GATGGATAGCGGTGAGATTGAG	0,85
<i>GDH reverse</i>		GCAGGGTCCACTGTGATG	
<i>PTOX1 forward</i>		GGAGTTCCTAGATGCCAATGAG	0,93
<i>PTOX1 reverse</i>		GCCCTCATCCTCCTTGATTG	
<i>PTOX2 forward</i>		CTCTACTACTGGCTGCTCATTG	0,93
<i>PTOX2 reverse</i>		GTCCTGGTTGCGGTAATAGTT	
<i>ATUB forward</i>		GGCTTCAAGTGTGGCATCAA	0,93
<i>ATUB reverse</i>		GCTTGGCATAACATCAGGTCG	
<i>PDH forward</i>		TTTGCCTTCTCCTCCTTGCT	0,97
<i>PDH reverse</i>		GCGAGCCCAACATCTACAAG	
<i>MDH forward</i>		TCAACGCTGGCATTGTCAA	0,91
<i>MDH reverse</i>		ATCCACTGCTGACACATCCA	
<i>GAPDH forward</i>		GACCACCACCCACTCTTACA	0,78
<i>GAPDH reverse</i>		CAGCGAACGTCTTCTTCTCG	
<i>PGK forward</i>		TTCCCACCATCACAATGCTG	0,83
<i>PGK reverse</i>		CCCAACAACCTGCTTCCCC	
<i>RBCL forward</i>	ACGAATGTTTACGCGGTGGTCT	0,96	
<i>RBCL reverse</i>	GGTACACCCAACTCCTTAGCA		
<i>GOGAT forward</i>	CTACGTTGGCAAGGGCATG	0,91	
<i>GOGAT reverse</i>	ATGCCGGCAGCCACGTTG		
<i>PDS forward</i>	ACCCTGACGACCTATCCATGAC	0,86	
<i>PDS reverse</i>	TCAGCACAACTCTGCTTGACCC		
<i>LCYB forward</i>	AGCGACAAGATTCAGCGTCAG	0,95	
<i>LCYB reverse</i>	CGCAATAGAAACACTTCCC GCC		
<i>PSBS forward</i>	CACGCTTCTTTGGCATCTCA	0,91	
<i>PSBS reverse</i>	GTTGATAGCGGCAAACAGGA		
<i>TEF2 forward</i>	CCCGTCTACTTGGTGGAGAT	0,89	
<i>TEF2 reverse</i>	GACTCGATGACAGGCAGGTA		
<i>UBIQUITIN forward</i>	CCCTGGCTGACTACAACATTC	0,86	
<i>UBIQUITIN reverse</i>	CCTGGATCTTCTGCTTCACATT		

Tabelle 7.8: Geräte inklusive Bezeichnung/Typ/Spezifikation und Herstellerangaben

Gerät	Bezeichnung/Typ/Spezifikation	Hersteller
Vakuumpumpe	F15646	ABM GmbH, Marktredwitz, Deutschland Agilent Technologies Inc., Kalifornien, USA
HPLC	Agilent 1100 Series	
UV/Vis Spektrophotometer	Agilent 8453 UV/VIS Photometer	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Geldokumentationssystem	UVP GelSolo	
PCR-Cycler	Biometra Professional Thermocycler	Assistent, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
qPCR-Cycler	qTowerG3 touch	
Zählkammer	Neubauer 0,1 mm x 0,0025 mm ²	Benchmark, Sayreville, NJ, USA
Kugelmühle (gekühlt)	BeadBlaster™ 24R gekühlt	
Netzgerät	Netzgerät PowerPaC 300	Bio-Rad, Hercules, USA
UV-Tisch	Mini- Transilluminator	
Heizschüttler	TSc Thermo Shaker	Biometra, Jena, Deutschland

Gerät	Bezeichnung/Typ/Spezifion	Hersteller
Agarosegelelektrophorese	EasyPhor Maxi Gelelektrophorese Kammer	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Massenflussregler	MFC Typ 8712	Bürkert, Ingelfingen, Deutschland
Vakuumfiltrationsapparatur	47 mm mit Schliff, 500 ml	DURAN, Wertheim, Deutschland
Heizschüttler	ThermoMixer C	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research® plus	
Zentrifugen	5415D	
	5810R	
Druckmessköpfe GaerOna	WinRespi 32	GMBU e.V. Halle (Saale), Deutschland
GaerOna	WinRespi 32	
Schüttelplatte	Orbital Shaker 3017	GFL mbH, Berlin, Deutschland
Trockenschrank	Instrument Typ SUT 6120	Heraeus, Hanau, Deutschland
Homogenisator	RiboLyser	Hybaid Ltd., Cambridge, UK
Probenschüttler	HS 250	IKA®-Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Rührplatte	RCT basic	
Vortex-Schüttler	VF2	
UV/Vis Spektrophotometer	NanoPhotometer™NP80-Touch	Implen, München, Deutschland
Dosierpumpe	REGLO Digital MS-2/12	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Schlauchpumpe	MiniMicro 3/6	
Umlaufkühler/-heizer	Julabo FC 1600	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
LED-Controler	SIMU-LUX Dimmsteuerung	LEDaquaristik GmbH, Hövelhof, Deutschland
LED-Leiste	eco+ LED-Leiste SUNSET 3500K	
	eco+ LED-Leiste RED 660 nm	
	eco+ LED-Leiste SUNSET 2700 K	
Vakuumkonzentrator (rotierend)	AVC2-25CD plus	Martin Christ GmbH, Harz, Deutschland
Destwasseranlage	Rios 5	Merck, Darmstadt, Deutschland
Reinstwasseranlage	Milli -Q 185 plus	
Zentrifugen	Plattenzentrifuge D-6081	neoLab®, Berlin, Deutschland
Mikroskop	BX60 mit Farbkamera XC30	Olympus, Tokio, Japan
Waage	PCE-BT (Max 2000 g, Min 0,5 g, d=0,01 g)	PCE Instruments, Meschede, Deutschland
Beleuchtungseinheit:	LED Panel (130x130 mm) 617 nm	Photon System Instruments, Drasov, Tschechien
	LED Panel (130x130 mm) 725 nm	
	LED Panel (130x130 mm) kaltweiß	
Closed FluorCam	800 MF	
Kamera Model:	1.5.0.50	
Sicherheitswerkbank	AIRONE LF-640	SAFELAB SYSTEMS LTD., Nailsea, UK
Waage	CPA64	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Tischkühlzentrifuge 3K30 (Rotor 19776-H)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
	Tischzentrifuge Heraeus™Pico™ 17	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
	Sorvall TM RC 6 Plus	
Flüssigchromatographiesystem	EASY nanoLC-1000	
Massenspektrometer	QExactive Plus Massenspektrometer	
Sicherheitswerkbank	MSC Advantage 1.8	
Beleuchtung	Ringsystem	Ventury, Dresden, Deutschland
pH-Elektrode	SenTix® PLUS	VWR, Haasrode, Belgien
Präzisionswaagen	LA (Max 120 g, d=0,1 mg)	
Zentrifugen	Mikrozentrifuge MiniStar silverline	
Imaging-PAM Fluorometer	Standard -Head	Walz, Effeltrich, Deutschland
Kamera Model:	IMAG-K (Langpassfilter: 640 nm, Kurzpassfilter: 780 nm)	
LED-Ring Array Model:	IMAG-L (96 blau LEDs (470 nm))	
Autoklav	Tischautoklav Labstar 25	Zirbus, Bad Grund, Deutschland
	Vertikalautoklav LVsa 50/70	

