

Abschließender Sachbericht

Kryostress-Anpassung der Zelle an Tiefsttemperaturen (KALT) (Cryostress – adaptation of the cell to very low temperature)

Leibniz-Einrichtung:	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Aktenzeichen:	SAW-2013-DSMZ-3
Projektlaufzeit:	15.05.2013 - 14.5.2016 (verlängert bis zum 14.05.2017)
Ansprechpartner:	Prof. Dr. Jörg Overmann

EXECUTIVE SUMMARY

Organismen sind unter vielen Bedingungen und in vielen Habitaten niedrigen Temperaturen und Temperaturschwankungen ausgesetzt. Zellen, die nicht in der Lage sind, sich an diese Bedingungen anzupassen, unterliegen Kälte- und Kryostress. Ein besseres Verständnis von Kryostress ist eine Grundvoraussetzung zur nachhaltigen Archivierung der biologischen Diversität, insbesondere bei Mikroorganismen und eröffnet neue Anwendungsperspektiven wie eine effizientere Kryokonservierung. Während der Kryokonservierung sind Zellen verschiedenen Formen von Kryostress ausgesetzt, dazu gehören osmotischer Stress, Eiskristallbildung, Dehydrierung und toxische Nebenwirkungen durch den Einsatz von Kryoprotektoren. Die durch das Einfrieren und Auftauen in der Zelle verursachten Prozesse und Schädigungen sind dabei jedoch noch wenig verstanden. Das KAIT-Projekt beschäftigte sich daher mit „**Kryostress und Anpassungsmechanismen der Zelle an Tiefsttemperaturen**“, wobei zellulären Anpassungen verschiedener Organismen an Kälte- und Kryostress vergleichend untersucht und neue innovative Konzepte in der Kryokonservierung entwickelt wurden. Im Vordergrund stand dabei eine enge Zusammenarbeit und Vernetzung der Projektpartner um die wissenschaftliche und technische Expertise auf dem Gebiet der Kryobiologie zu bündeln. In einem Instituts-übergreifenden, vergleichenden Ansatz wurde untersucht, ob Zellen unterschiedlicher Organismen in gleicher Weise auf Kryostress reagieren, ob sich dies im ATP-Gehalt widerspiegelt und wie ATP mit anderen Lebensfähigkeitsmarkern zusammenhängt. Es wurde gezeigt, dass Zellen und Organismen über die Vielfalt des Lebens hinweg, trotz erheblicher biologischer Unterschiede, bei Kryostress mit ähnlichen Einschränkungen konfrontiert werden. Dies führte zu Änderungen ihres Zellenergiegehalts und war anhand von ATP als universellem Stressmarker für den Energiezustand der Zelle messbar. Neben den Organismen-übergreifenden Analysen wurden Organismen-spezifische Fragestellungen mit einem weitreichenden Methodenspektrum bearbeitet. Zur Analyse der Stressantwort der Zellen wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten des Temperaturprofils entnommen und morphologisch, physiologisch, molekularbiologisch und proteinbiochemisch untersucht. Um Aufschluss über das Einfrierverhalten verschiedener Bakterien mit unterschiedlichen Anpassungsmechanismen zu erhalten, wurden mesophile Vertreter der Gattungen *Planococcus* und *Psychrobacter* mit deren psychrotoleranten Verwandten verglichen. Physiologische (Zellenergiegehalt, Viabilität) und physikalische (dynamischer Differenzkalorimetrie) Untersuchungen zeigten, dass die getesteten psychrotoleranten Stämme gegenüber ihren mesophilen Verwandten während der Kryokonservierung im Vorteil waren. Des Weiteren wurde die Kryosensitivität verschiedener humaner Schwesterzelllinien getestet und der Einfluss unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen in der Prä-Inkubation auf das Einfrierverhalten der Kartoffelzelllinie *Solanum tuberosum* bestimmt, um die vorhandenen Kryokonservierungsprotokolle zu optimieren. Nur ein hohes Stresslevel in der Akklimatisationsphase führte zu einer hohen Überlebensrate der Pflanzenzelllinie nach dem Einfrieren. Für die eukaryotischen Algen, humanen und pflanzlichen Zelllinien wurden kryo-induzierte Änderungen im Methylierungsmuster des Genoms über methylsensitiv amplifizierte Polymorphismen detektiert. Die Analyse der epigenetischen Integrität in kryokonservierten grünen Mikroalgen mittels Cytosinmethylierungssensitiver AFLP (MS-AFLP unter Verwendung von MspI- und Hpa II-Enzymen) ergab kleine Veränderungen (3-10%) in der Methylierungsrate während der Kryokonservierung. Die Unterschiede korrelierten jedoch nicht mit der Kryosensitivität der getesteten *Chlorella* Stämmen und ihren nahen Verwandten. Hinsichtlich des Methylierungsmusters zeigte der kryorobuste Modellorganismus *Chlorella vulgaris* mehr kryoinduzierte Veränderungen als die kryosensitiven und mittelempfindlichen Stämme von *Chlorella variabilis*. Änderungen in der Genexpression wurden im filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans* und in der Sprossspitze *Arabidopsis thaliana* analysiert. Bei *A. nidulans* wurden spezifische Proteine der Kryo-, bzw. Kältestressantwort identifiziert und Entwicklungsprozesse und metabolische Wege zum ersten Mal mit Kältestress in Verbindung gebracht. Als Grundlage zur weiteren Aufklärung grundlegender kryokonservierungsspezifischer Mechanismen der Modellpflanze *A. thaliana* wurde ein Kryokonservierungsprotokoll für *Arabidopsis* Sprossspitzen etabliert, welches auf eine Vielzahl von Wildtyp-Akzessionen anwendbar ist.