Tabelle 7.9: Verbrauchsmittel inklusive Bezeichnung/Typ/Spezifikation und Herstellerangaben

Bezeichnung Verbrauchsmittel	Hersteller
Quarzglasküvetten (Schichtdicke: 10 mm)	Agilent Technologies Inc., Kalifornien, USA
Neubauer Zählkammer 0,1 mm/0,0025 mm ²	Assistent, Sondheim vor der Rhoen, Deutschland
Kanülen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
1,5 ml Ultrazentrifugationsgefäße	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Surphob 2,5, 10, 100, 200, 1000 µl Filterspitzen	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
8er-Streifen mit 0,2 ml Reaktionsgefäßen weiß	Brand, Wertheim, Deutschland
96-Well qPCR-Platten 0,2 ml mit halben Rahmen, weiß	
Safe Sealfolie für 96-well qPCR-Platten	
2,0 ml Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland
10, 100, 200, 1000, 5000 µl Pipettenspitzen	
Petrischalen Durchmesser 92x16 mm (produktsteril)	
Impföse	Duran, Wertheim, Deutschland
100, 250, 1000, 5000, 10000 ml-Schottflaschen GL 45	
500, 5000 ml-Schottflaschen GLS 80	
Triple-Pure™ High Impact Zirconium Beads, 1,5 mm	JoJo Life Science U.G., Giengen, Deutschland
LLG-Septen N9 Silikon weiß/PTFE rot, 1mm	Lab Logistics Group, Meckenheim, Deutschland
1,5, 2,0 ml Reaktionsgefäße durchsichtig	LABSOLUTE, Th.Geyer, Renningen, Deutschland
15, 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss	
Kurzgewindeflaschen braunglas (HPLC -Vial)	
Braunglas Kurzgewindeflaschen 1,5 ml	
Spitzvorsatzfilter (0,45 µm Porendurchmesser)	
HPLC Schraubdeckel für Vials	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
DC-Fertigfolien, Kieselgelschicht 60 mit Fluoreszenzindikator UV254, ALUGRAM SIL G/UV	
HPLC-Säule LiChrospher 100 RP-18 (Innendurchmesser: 4 mm x 25 cm, Partikelgröße: 5 µm) mit Vorsäule	Merck, Darmstadt, Deutschland
Amicon Ultra 30K Filter	Nalgene, Rochester, NY, USA
1 l Zentrifugenbecher	
0,2 ml Reaktionsgefäße durchsichtig	Nippon Genetics, Düren, Deutschland
Spintip adaptors sp-990-8	Protea Biosciences, West Virginia, USA
Glasperlen 0,5-0,75; 1,7-2,0 mm	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
0,5 ml Reaktionsgefäße durchsichtig	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
100 ml TC-Flasche T 25	
Plastikküvetten-Polystyrol	
Zellkulturflaschen mit Gasaustauschseptum	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Membranfilter 0,2 µm Satorius Typ 17805 Midisart 2000	
Nitrocellulose-Filtermembran Porengröße: 0,45 µm	SPL Life Sciences, Geumgang-ro, Korea
6-, 12-Well Tissue Culture Testplatte	
Easy Spray Reversed-Phase C18-Säule (ES803A)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stop and Go Extraction C18-Tips	

Tabelle 7.10: Software inklusive Herstellerangaben und Versionsnummer

Bezeichnung Software	Version	Hersteller
ChemStation Edition for LC 3D Systems	B.04.02	Agilent Technologies Inc., Kalifornien
qPCRsoft qTower 3 /G	4.0	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Primer3web	4.1	ELIXIR, Tartu, Estland
WinRespi 32	3.13	GMBU e.V., Halle (Saale), Deutschland
MEGA X	V10.0.5	Institute for Genomics and Evolutionary Medicine, Temple University, Philadelphia, PA, USA
Mascot Search Engine	V.2.5.1	Matrix Science, Boston, MA, USA
Perseus	V1.6.6.0	Max-Planck-Gesellschaft e.V., München, Deutschland
cellSens Dimension	1.5	Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan
FluorCam	7	Photon System Instruments, Drasov, Tschechien
Rstudio	V4.1.0	Rstudio, Boston, MA, USA
Proteome Discoverer	2.1	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ImagingWin	2.41a	Walz, Effeltrich, Deutschland

8 Danksagung

Die Entscheidung die vorliegende Dissertation in einer außeruniversitären Forschungseinrichtung anzufertigen, wurde maßgeblich durch den Zuspruch meines Vorgesetzten Dr. Ing. Klaus Krüger beeinflusst. Ich möchte mich an dieser Stelle für diese einzigartige Möglichkeit und die hiermit verbundenen wirtschaftlichen Aufwendungen für die notwendigen Forschungskapazitäten bedanken.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Paschke möchte ich herzlich dafür danken, dass er der Betreuung meiner Promotionsarbeit zugestimmt und die notwendigen Kontakte für die Überwindung organisatorischer und wissenschaftlicher Probleme sichergestellt hat.

Herrn Prof. Dr. Ingo Heilmann möchte ich für wissenschaftliche Anregungen sowie unsere eingehenden Diskussionen zur Erörterung von Problemstellungen danken. Ich danke Prof. Dr. Heilmann ebenfalls, dass er sich trotz anfänglicher Zweifel der Themenstellung meiner Arbeit angenommen und sich für die Erfüllung der essentiellen Funktionen eines universitären Betreuers und Gutachters bereiterklärt hat.

Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner der Universität Göttingen danke ich für dessen großzügige Bereitschaft, als externer Gutachter im Zuge des angestrebten Promotionsverfahrens aufzutreten.

Herrn Prof. Dr. Klaus Humbeck möchte ich dafür danken, dass er mir den Zugang zu den Forschungskapazitäten der Abteilung Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg ermöglichte.

Dr. Olaf Barth gilt mein herzlicher Dank für all die hilfreichen fachlichen Ratschläge und Diskussionen sowie die wertvollen Hilfestellungen im Rahmen der absolvierten Arbeiten meiner Promotion.

Danken möchte ich Dr. Wolfgang Hoehenwarter, welcher die Voraussetzungen für die Untersuchung des Proteoms von *H. pluvialis* in der Abteilung der Proteomforschung des Leibniz Institutes für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) geschaffen und die experimentellen Arbeiten unterstützt hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Quint, Dr. Carolin Delker und Philipp Janitza des landwirtschaftlichen Institutes der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg für die Unterstützung bei bioinformatischen Analysen sowie der zeitaufwändigen Vermittlung essentieller Grundlagen für die Arbeit mit statistischer Analysesoftware.

Frau Dr. Uta Demus und Frau Dr. Walburga Bergmann, GMBU Halle, danke ich für die Einführung in analytische und biologische Methoden sowie die interne fachliche Betreuung meiner Promotion

Herrn Dipl. Ing. Matthias Leifheit, GMBU Halle, möchte ich für zahlreiche Gespräche und Denkanstöße sowie seine uneingeschränkte Bereitschaft zur Problemlösung technischer Fragestellungen danken.

Ich möchte mich bei all meinen Freunden bedanken, welche mich auf diesem Weg unterstützt und dazu bereit erklärt haben, die gesamte Arbeit zu lesen und mir wertvolle Korrekturvorschläge zu vermitteln.

Abschließend liegt es mir am Herzen mich bei meinen Eltern Birgit und Frank, meiner Freundin Manuela und meiner Familie für deren hingebungsvolle Unterstützung, Förderung und den unschätzbar wertvollen Zuspruch während meines gesamten Studiums und meiner Promotion zu bedanken. Meiner Freundin Manuela und meinen Eltern gilt darüber hinaus der Dank für ihr Verständnis, ihren Rückhalt und ihre fachlichen Denkanstöße während der gesamten Zeit der Arbeit.

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese eingereichte Doktorarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat. selbstständig verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht.

Weiterhin bestätige ich, dass ich mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben habe.

Enrico Ehrhardt

Halle (Saale), 21.09.2021

10 Lebenslauf

10.1 Persönliche Daten

Geburtsdatum/-ort: 02.07.1994 in Halle (Saale)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

10.2 Ausbildung und beruflicher Werdegang

Promotion: Juli 2018 - Sept. 2021

Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologien e.V. Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Dissertation: Physiologische und molekulare Vorgänge während des Übergangs von *Haematococcus pluvialis* in das nicht-mobile, Astaxanthin-bildende Zellstadium; Betreuer: Prof. Dr. Ingo Heilmann, Prof. Dr. Reinhard Paschke

experimentelle Masterarbeit: Jan. 2018 - Juli 2018

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Behrens; Thema: „Etablierung eines Reportersystems zur Untersuchung von Komponenten des RNA-Silencings in Pflanzen“; Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens, Dr. Torsten Gursinsky

Praktikum: Juli 2017 - Sept. 2017

QPS Austria GmbH, Abteilung Zellkultur; Thema: „*Characterisation of Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) for viability and their response to different chemical challenges and drug treatments*“.