INHALTSVERZEICHNIS

ZIELSETZUNG DES VORHABENS	4
CHRONOLOGIE DES VERBUNDPROJEKTES	4
Kooperative Arbeiten im Projekt	6
ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER TEILPROJEKTE	7
Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	7
Vergleich psychrotoleranter und mesophiler Bakterien	7
Einfrieverhalten pflanzlicher Zelllinien und Einfluss der osmotischen Vorbehandlung ...	9
Humane Zelllinien.....	11
Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (EPSAG)	13
Effekte der Kryokonservierung auf die epigenetische Stabilität und den ATP-Gehalt von Mikroalgen	13
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie Hans-Knöll-Institut (HKI)	16
Kälte- und Kryoanpassung des filamentösen Pilzes <i>Aspergillus nidulans</i>	16
Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)	18
Sprossspitzen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
Ludwig-Maximilians-Universität, München (LMU), Ultrastrukturforschung, Department Biologie I, Botanik	19
Zellmorphologie der obligat symbiotischen bakteriellen Assoziation „ <i>Chlorochromatium aggregatum</i> “	19
VERANSTALTUNGEN IM RAHMEN DES KALT PROJEKTES	20
PUBLIKATIONEN IM RAHMEN DES KALT-PROJEKTES	20
Publikationen	20
Abstracts.....	21
Konferenzbeiträge.....	21
QUALIFIKATION VON FORSCHERN	22
Promotionen	23
Abschlussarbeiten	23
STELLUNGNAHMEN	23
Kommerzielle Nutzung.....	23
Weitere Kooperationspartner.....	23
Sicherung und Verfügbarmachung der Forschungsdaten.....	23
LITERATUR	23

Zielsetzung des Vorhabens

Exotherme Organismen wachsen innerhalb eines begrenzten Temperaturbereichs und unterliegen Kältestress, wenn die Außentemperatur unter den optimalen Temperaturbereich für das Wachstum eines Organismus fällt. Bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts erfahren Zellen zusätzlich Kryostress. Eine genaue Kenntnis der Mechanismen der Kälteanpassungen ist nicht nur von fundamentalem wissenschaftlichem Interesse, sondern hat praktische Bedeutung für die Kryokonservierung. Während der Kryokonservierung werden Zellen verschiedenen Formen von Kryostress ausgesetzt, dazu gehören osmotischer Stress, Eiskristallbildung, Dehydrierung und toxische Nebenwirkungen durch den Einsatz von Kryoprotektoren. Dabei sind die durch das Einfrieren und Auftauen in der Zelle verursachten Prozesse und Schädigungen noch wenig verstanden. Im Rahmen des KAIT-Projektes sollten die zellulären Anpassungen verschiedener Organismen an Kälte- und Kryostress vergleichend untersucht und neue innovative Konzepte in der Kryokonservierung entwickelt werden. Im Vordergrund stand dabei eine enge Zusammenarbeit und Vernetzung der Projektpartner um die wissenschaftliche und technische Expertise auf dem Gebiet der Kryobiologie zu bündeln.

Chronologie des Verbundprojektes

Für den institutsübergreifenden Forschungsansatz wurden Modellorganismen ausgewählt, die an den beteiligten Partnerinstituten bereits gut etabliert waren. Die im Antrag aufgeführte Kryosensitivität einiger Modellorganismen wurde um einen vergleichenden Ansatz kryotoleranter und -sensitiver Vertreter erweitert und die Organismenauswahl entsprechend angepasst.

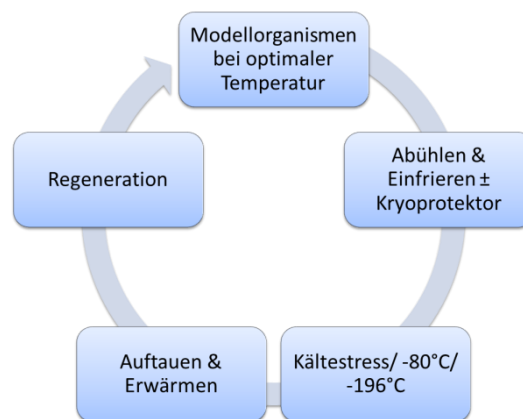


Abb. 1. Methodischer Ansatz des Forschungsverbundes. Das Flussschema zeigt den institutsübergreifenden Versuchsansatz. An den Punkten wurden ATP-Gehalt und Zellwachstums-/Teilung bestimmt.

Im Koordinationsworkshop am IPK wurden die Randbedingungen für die experimentellen Vorhaben und gemeinsamen Ansätze abgeglichen und definiert. Die zu untersuchenden Organismen wurden zunächst unter optimalen Bedingungen kultiviert, dann Tiefsttemperaturen (-196 °C) ausgesetzt, wieder aufgetaut und erneut unter optimalen Bedingungen inkubiert, bis idealerweise der Ausgangszustand der Zellen erreicht wurde (Abb. 1). Die optimalen Wachstumsbedingungen, Vorbehandlung und Einsatz von Kryoprotektoren und das eigentliche Einfrier- und Auftauprotokoll wurden für jeden Modellorganismus individuell angepasst und optimiert. Von einem einheitlichen Protokoll wurde konsequenterweise abgesehen und stattdessen ein einheitlicher Messparameter (die zelluläre ATP-Konzentration) gewählt um den Ein- und Auftauprozess vergleichend zu untersuchen. Im Rahmen des Workshops am IPK wurden außerdem die Stressbedingungen der Organismen mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) bestimmt. Dazu wurden Eiskristallbildung, Rekristallisation und die Glasübergänge verschiedener Medien, Kryoprotektoren und Organismen ermittelt, um Aufschluss über die physikalischen Vorgänge während des Einfrierens und Auftauens zu erhal-

ten. Für einige Organismen (Sprossspitzen von *Arabidopsis thaliana*, Bakterien der Gattungen *Planococcus* und *Psychrobacter*) wurde dieser Ansatz in weiterer Kooperation im Rahmen des Projektes vertieft. Dabei wurde auch die Rolle verschiedener Kryoprotektoren und die Effizienz unterschiedlicher Einfrierprotokolle untersucht.