Forschungsgruppenpraktikum: Apr. 2017 - Juni 2017

Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologien e.V. Halle, Abteilung Biologie; Thema: „Ermittlung des Einflusses von Lichtspektren und Photonenflussdichten auf die Synthese von Photopigmenten sowie Proteinfractionen in phototrophen Mikroorganismen unter Einsatz eines Mehrplatzkultivierungssystemes“; Betreuer Dipl.-Ing. Matthias Leifheit, apl. Prof. Dr. Ralph Golbik

Forschungsgruppenpraktikum: Aug. 2016 - Sept. 2016

Helmholtz Zentrum für Umweltforschung Leipzig, Abteilung Biotechnologie; Thema: „Fluoreszenzmikroskopie-basierte Lokalisation von Antibiotika-Resistenzmarkern in Umweltproben und generierten Klonen von *Escherichia coli*“; Betreuer: Dr. Jochen Müller, Dr. Ute Lechner

experimentelle Bachelorarbeit: Apr. 2016 - Juli 2016

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Behrens; Thema: „Charakterisierung viraler siRNAs des *Tomato bushy stunt virus* und deren Einfluss auf die Translation viraler Proteine in einem pflanzlichen *in-vitro* System“; Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens, Dr. Torsten Gursinsky

10.3 Studium und Schulausbildung

Masterstudium der Biochemie und Biotechnologie: Okt. 2016 - Juli 2018

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Gesamtnote: sehr gut: 1,1

Bachelorstudium der Biochemie und Biotechnologie: Okt. 2013 - Sept. 2016

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Gesamtnote: sehr gut: 1,4

Schulausbildung mit Abitur: Sept. 2005 - Juni 2013

Giebichenstein Gymnasium Thomas-Müntzer in Halle (Saale), Gesamtnote: gut: 1,9

11 Publikationen und Vorträge

Publikationsliste:

Kraus, D., Kleiber, A., Ehrhardt, E., Leifheit, M., Horbert, P., Urban, M., Gleichmann, N., Mayer, G., Popp, J., Henkel, T. (2021). Three step flow focusing enables image-based discrimination and sorting of late stage 1 Haematococcus pluvialis cells. *PLOS ONE*, 16(3), e0249192.

Literaturverzeichnis

- Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J.-P., Zarka, A., Chen, F.** (1999). Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology Letters*, 21, 601-604.
- Boussiba, S. und Vonshak, A.** (1991). Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiology*, 32(7), 1077-1082.
- Cahoon, A. B. und Timko, M. P.** (2000). yellow-in-the-dark Mutants of *Chlamydomonas* Lack the CHLL Subunit of Light-Independent Protochlorophyllide Reductase. *The Plant Cell*, 12(4), 559-568.
- Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P., Pinto, E.** (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2), 60-78.
- Cejudo, F. J., Ojeda, V., Delgado-Requerey, V., González, M., Pérez-Ruiz, J. M.** (2019). Chloroplast Redox Regulatory Mechanisms in Plant Adaptation to Light and Darkness. *Frontiers in Plant Science*, 10, 380.
- Cejudo, F. J., González, M.-C., Pérez-Ruiz, J. M.** (2021). Redox regulation of chloroplast metabolism. *Plant Physiology*, 186(1), 9-21.
- Chekanov, K., Schastnaya, E., Neverov, K., Leu, S., Boussiba, S., Zarka, A., Solovchenko, A.** (2019). Non-photochemical quenching in the cells of the carotenogenic chlorophyte *Haematococcus lacustris* under favorable conditions and under stress. *BBA - General Subjects*, 1863(10), 1429-1442.
- Chekanov, K., Lukyanov, A., Boussiba, S., Aflalo, C., Solovchenko, A.** (2016). Modulation of photosynthetic activity and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* cells during their conversion into haematocysts and back. *Photosynthesis Research*, 128(3), 313-323.
- Chekanov, K., Schastnaya, E., Solovchenko, A., Lobakova, E.** (2017). Effects of CO₂ enrichment on primary photochemistry, growth and astaxanthin accumulation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 171, 58-66.
- Chen, G., Wang, B., Han, D., Sommerfeld, M., Lu, Y., Chen, F., Hu, Q.** (2015). Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *The Plant Journal*, 81(1), 95-107.
- Chen, Z., Wang, G., Niu, J.** (2012). Variation in Rubisco and other photosynthetic parameters in the life cycle of *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 30(1), 136-145.
- Cheng, J., Li, K., Yang, Z., Zhou, J., Cen, K.** (2016). Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. *Bioresource Technology*, 204, 49-54.
- Chi, Z., O'Fallon, J., Chen, S.** (2011). Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends in Biotechnology*, 29(11), 537-541.
- Choi, Y.-E., Rhee, J.-K., Kim, H.-S., Ahn, J.-W., Hwang, H., Yang, J.-W.** (2015). Chemical Genetics Approach Reveals Importance of cAMP and MAP Kinase Signaling to Lipid and Carotenoid Biosynthesis in Microalgae. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(5), 637-647.