Der bereits erwähnte vergleichende Versuchsansatz war ein Meilenstein des KAIT-Projektes, um die Wirkung von Kryostress auf den Energiestoffwechsel und die Teilungsfähigkeit zu analysieren. Explizit wurde untersucht, ob Zellen unterschiedlicher Organismen in gleicher Weise auf Kryostress reagieren, ob sich dies im ATP-Gehalt widerspiegelt und wie ATP mit anderen Lebensfähigkeitsmarkern zusammenhängt. Es wurde gezeigt, dass Zellen und Organismen über die Vielfalt des Lebens hinweg, trotz erheblicher biologischer Unterschiede, bei Kryostress mit ähnlichen Einschränkungen konfrontiert werden. Dies führt zu Änderungen ihres Zellenergiegehalts und ist anhand von ATP als universellem Stressmarker für den Energiezustand der Zelle messbar (Abbildung 2). Die gewonnenen Erkenntnisse sind in einem institutsübergreifenden Manuskript zusammengefasst (Bajerski *et al.* In prep.).

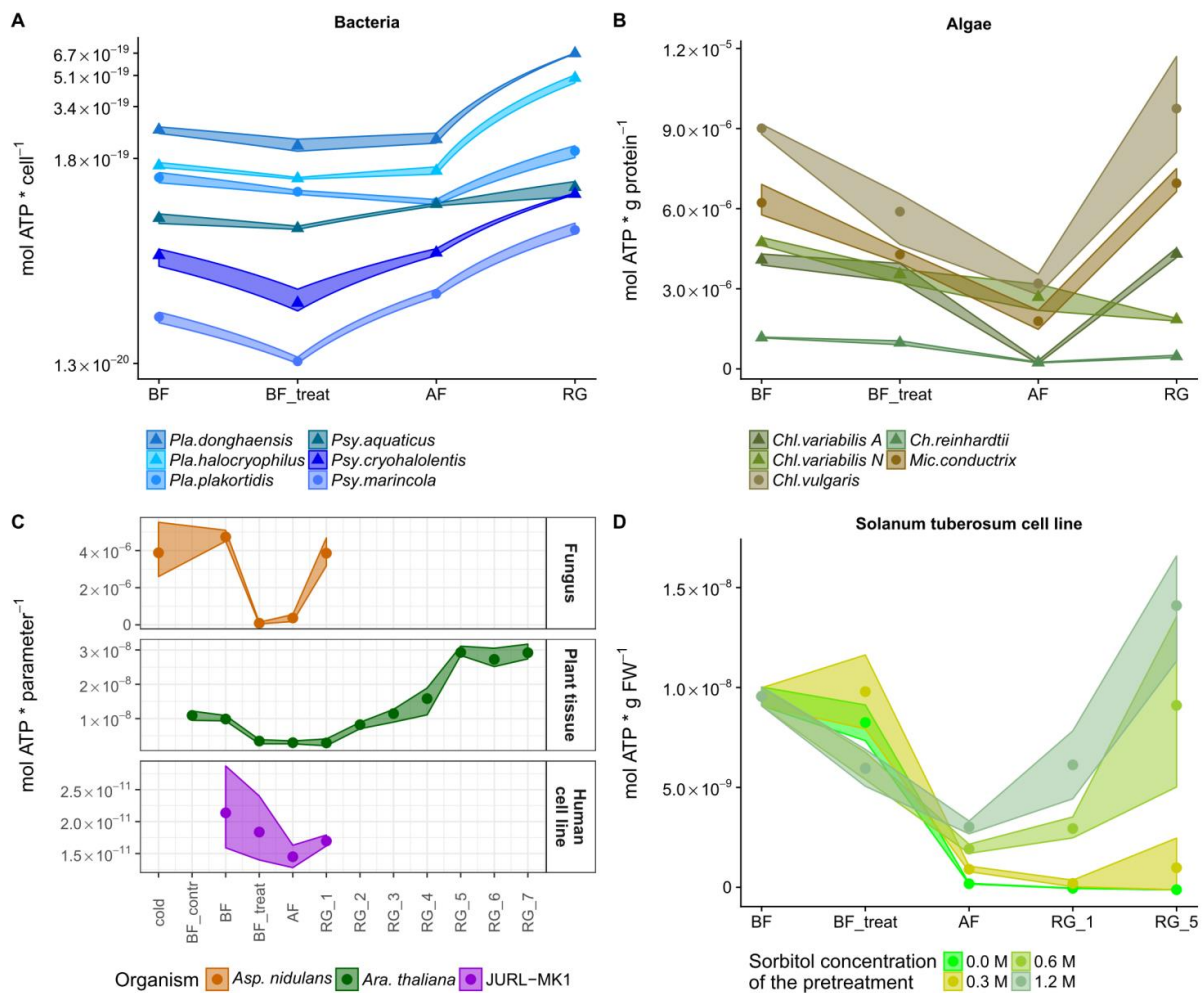


Abb. 2. Die Organismenauswahl und Kryokonservierungs-Vorbehandlung beeinflussen den ATP-Gehalt während des Einfrierens und Auftauens. ATP-Gehalt (Mol ATP pro Parameter) ausgewählter Stämme, Zelllinien oder Gewebe vor dem Einfrieren (BF), nach Zugabe eines Kryoprotektors (BF_treat), nach dem Einfrieren und Auftauen (AF) und nach einer Regenerationsphase (RG). Es sind die Mittelwerte der biologischen Replikate und 95% Konfidenzintervalle dargestellt. A) Psychrotolerante (▲) und mesophile (●) Vertreter der Bakteriengattungen *Psychrobacter* und *Planococcus*. B) Vergleich kryotoleranter (▲) und

kryosensitiver (●) Algenarten. C) Verschiedene Schritte der Kryokonservierung im Pilz *Aspergillus nidulans*, in *Arabidopsis thaliana* Col-0 Sprossspitzen und einer menschlichen Zelllinie JURL-MK1. D) Verschiedene Sorbitolkonzentrationen während der Vorbehandlung von *Solanum tuberosum* cv. Desiree Suspensionszellen.