- Collins, A. M., Jones, H. D. T., Han, D., Hu, Q., Beechem, T. E.** (2011). Carotenoid Distribution in Living Cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *PLoS ONE*, 6(9), e24302.
- Cui, H., Yu, X., Wang, Y., Cui, Y., Li, X., Liu, Z., Qin, S.** (2013). Evolutionary origins, molecular cloning and expression of carotenoid hydroxylases in eukaryotic photosynthetic algae. *BMC Genomics*, 14, 457.
- Czygan, F.-C.** (1968). Sekundär-Carotinoide in Grünalgen. *Archiv für Mikrobiologie*, 62, 209-236
- Ding, W., Zhao, P., Peng, J., Zhao, Y., Xu, J.-W., Li, T., Reiter, R. J., Ma, H., Yu, X.** (2018). Melatonin enhances astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis* by mechanisms possibly related to abiotic stress tolerance. *Algal Research*, 33, 256-265.
- Ding, Y., Zang, X., Shi, J., Hou, L., He, B., Dong, B., Cong, X., Cao, X., Liu, Z., Song, X., Zhang, X.** (2019). cDNA cloning of *gs*, *gogat*, and *gdh* from *Haematococcus pluvialis* and transcription and enzyme level analysis in different nitrogen concentration. *Journal of Applied Phycology*, 31, 183-190.
- Do, T.-T., Ong, B.-N., Nguyen Tran, M.-L., Nguyen, D., Melkonian, M., Tran, H.-D.** (2019). Biomass and Astaxanthin Productivities of *Haematococcus pluvialis* in an Angled Twin-Layer Porous Substrate Photobioreactor: Effect of Inoculum Density and Storage Time. *Biology*, 8(3), 68.
- Fábregas, J., Otero, A., Maseda, A., Domínguez, A.** (2001). Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*, 89(1), 65-71.
- Flotow, v. J.** (1844). Beobachtungen über *Haematococcus pluvialis*. *Verhandlungen der Kaiserlichen Leopoldinisch-Carolinischen Deutschen Akademie der Naturforscher*, 12(2), 413–606.
- Förster, B., Mathesius, U., Pogson, B. J.** (2006). Comparative proteomics of high light stress in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics*, 6(15), 4309-4320.
- Gao, Z., Miao, X., Zhang, X., Wu, G., Guo, Y., Wang, M., Li, B., Li, X., Gao, Y., Hu, S., Sun, J., Cui, J., Meng, C., Li, Y.** (2016). Comparative fatty acid transcriptomic test and iTRAQ-based proteomic analysis in *Haematococcus pluvialis* upon salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) inductions. *Algal Research*, 17, 277-284.
- Geider, R. J., Delucia, E. H., Falkowski, P. G., Finzi, A. C., Grime, J. P., Grace, J., Kana, T. M., La Roche, J., Long, S. P., Osborne, B. A., Platt, T., Prentice, I. C., Raven, J. A., Schlesinger, W. H., Smetacek, V., Stuart, V., Sathyendranath, S., Thomas, R. B., Vogelmann, T. C., Williams, P., Woodward, F. I.** (2001). Primary productivity of planet earth: Biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. *Global Change Biology*, 7(8), 849-882.
- Goold, H., Beisson, F., Peltier, G., Li-Beisson, Y.** (2015). Microalgal lipid droplets: Composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Reports*, 34(4), 545-555.
- Goss, R. und Jakob, T.** (2010). Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis Research*, 106(1-2), 103-122.
- Grünewald, K. und Hagen, C.** (2001). β -carotene is the intermediate exported from the chloroplast during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis*. *J. of Appl. Phycol.*, 13, 89-93.
- Grünewald, K., Hirschberg, J., Hagen, C.** (2001). Ketocarotenoid Biosynthesis Outside of Plastids in the Unicellular Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 6023-6029.

- Gu, W., Li, H., Zhao, P., Yu, R., Pan, G., Gao, S., Xie, X., Huang, A., He, L., Wang, G.** (2014). Quantitative proteomic analysis of thylakoid from two microalgae (*Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*) reveals two different high light-responsive strategies. *Scientific Reports*, 4(1), 6661.
- Gu, W., Xie, X., Gao, S., Zhou, W., Pan, G., Wang, G.** (2013). Comparison of Different Cells of *Haematococcus pluvialis* Reveals an Extensive Acclimation Mechanism during its Aging Process: From a Perspective of Photosynthesis. *PLoS ONE*, 8(7), e67028.
- Guerin, M., Huntley, M. E., Olaizola, M.** (2003). *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 210-216.
- Gwak, Y., Hwang, Y., Wang, B., Kim, M., Jeong, J., Lee, C.-G., Hu, Q., Han, D., Jin, E.** (2014). Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Experimental Botany*, 65(15), 4317-4334.
- Hagen, C., Braune, W., Greulich, F.** (1993). Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales) IV. Protection from photodynamic damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 20(2-3), 153-160.
- Hallmann, A.** (2006). The pherophorins: Common, versatile building blocks in the evolution of extracellular matrix architecture in Volvocales. *The Plant Journal*, 45(2), 292-307.
- Henriques, M., Silva, A., Rocha, J. M. S.** (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: A simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.
- Hu, C., Cui, D., Sun, X., Shi, J., Xu, N.** (2020). Primary metabolism is associated with the astaxanthin biosynthesis in the green algae *Haematococcus pluvialis* under light stress. *Algal Research*, 46, 101768.
- Hutvagner, G. und Simard, M. J.** (2008). Argonaute proteins: Key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 22-32.
- Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., Castro-Puyana, M.** (2012). Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In: M. Hayes (Ed.), *Marine Bioactive Compounds*, Springer, Boston, MA, 55-98.
- Ilavarasi, A., Mubarakali, D., Praveenkum, R., Baldev, E., Thajuddin, N.** (2011). Optimization of Various Growth Media to Freshwater Microalgae for Biomass Production. *Biotechnology*, 10(6), 540-545.
- Johnson, M. P.** (2016). Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 255-273.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., Thornton, J. M.** (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*, 8(3), 275-282.
- Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., Katoh, S.** (2004). Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 81-86.
- Khan, M. I., Shin, J. H., Kim, J. D.** (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 36.

- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S.** (1993). Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 867-873.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., Tsuji, Y.** (1997). Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 94-97.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K.** (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Lao, Y. M., Xiao, L., Ye, Z. W., Jiang, J. G., Zhou, S. S.** (2011). In silico analysis of phytoene synthase and its promoter reveals hints for regulation mechanisms of carotenogenesis in *Dunaliella bardawil*. *Bioinformatics*, 27(16), 2201-2208.
- Le, S. Q. und Gascuel, O.** (2008). An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307-1320.
- Lei, A., Chen, H., Shen, G., Hu, Z., Chen, L., Wang, J.** (2012). Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 18.
- Lemoine, Y. und Schoefs, B.** (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*, 106(1-2), 155-177.
- Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F., Hu, Q.** (2008). Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Plant Physiology*, 165(17), 1783-1797.
- Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F., Hu, Q.** (2010). Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 22(3), 253-263.
- Lim, K. C., Yusoff, F. Md., Shariff, M., Kamarudin, M. S.** (2018). Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 738-773.
- Ma, R., Thomas-Hall, S. R., Chua, E. T., Alsenani, F., Eltanahy, E., Netzel, M. E., Netzel, G., Lu, Y., Schenk, P. M.** (2018). Gene expression profiling of astaxanthin and fatty acid pathways in *Haematococcus pluvialis* in response to different LED lighting conditions. *Bioresource Technology*, 250, 591-602.
- Mahong, B., Roytrakul, S., Phaonaklop, N., Wongratana, J., Yokthongwattana, K.** (2012). Proteomic analysis of a model unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, during short-term exposure to irradiance stress reveals significant down regulation of several heat-shock proteins. *Planta*, 235(3), 499-511.
- Marowa, P., Ding, A., Kong, Y.** (2016). Expansins: Roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Reports*, 35(5), 949-965.
- Mascia, F., Girolomoni, L., Alcocer, M. J. P., Bargiga, I., Perozeni, F., Cazzangia, S., Cerullo, G., D'Andrea, C., Ballottari, M.** (2017). Functional analysis of photosynthetic pigment binding complexes in the green alga *Haematococcus pluvialis* reveals distribution of astaxanthin in Photosystems. *Scientific Reports*, 7(1), 16319.