Neben den Organismen-übergreifenden Analysen wurden Organismen-spezifische Fragestellungen mit einem weitreichenden Methodenspektrum bearbeitet. Zur Analyse der Stressantwort der Zellen wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten des Temperaturprofils entnommen und morphologisch, physiologisch, molekularbiologisch und proteinbiochemisch untersucht. Dabei konnten die Partner die vorhandene Infrastruktur des KAIT-Netzwerkes nutzen und geeignete Methoden zur Beantwortung der jeweiligen Fragestellung auswählen.

Die physiologischen Analysen konzentrierten sich dabei auf verschiedene Viabilitätstests, Wachstumsmessungen und die Bestimmung des ATP-Gehalts. Unter anderem wurde untersucht, ob psychrophile Bakterien gegenüber mesophilen Vertretern einer Gattung Vorteile in der Kryokonservierung haben. Des Weiteren wurde die Kryosensitivität verschiedener humaner Schwesterzelllinien getestet und der Einfluss unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen in der Prä-Inkubation auf das Einfrierverhalten der Kartoffelzelllinie *Solanum tuberosum* bestimmt, um die vorhandenen Kryokonservierungsprotokolle zu optimieren. Dafür entfielen einige andere, ursprünglich geplante Versuchsansätze wie die Analyse zellbiologischer Veränderungen mittels Durchflusszytometrie und Einsatz von Fluoreszenzsonden.

Durch Kryo-Elektronen-Mikroskopie an der LMU wurde die Zellmorphologie der obligat symbiotischen bakteriellen Assoziation „*Chlorochromatium aggregatum*“ und damit der differentielle Effekt von Kryostress auf eine Symbiose zweier unterschiedlicher Bakterienarten untersucht.

Änderungen in der Genexpression wurden im filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans* und in der Sprossspitze *Arabidopsis thaliana* analysiert. Bei *A. nidulans* erfolgten die Analysen auch auf der Ebene des Proteins. Ziel war es, regulatorische Netzwerke und spezifische Proteine der Kryo-, bzw. Kältestressantwort zu identifizieren. Aufgrund der umfangreichen, vergleichenden physiologischen Untersuchungen der Bakterien konnte der Verlust von Plasmiden von Prokaryoten nicht untersucht werden.

Für die eukaryotischen Algen, humanen und pflanzlichen Zelllinien wurden kryo-induzierte Änderungen im Methylierungsmuster des Genoms über methylsensitiv amplifizierte Polymorphismen detektiert. Diese Analysen wurden von dem universitären Partner SAG und an der DSMZ durchgeführt. Die Arbeiten zu den humanen Zelllinien wurden von Dr. Sonja Eberth durchgeführt und waren zunächst an der UMG angesiedelt, fanden aber nach dem Umzug und der Übernahme der Nachwuchsgruppe „Tumorbilogie“ durch Frau Eberth an der DSMZ statt.

Kooperative Arbeiten im Projekt

Der Kooperationsgedanke des KAIT-Projekts wurde sowohl über die gemeinsame Nutzung der Infrastrukturen, als auch über die wissenschaftliche Zusammenarbeit realisiert, die in dem institutsübergreifenden Manuskript resultierte. Halbjährliche Projekttreffen an den verschiedenen Standorten förderten die interne Vernetzung, über die „Winter-School“ am IPK und die Realisierung einer eigenen „KAIT-Session“ auf der CRYO-Konferenz in Ostrava, Tschechien, war auch der Austausch mit internationalen Experten der Kryobiologie möglich.

- DSC Messungen am IPK

Kristallisationszeit und –temperatur als auch Glasübergänge wurden während des Einfrier- und Auftauvorgangs der Kryokonservierung mit Hilfe der Dynamische Differenz-Kalorimetrie in allen Modellobjekten untersucht (DSC Q2000 mit LN Kühlsystem, TA Instruments). Die

Auswertung der Phasenübergänge diente zur Optimierung der Kryokonservierungsprotokolle und der Festlegung gemeinsamer Parameter für die verschiedenen Organismen.

- Neben dem allgemeinen Kooperations- und DSC-Workshop am IPK für alle Projektteilnehmer, fanden am IPK umfangreiche Messungen zu den Phasenübergängen verschiedener Bakterienstämme statt.
- Die am IPK durchgeführten Messungen mit pflanzlichen Zellkulturen und den korrespondierenden Medien lieferten wichtige physikalische Daten über deren Einfrierverhalten vor allem die Menge an gefrierbarem Wasser in den verschiedenen Zellkulturen und mögliche Glasübergangstemperaturen.
- Sequenzierung an der DSMZ
 - Die Sequenzierungen für die Transkriptomanalyse von *Arabidopsis thaliana* und *Aspergillus nidulans* wurden an der DSMZ durchgeführt.
 - Veränderungen im Transkriptom von Sprossspitzen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurden untersucht. Hierbei wurden zwei Genotypen (Wildtyp und WRKY22 T-DNA Insertionslinie) nach drei Zeitpunkten der Kryokonservierung (Sprossspitzenpräparation, Dehydrierung und Regeneration) in je drei biologischen Replikaten untersucht.
- Extraktion/ATP Messungen am HKI

Die ATP-Messungen für die Algen-Kulturen wurden anhand des etablierten Protokolls für die filamentösen Pilze in Kooperation mit dem HKI am Institut in Jena durchgeführt. Die Algenkulturen wurden zuvor angezogen, in Jena wurde das intrazelluläre ATP isoliert anhand eines Lumineszenz-Versuchs gemessen.