- Mastrobuoni, G., Irgang, S., Pietzke, M., Assmus, H. E., Wenzel, M., Schulze, W. X., Kempa, S.** (2012). Proteome dynamics and early salt stress response of the photosynthetic organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Genomics*, 13(1), 215.
- Meijerink, J., Mandigers, C., Locht, v. d. L., Tönnissen, E., Goodsaid, F., Raemaekers, J.** (2001). A Novel Method to Compensate for Different Amplification Efficiencies between Patient DNA Samples in Quantitative Real-Time PCR. *Journal of Molecular Diagnostics*, 3(2), 55-61.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., Adholeya, A.** (2016). A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7, 546.
- Molnár, A., Schwach, F., Studholme, D. J., Thuenemann, E. C., Baulcombe, D. C.** (2007). miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*, 447, 1126-1129.
- Morimoto, D., Yoshida, T., Sawayama, S.** (2020). Draft Genome Sequence of the Astaxanthin-Producing Microalga *Haematococcus lacustris* Strain NIES-144. *Microbiology Resource Announcements*, 9(23), e00128-20.
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K. K.** (2001). Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558-1566.
- Murchie, E. H. und Lawson, T.** (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983-3998.
- Murphy, D. J.** (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research*, 40, 325-438.
- National Center for Biotechnology Information.** URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Abruf 30.06.2020)
- Niizawa, I., Espinaco, B. Y., Leonardi, J. R., Heinrich, J. M., Sihufe, G. A.** (2018). Enhancement of astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under autotrophic growth conditions by a sequential stress strategy. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(6), 528-535.
- Niyogi, K. K.** (2000). Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(6), 455-460.
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., Abalde, J.** (2005). Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 96, 373-378.
- Ota, S., Morita, A., Ohnuki, S., Hirata, A., Sekida, S., Okuda, K., Ohya, Y., Kawano, S.** (2018). Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Reports*, 8(1), 5617.
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V. V., Ghosh, T., Dubey, S., Mishra, S.** (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244, 1216-1226.
- Pearson, K. F. R. S.** (1901). LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 2(11), 559-572.
- Peled, E., Leu, S., Zarka, A., Weiss, M., Pick, U., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S.** (2011). Isolation of a Novel Oil Globule Protein from the Green Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Lipids*, 46(9), 851-861.
- Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.

- Pick, U., Zarka, A., Boussiba, S., Davidi, L.** (2019). A hypothesis about the origin of carotenoid lipid droplets in the green algae *Dunaliella* and *Haematococcus*. *Planta*, 249(1), 31-47.
- Recht, L., Töpfer, N., Batushansky, A., Sikron, N., Gibon, Y., Fait, A., Nikoloski, Z., Boussiba, S., Zarka, A.** (2014). Metabolite Profiling and Integrative Modeling Reveal Metabolic Constraints for Carbon Partitioning under Nitrogen Starvation in the Green Algae *Haematococcus pluvialis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(44), 30387-30403.
- Roth, M. S., Cokus, S. J., Gallaher, S. D., Walter, A., Lopez, D., Erickson, E., Endelman, B., Westcott, D., Larabell, C. A., Merchant, S. S., Pellegrini, M., Niyogi, K. K.** (2017). Chromosome-level genome assembly and transcriptome of the green alga *Chromochloris zofingiensis* illuminates astaxanthin production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(21), 4296-4305.
- Schoefs, B., Rmiki, N., Rachadi, J., Lemoine, Y.** (2001). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. *FEBS Letter*, 500(3), 125-128.
- Scibilia, L., Girolomoni, L., Berteotti, S., Alboresi, A., Ballottari, M.** (2015). Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 12, 170-181.
- Shah, Md. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., Daroch, M.** (2016). Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science*, 7, 531.
- Shahbazi, M., Gilbert, M., Labouré, A.-M., Kuntz, M.** (2007). Dual Role of the Plastid Terminal Oxidase in Tomato. *Plant Physiology*, 145(3), 691-702.
- Solovchenko, A. und Khozin-Goldberg, I.** (2013). High-CO₂ tolerance in microalgae: Possible mechanisms and implications for biotechnology and bioremediation. *Biotech. Letters*, 35(11), 1745-1752.
- Steinbrenner, J. und Linden, H.** (2003). Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Regulation by photosynthetic redox control. *Plant Mol. Biol.*, 52, 343-356.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H. H., Renganathan, S.** (2016). Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 909-941.
- Sun, X.-M., Ren, L.-J., Zhao, X.-J., Huang, H.** (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels*, 11, 272.
- Sun, Z., Cunningham, F. X., Gantt, E.** (1998). Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(19), 11482-11488.
- Team R Core** (2020). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020* URL: <https://www.R-project.org/> (Abruf 01.05.2021)
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J.** (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, 13, 731-740.

Ugya, A. Y., Imam, T. S., Li, A., Ma, J., Hua, X. (2020). Antioxidant response mechanism of freshwater microalgae species to reactive oxygen species production: A mini review. *Chemistry and Ecology*, 36(2), 174-193.