- AFLP Messungen In Göttingen
Die Etablierung der methylierungssensitiven AFLP Methode in Göttingen auch für pflanzliche Zellkulturen gestattete den Nachweis, das die Kryokonservierung der Untersuchten Kartoffel-Zellkulturen inklusive der angewendeten Vorkulturmethoden nicht zu Veränderungen des Methylierungsstatus der DNA führte. Gleichzeitig zeigte sich aber eine gewisse Instabilität bei der untersuchten genetisch veränderten Zellkultur auch ohne Kryokonservierung.

Ergebnisse und Diskussion der Teilprojekte

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

F Bajerski, J Overmann

Der DSMZ oblag die Projektleitung durch Prof. Overmann und die Projektkoordination durch Frau Dr. Bajerski und war mit 3 Arbeitsgruppen im Projekt vertreten.

Vergleich psychrotoleranter und mesophiler Bakterien

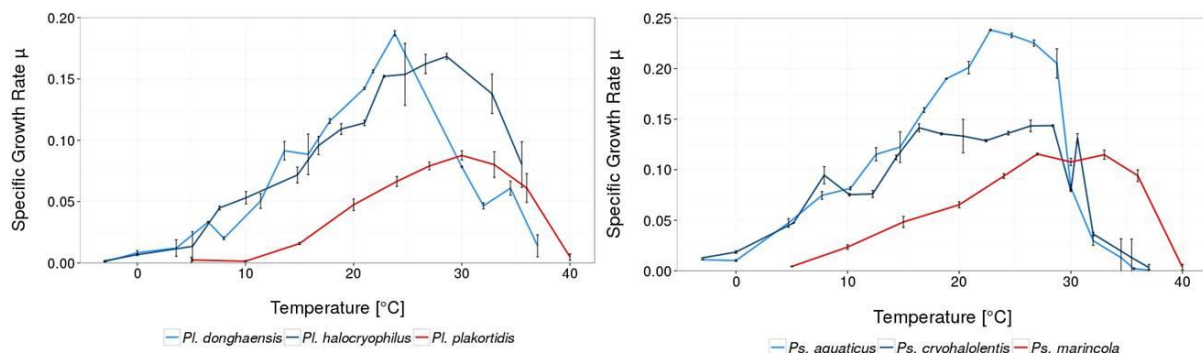
F Bajerski, J Overmann

Viele Mikroorganismen können standardmäßig gefriergetrocknet oder mit Gefrierschutzmittel kryokonserviert werden. Aber auch hier sind die genauen Prozesse nicht verstanden und einige Organismen oder komplexere mikrobielle Systeme lassen sich schwierig oder gar nicht einfrieren. Um Aufschluss über das Einfrierverhalten verschiedener Bakterien mit unterschiedlichen Anpassungsmechanismen zu erhalten, wurden im Rahmen des KAIT-Projektes mesophile Vertreter der Gattungen *Planococcus* und *Psychrobacter* mit deren psychrotoleranten Verwandten verglichen. Im Hinblick auf die institutsübergreifenden Analysen wurde das Einfrieren und Auftauen der verschiedenen Bakterienstämme mittels ATP

(Abb. 2 A) und Wiederanwachsen (Zellzahl und Zelltrübungsmessung) dokumentiert. Dabei wurde gezeigt, dass unterschiedliche morphologische Eigenschaften (Zellgröße, Gram-Verhalten) der verschiedenen Gattungen, auch im ATP-Gehalt deutlich werden. Außerdem haben die psychrotoleranten Bakterien grundsätzlich einen höheren ATP-Gehalt als ihre mesophilen Verwandten. Während des Prozesses des Einfrierens und Auftauens reagierten alle getesteten Bakterien ähnlich hinsichtlich ihres zellulären ATP-Gehalts. Die Zugabe von DMSO führte zu einer Abnahme des ATPs pro Zelle. In DMSO-behandelten *Psychrobacter*-Stämmen wurde der ursprüngliche ATP-Gehalt direkt nach dem Auftauen erreicht. Bei den psychrotoleranten *Planococcus*-Stämmen konnte ebenfalls ein ATP-Anstieg beobachtet werden, der jedoch unter dem des Ausgangs-ATP-Gehalt blieb, wohingegen der ATP-Gehalt des mesophilen Verwandten direkt nach dem Auftauen weiter abfiel. Nach dem Wiederanwachsen konnten alle Bakterienstämme den ursprünglichen ATP-Gehalt unter optimalen Bedingungen regenerieren und teilweise erhöhen. Die Kultivierbarkeit und der ATP-Gehalt waren dabei nicht korreliert. Insgesamt war die Kultivierbarkeit der psychrotoleranten Stämme nach dem Einfrieren und Auftauen besser als bei den mesophilen Verwandten.

Um diese Zusammenhänge besser zu verstehen, wurde anschließend der Einfluss verschiedener Kryoprotektoren (Einfrieren ohne Kryoprotektor, mit physiologischer Salzlösung, Glycerin oder DMSO) in einer Zeitserie (Auftauen nach 1, 7 und 30 Tagen in Flüssigstickstoff) untersucht. Auch hier wurden mesophile und psychrotolerante Vertreter der Gattungen *Planococcus* und *Psychrobacter* miteinander verglichen. Als erstes haben unsere Untersuchungen aufgezeigt, dass die Literatur für Artenbeschreibungen hinsichtlich des Temperaturwachstumsbereichs unvollständig ist. In den meisten Fällen lag die niedrigste bisher getestete Temperatur bei 4 °C, was insbesondere für eine psychrotolerante / psychrophile Gattung wie *Psychrobacter* unzureichend ist. So wurde das bisherige Temperaturminimum von 4 °C für *Planococcus donghaensis* und *Psychrobacter aquaticus* bis auf -5 °C erweitert (Abb. 3). In einem ersten Vergleichsansatz wurden für die psychrotolerant und mesophilen Bakterien die Phasenübergänge während der Kryokonservierung mittels DSC bestimmt. Der Vergleich der Gefrierschutzmittel zeigte, dass Glycerol die Kristallisation fast vollständig verhindert, während DMSO-behandelte Zellen noch kristallisieren. Alle untersuchten kälteangepasste Bakterien induzierten einen Glasübergang bei sehr niedrigen Temperaturen (-18 °C bis -45 °C), was auf einen möglichen Metabolismus bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt hindeutet, wodurch der Organismus direkt metabolisch auf das Einfrieren und Auftauen reagieren kann. Der Glasübergang bei -45 °C ist der bisher niedrigste dokumentierte Glasübergang für ein Bakterium.