UniProt Knowledgebase. URL: <https://www.uniprot.org/> (Abruf 30.06.2020)

Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Boon, N. (2012). Flue gas compounds and microalgae: (Bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1405-1424.

Vidhyavathi, R., Venkatachalam, L., Sarada, R., Ravishankar, G. A. (2008). Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 59(6), 1409-1418.

Vuppaladadiyam, A. K., Prinsen, P., Raheem, A., Luque, R., Zhao, M. (2018). Microalgae cultivation and metabolites production: A comprehensive review. *Biofuels, -products and Biorefining*, 12(2), 304-324.

Wang, B., Zarka, A., Trebst, A., Boussiba, S. (2003). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *Journal of Phycology*, 39(6), 1116-1124.

Wang, J., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2009). Occurrence and environmental stress responses of two plastid terminal oxidases in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta*, 230(1), 191-203.

Wang, S.-B., Hu, Q., Sommerfeld, M., Chen, F. (2004). Cell wall proteomics of the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Proteomics*, 4(3), 692-708.

Wayama, M., Ota, S., Matsuura, H., Nango, N., Hirata, A., Kawano, S. (2013). Three-Dimensional Ultrastructural Study of Oil and Astaxanthin Accumulation during Encystment in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE*, 8(1), e53618.

Xi, T., Kim, D. G., Roh, S. W., Choi, J. S., Choi, Y.E. (2016). Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(14), 6231-6238.

Zhang, C., Liu, J., Zhang, L. (2017). Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35(5), 1205-1211.

Zhang, L., Su, F., Zhang, C., Gong, F., Liu, J. (2017). Changes of Photosynthetic Behaviors and Photoprotection during Cell Transformation and Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis* Grown Outdoors in Tubular Photobioreactors. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 33.

Zhekisheva, M., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I., Zarka, A., Cohen, Z. (2002). Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology*, 38(2), 325-331.

Zhekisheva, M., Zarka, A., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. (2005). Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 41(4), 819-826.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Lebenszyklus von <i>H. pluvialis</i> unter Berücksichtigung verschiedener Kultivierungsbedingungen.....	4
Abbildung 1.2: Übersicht der Ax- und Fettsäure-Biosynthese von <i>H. pluvialis</i>	5
Abbildung 3.1: Mikroskopische Analyse von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi).....	22
Abbildung 3.2: Mikroskopische Analyse von <i>H. pluvialis</i> zur Differenzierung toter und lebender Zellen....	23
Abbildung 3.3: Zellkonzentration von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	24
Abbildung 3.4: GTS von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	25
Abbildung 3.5: Verhältnis toter und lebender Zellen von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	26
Abbildung 3.6: pH-Wert im Kulturmedium von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	27
Abbildung 3.7: BTS von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	27
Abbildung 3.8: Relativer Chl-Gehalt bezogen auf GTS von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	29
Abbildung 3.9: Relativer Car-Gehalt bezogen auf GTS von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	29
Abbildung 3.10: Relativer Ax-Gehalt bezogen auf GTS von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	30
Abbildung 3.11: Chl- zu Car-Verhältnis von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	31
Abbildung 3.12: Ax- zu Car-Verhältnis von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	32
Abbildung 3.13: Wachstumsindikatoren und Pigmentkonzentrationen von <i>H. pluvialis</i> bezogen auf BTS im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	33
Abbildung 3.14: Maximale photochemische Quantenausbeute (F_V/F_M bei $0 \mu E/m^2s$) von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	36
Abbildung 3.15: Effektive photochemische Quantenausbeute (F_V'/F_M' bei $403 \mu E/m^2s$) von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	37
Abbildung 3.16: Nicht-photochemischer Quench (NPQ bei $403 \mu E/m^2s$) von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	38
Abbildung 3.17: Photosynthetische Aktivitätsparameter von <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Beleuchtungsintensitäten und Prozessparameter (1 - 10 dpi).....	39
Abbildung 3.18: Sauerstoffbildungsrate (SBR bei $171 \mu E/m^2s$) von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter.....	40
Abbildung 3.19: Photosynthetische Aktivitätsparameter ($171 \mu E/m^2s$) von <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi).....	41
Abbildung 3.20: Häufigkeitsverteilung der C_i -Werte potentieller <i>housekeeping</i> -Gene von <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi).....	42
Abbildung 3.21: Übersicht der analysierten Transkripte im Rahmen von qPCR-Experimenten unter Berücksichtigung der Einteilung in definierte metabolische Kategorien.....	43