Abb. 3 Temperaturbereich für das Wachstum von a) *Planococcus* und b) *Psychrobacter*-Stämmen. Die mesophilen Stämme sind rot gefärbt, die psychrotoleranten Stämme blau. Die psychrotoleranten Stämme wachsen bei Temperaturen unter 0 °C und ihr optimales Wachstum ist zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Die mesophilen Stämme zeigen kein oder nur ein schwaches Wachstum bei 10, 5 und 0 °C und der Temperaturbereich für das Wachstum ist deutlich zu höheren Temperaturen verschoben.



Die Kultivierbarkeit nach Kryokonservierung unterschied sich zwischen mesophilen und psychrotoleranten Stämmen. Die Rekultivierung direkt nach dem Einfrieren und Auftauen ohne CPA führte zu einer erhöhten Kultivierbarkeit im mesophilen *Ps. marincola* und in den psychrotoleranten *Planococcus*-Stämmen. In den meisten Versuchsansätzen nahm die Kultivierbarkeit der Stämme mit der Zeit ab, mit Ausnahme der psychrotoleranten *Psychrobacter*-Stämme, die ohne Kryoprotektor kryokonserviert wurden. Außerdem erhöhte sich die Kultivierbarkeit in den mit DMSO-behandeltem *Ps. marincola*. Nach dem Wiederaanwachsen nahm die Kultivierbarkeit der mesophilen Stämme von *Psychrobacter* und *Planococcus* im Laufe der Zeit ab, war in den psychrotoleranten Stämmen *Pla. donghaensis*, *Pla. halocryophilus* und *Psy. aquaticus* stabil und nahm in *Psy. cryohalolentis* kontinuierlich zu. Die eindeutigen Effekte des Einfrier- und Tauverfahrens auf die Kultivierbarkeit wurden nach sukzessiver Rekultivierung minimiert, wobei die psychrophilen gegenüber den mesophilen Vertretern der Gattungen mit zunehmender Einfrierdauer eine bessere Kultivierbarkeit zeigten.

Die Verwendung von Kryoprotektoren senkt den zellulären ATP-Gehalt, wobei Glycerin eine höhere Wirkung als DMSO hat. Die Verwendung einer physiologischen Salzlösung führt zu einer ATP-Erhöhung in *Pla. plakortidis*, *Pla. halocryophilus* und *Psy. aquaticus*. Im Zeitverlauf nahm der ATP-Gehalt jeweils nach dem Einfrieren, Auftauen und Wiederaanwachsen zu. Die Messungen nach der Rekultivierungsphase zeigen für *Psy. marincola* eine negative Korrelation von ATP und Kultivierbarkeit mit der Zeit und eine positive Korrelation für *Psy. cryohalolentis* und in gewissem Maße auch für *Psy. aquaticus*. Der Effekt ist bei allen Behandlungen ähnlich (mit oder ohne Kryoprotektant). Die Reaktion (Anstieg des ATPs) direkt nach dem Einfrieren und Auftauen ist umso höher, je länger die Zellen gefroren sind. Der gleiche Effekt konnte für *Planococcus*-Stämme nach der Wiederaanwachstumsphase beobachtet werden. Eine positive Korrelation von ATP-Gehalt und Kultivierbarkeit (beide ansteigend) scheint bei der Gattung *Planococcus* auf einen besseren Kryokonservierungserfolg der psychrotoleranten Spezies hinzuweisen. Insgesamt wurde gezeigt, dass die getesteten psychrotoleranten Stämme gegenüber ihren mesophilen Verwandten während der Kryokonservierung im Vorteil waren. Jedoch spielen andere Faktoren, wie die Auswahl des Kryoprotektors und die Zeit des Einfrierens eine ebenso große Rolle. Die beobachteten Unterschiede der Gattungen lassen auf unterschiedliche Anpassungsmechanismen innerhalb der biologischen Diversität schließen.

Einfrierverhalten pflanzlicher Zelllinien und Einfluss der osmotischen Vorbehandlung

E Heine-Dobbernack, HM Schumacher

Für die Arbeiten mit pflanzlichen Zellkulturen wurde bei Projektbeginn zunächst eine Zellkultur von *Solanum tuberosum* cv. Desirée als Modellsystem ausgewählt. Für diese Zellkultur bestand bereits eine etablierte Kryokonservierungsmethode. Außerdem existierte eine genetisch transformierte Variante dieser Zellkultur, die durch Überexpression eines PR Proteins eine erhöhte Salz-, Osmo- und Kryotoleranz aufwies.

Für Experimente stand zusätzlich eine Zellkultur von *Arabidopsis thaliana* der Wildtyp Akzession C24 bei der DSMZ zur Verfügung. Im späteren Verlauf des Projektes wurde zusätzlich eine Zellkultur der Wildtyp Akzession Columbia0 von *Arabidopsis thaliana* angelegt. Für beide Zelllinien wurden Kryokonservierungsverfahren etabliert.