Abbildung 3.22: Expression ausgewählter Gene der Carotinoid-Biosynthese in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 dpi).....	44
Abbildung 3.23: Expression ausgewählter Gene der Carotinoid-Biosynthese in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (3 dpi).....	45
Abbildung 3.24: Expression ausgewählter Gene der Carotinoid-Biosynthese in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (10 dpi).....	46
Abbildung 3.25: Expressionsprofile ausgewählter Gene der Carotinoid-Biosynthese in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi).....	47
Abbildung 3.26: Expression ausgewählter Gene des Fettsäurestoffwechsels in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 dpi).....	48
Abbildung 3.27: Expression ausgewählter Gene des Fettsäurestoffwechsels in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (10 dpi).....	49
Abbildung 3.28: Expression ausgewählter Gene des C- und N-Metabolismus in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 dpi).....	50
Abbildung 3.29: Expression ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 dpi).....	51
Abbildung 3.30: Expression ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (10 dpi).....	52
Abbildung 3.31: Expressionsprofile ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi).....	53
Abbildung 3.32: Expression ausgewählter Gene der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 dpi).....	54
Abbildung 3.33: Genexpression von <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi).....	55
Abbildung 3.34: Mengenverteilung von Proteinen in Schnittmengen zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i>	56
Abbildung 3.35: Häufigkeitsverteilung identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i> (2055 Proteine) in metabolischen Kategorien.....	58
Abbildung 3.36: Häufigkeitsverteilung von dPQI-Kategorien identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i> (2055 Proteine).....	59
Abbildung 3.37: Häufigkeitsverteilung identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i> (598 Proteine).....	60
Abbildung 3.38: Proteinabundanzen identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i> (598 Proteine).....	60
Abbildung 3.39: Prozentuale Verteilung identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i> (598 Proteine) mit Angabe der Abundanzlevel in metabolischen Kategorien....	61
Abbildung 3.40: Häufigkeitsverteilung identischer Proteine in Schnittmengen zweier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i> in metabolischen Kategorien.....	62
Abbildung 3.41: Häufigkeitsverteilung identischer Proteine in Schnittmengen zweier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i> in metabolischen Kategorien.....	62
Abbildung 3.42: Proteinabundanzen identischer Proteine in Schnittmengen zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i>	63
Abbildung 3.43: Prozentuale Verteilung identischer Proteine in Schnittmengen zweier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i> mit Angabe der Abundanzlevel in metabolischen Kategorien.....	64
Abbildung 3.44: Häufigkeitsverteilung stadienspezifischer Proteine in individuellen Zuständen von <i>H. pluvialis</i> in metabolischen Kategorien.....	65

Abbildung 3.45: Stadieninterne Proteinabundanz in individuellen Zuständen von <i>H. pluvialis</i> mit Angabe der Abundanzlevel in metabolischen Kategorien.....	66
Abbildung 3.46: Häufigkeitsverteilung stadienspezifischer Proteine in individuellen Zuständen von <i>H. pluvialis</i> in metabolischen Kategorien.....	67
Abbildung 3.47: Vergleich des Transkriptoms und Proteoms dreier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i> . .	69
Abbildung 3.48: Proteinabundanzen identischer Proteine in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i> (598 Proteine).....	70
Abbildung 4.1: Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsunterschiede von <i>H. pluvialis</i> im Verlauf der Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi).....	80
Abbildung 4.2: Postulierte Funktionen von ABC-Transportern und CYP-Enzymen in <i>H. pluvialis</i>	85
Abbildung 7.1: Chromatografische Identifikation von Ax und verschiedenen Ax-Derivaten.....	88
Abbildung 7.2: F_V/F_M -Werte und Chl- zu Car-Verhältnis von <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit von Kultivierungsbedingungen und Messsystemen.....	89
Abbildung 7.3: Expression ausgewählter Gene der Carotinoid-Biosynthese in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (7 dpi).....	89
Abbildung 7.4: Expression ausgewählter Gene des Fettsäurestoffwechsels in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (3 dpi).....	90
Abbildung 7.5: Expression ausgewählter Gene des Fettsäurestoffwechsels in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (7 dpi).....	90
Abbildung 7.6: Expressionsprofile ausgewählter Gene des Fettsäurestoffwechsels in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi).....	91
Abbildung 7.7: Expression ausgewählter Gene des C- und N-Metabolismus in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (3 dpi).....	91
Abbildung 7.8: Expression ausgewählter Gene des C- und N-Metabolismus in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (7 dpi).....	92
Abbildung 7.9: Expressionsprofile ausgewählter Gene des C- und N-Metabolismus in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (1 - 10 dpi).....	92
Abbildung 7.10: Expression ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (3 dpi).....	93
Abbildung 7.11: Expression ausgewählter Gene der Chlorophyll- und Photosynthese in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (7 dpi).....	93
Abbildung 7.12: Expression ausgewählter Gene der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (3 dpi).....	94
Abbildung 7.13: Expression ausgewählter Gene der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (7 dpi).....	94
Abbildung 7.14: Expression ausgewählter Gene der Stressantwort und zellulärer Regulationsprozesse in <i>H. pluvialis</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter (10 dpi).....	95
Abbildung 7.15: Mengenverteilung von Proteinen in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i>	95
Abbildung 7.16: Mengenverteilung von Proteinen in der Schnittmenge dreier zellulärer Zustände von <i>H. pluvialis</i>	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht angewendeter Kultivierungsparameter für Experimentalreihen.....	10
Tabelle 2.2: Komposition des MM zur Durchführung einer reversen Transkriptionsreaktion.....	15
Tabelle 2.3: Komposition des MM zur Durchführung einer PCR-Reaktion.....	15
Tabelle 2.4: Temperaturprotokoll zur Durchführung einer PCR-Reaktion.....	16
Tabelle 2.5: Komposition des MM zur Durchführung einer qPCR-Reaktion.....	16
Tabelle 2.6: Temperaturprotokoll zur Durchführung einer qPCR-Reaktion.....	16
Tabelle 7.1: Chemikalien inklusive Herstellerangaben.....	97
Tabelle 7.2: Puffer und Lösungen inklusive Angaben zur Zusammensetzung.....	97
Tabelle 7.3: Nährmedien inklusive Angaben zur Zusammensetzung.....	98
Tabelle 7.4: Enzyme inklusive Herstellerangaben.....	98
Tabelle 7.5: Kits inklusive Herstellerangaben und Verwendung.....	98
Tabelle 7.6: Größenstandards inklusive Herstellerangaben und Verwendung.....	98
Tabelle 7.7: Primer inklusive Sequenzangaben, PCR-Effizienzen und Hybridisierungstemperatur.....	99
Tabelle 7.8: Geräte inklusive Bezeichnung/Typ/Spezifikation und Herstellerangaben.....	100
Tabelle 7.9: Verbrauchsmittel inklusive Bezeichnung/Typ/Spezifikation und Herstellerangaben.....	102
Tabelle 7.10: Software inklusive Herstellerangaben und Versionsnummer.....	102