Zunächst wurden in Kooperation mit dem IPK Gatersleben mit Hilfe der DSC Methode verschiedene physikalische Parameter bei den verwendeten Kryokonservierungsverfahren für die verschiedenen Zellkulturen und ihre Kulturmedien bestimmt. Hierbei zeigte sich für die verwendeten Kryoprotektormedien, dass mit zunehmender Sorbitolkonzentration die Schmelztemperatur und die spezifische Schmelzenthalpie abnehmen. Gleichzeitig stieg die Glasübergangstemperatur der Lösungen leicht an. In den *Solanum tuberosum*-Medien trat bei Verwendung von 5 % DMSO ein Glasübergang erst ab 0,8 M Sorbitol, mit 10% DMSO dagegen auch bei niedrigen Sorbitkonzentrationen auf. In den *Arabidopsis thaliana*-Medien

konnte bei beiden DMSO-Konzentrationen unabhängig von der Sorbitolkonzentration ein Glasübergang nachgewiesen werden. Messungen wurden durchgeführt an Medien, Suspensionen, den abfiltrierten Zellen und dem Suspensionsüberstand. Die Ergebnisse dienen zunächst der Festlegung künftiger Messparameter bei den verschiedenen im Projekt bearbeiteten biologischen Materialien. Sie lieferten nützliche Informationen über den Zustand von Zellen und Lösungen bei verschiedenen Temperaturen, es konnten aber keine entscheidenden Schlussfolgerungen für das Einfrierverhalten oder die Kältetoleranz der Zellen gezogen werden.

In Kooperation mit der SAG in Göttingen wurde die genetische Stabilität der Zellkulturen der Kartoffeln nach Kryokonservierung untersucht. In zahlreichen früheren Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen war die Stabilität der DNA Sequenz nach Regeneration kryokonservierter Proben festgestellt worden. Mit Hilfe der methylierungssensitiven AFLP Methode sollte untersucht werden, ob während des direkten Gefrierens in flüssigem Stickstoff Veränderungen der Methylierungsrate der DNA auftreten. Zur Durchführung der Untersuchungen wurden bei der DSMZ in Braunschweig Zellkulturen angezogen. Frisches Probenmaterial und direkt in flüssigem Stickstoff eingefrorenes Probenmaterial wurde in Göttingen bei der SAG untersucht. Bei der in Göttingen entwickelten Methode wurde ein DNA Verdauungsschritt mit den isoschizomeren Restriktionsenzymen *HpaII* und *MspI* durchgeführt. Ermittelt wurde damit die Methylierungsrate von CCGG Sequenzen vor und nach dem Einfrieren in Flüssigstickstoff sowohl bei den Wildtyp-Kulturen als auch bei den genetisch veränderten Kulturen von *Solanum tuberosum* cv. Desirée. Die Ergebnisse zeigten, dass das Einfrieren in Flüssigstickstoff die Methylierungsrate sowohl beim Wildtyp als auch beim GMO nicht veränderte. Allerdings wurden Methylierungsunterschiede zwischen den zwei untersuchten Proben der genetisch transformierten Zellkultur festgestellt. Da die transformierten Kulturen, um Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen nicht-transformierter Kulturen zu ermöglichen, ohne Zusatz von Antibiotika kultiviert wurden, könnten solche Unterschiede durch populationsdynamische Prozesse in der Zellkultur entstanden sein.

In einem vergleichenden Ansatz wurde die wichtige Frage des energetischen Zustandes der Pflanzenzellen während des Kryokonservierungs-Prozesses untersucht. Hierzu wurde zunächst eine Methode zur ATP Bestimmung in pflanzlichen Zellkulturen entwickelt. Anders als bei Bakterien und menschlichen Zelllinien waren bei pflanzlichen Zellkulturen ein Extraktionsschritt sowie die Inaktivierung ATP-abbauender Enzyme nötig, bevor eine Lumineszenzbasierte Messung des ATP-Gehaltes durchgeführt werden konnte. Die Extraktionsmethode für ATP bei Pflanzenzellen wurde in Kooperation mit dem IPK etabliert (Methode abgeändert von Smyth and Black, 1984). Da der ATP Gehalt in der Zellkultur in Relation zur Zahl der lebenden Zellen gemessen werden sollte, musste die bislang verwendete Methode zur Messung des Prozentsatzes lebender Zellen ersetzt werden. Diese Methode basierte auf der Reduktion von TTC durch mitochondriale Dehydrogenasen, die ebenfalls vom energetischen Status der Zellen abhängig ist. Stattdessen wurde der Evans Blue Test verwendet, der die Lebensfähigkeit ausschließlich durch Messen der Membranschädigung ermittelt. Eine entsprechende Methode für *Solanum tuberosum* wurde entwickelt. ATP Gehalt und Anteil der lebenden Zellen in der Zellkultur wurden in verschiedenen Stadien des Einfrierprozesses gemessen (Abb. 2 D): 1. Im Ausgangszustand (BF), 2. nach osmotischer Vorbehandlung und Kryoprotektion (BF_treat) 3. nach dem Einfrieren (AF), 4. nach einwöchiger Regenerationsphase (RG1) und 5. nach fünfwöchiger Regenerationsphase (RG5). Dabei korrespondierte im Ausgangszustand (BF) ein ATP Gehalt von $8,9 \text{ nmol ATP gFW}^{-1}$ mit 96 % lebenden Zellen (LC). Während der Vorkultur nahm der Anteil lebender Zellen und der ATP Gehalt in Abhängigkeit von der angewendeten Sorbitolkonzentration ab. Insgesamt entsprach in dieser Phase die Abnahme des ATP-Gehaltes etwa der Abnahme der Zahl lebender Zellen. Der ATP Gehalt pro Zelle war leicht erhöht. Der absolute ATP Gehalt und der Anteil lebender Zellen waren nach dem Einfrieren am geringsten. Der ATP Gehalt pro Zelle war ab einer Sorbitolkonzentration von 0,6 M höher als in den vorangehenden Phasen und stieg mit der osmotischen Konzentration der Vorbehandlung. Die ATP-Gehalte erholten sich in der RG_1 Phase bei höher-osmotischer Vorbehandlung, während der Anteil der lebenden Zellen

durchweg niedrig blieb, so dass sich der ATP Gehalt pro Zelle, abhängig vom Grad der Vorbehandlung, stark erhöhte. Nach 5 Wochen Regeneration zeigte sich, dass die Zellen ohne oder mit nur geringer osmotischer Vorbehandlung nicht überlebt hatten, während mit höheren Sorbitolkonzentrationen auch der Anteil lebender Zellen wieder deutlich gestiegen war. Das Wiederanwachsen nach Kryokonservierung hängt also stark von der osmotischen Vorbehandlung ab (Abb. 4). Der ATP-Gehalt erreichte für Zellen mit 0,6 molarer Sorbitol-Vorbehandlung den Ausgangszustand, mit 1,2 molarer Sorbitol-Vorbehandlung war er sogar signifikant erhöht. Der ATP Gehalt pro Zelle war geringer als in der RG1-Phase, aber höher als der Ausgangswert.

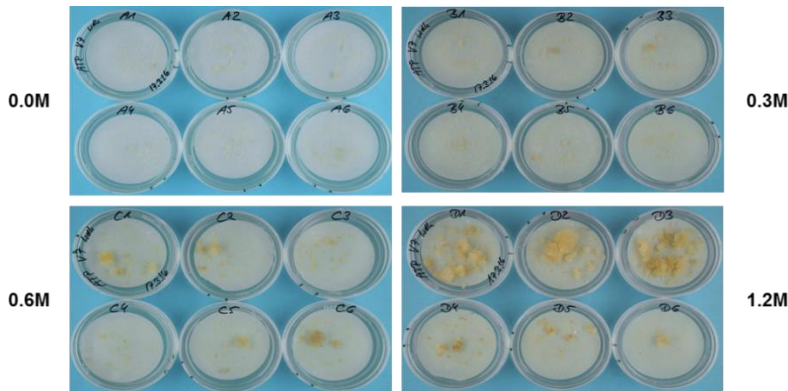


Abb. 4. Wiederanwachsen nach Kryokonservierung und 5w Regenerations-Phase (RG5) in Abhängigkeit von der Sorbitol-Vorbehandlung.

Humane Zelllinien

L Naujox, R MacLeod, H Drexler, S Eberth

Im Rahmen des geförderten Projekts erfolgte eine systematische Analyse der Einflüsse der Kryokonservierung in DMSO-haltigem Einfriermedium auf exemplarische sogenannte kryosensitive Krebszelllinien im Vergleich zu kryorobusten Zelllinien. Um zelltypabhängige Faktoren auszuschließen wurden isogene Schwesterzelllinien ausgewählt, von denen auf Basis der internen empirischen Daten jeweils eine kryorobust, die andere kryosensitiv war. Zwei Modellsysteme wurden gefunden und im Projekt verwendet: MAC-1 und MAC-2A sowie JURL-MK1 und JURL-MK2 (siehe Abb. 5).

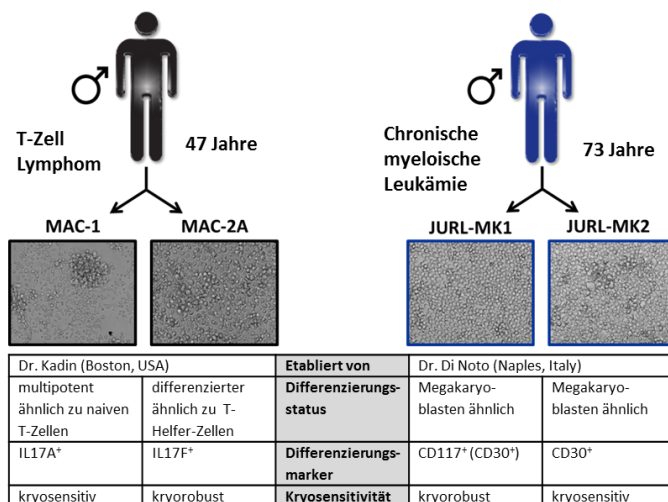


Abb. 5. Verwendete isogene Schwesterzelllinien mit unterschiedlicher Kryosensitivität. Die isogenen Krebszelllinien stammen jeweils aus dem gleichen hämatologischen Tumor desselben Patienten.

Die systematische Analyse von Viabilität und Wachstumsrate der beiden isogenen Schwesterzelllinien nach dem Auftauen zeigte, dass die Kryokonservierung bei beiden kryosensitiven Zelllinien nur zu geringen temporären Einbußen führt (Abb. 6). MAC-1 Zellen hatten nach dem Auftauen eine ca. 20 % geringere Viabilität als MAC-2A Zellen, erreichten aber innerhalb von 2 Tagen ebenfalls eine Viabilität von über 90 %. Die Zelllinien JURL-MK1 und JURL-MK2 zeigten beide keine Viabilitätsverluste nach der Kryokonservierung, allerdings war die Wachstumsrate der JURL-MK2 in den ersten Tagen nach dem Auftauen deutlich geringer (lag-Phase) als die der JURL-MK1. Dieser Effekt wird jedoch nicht allein durch die Kryokonservierung hervorgerufen. Grundsätzlich haben diese beiden Linien unterschiedliche Verdopplungszeiten. Diese Unterschiede wurden durch Analysen der metabolischen Aktivität (NADH-Level über MTT Assay), welche proportional zur Verdopplung ist, bestätigt: JURL-MK1-Zellen wiesen unabhängig vom Einfrierprozess eine höhere Stoffwechselaktivität als JURL-MK2 auf. Die Unterschiede zwischen MAC-1 und MAC-2A waren hingegen nicht signifikant. Analog zu den Studien mit den anderen Organismen in diesem Projekt, wurden Analysen des ATP-Gehalts/Zelle während des Einfrierprozesses und beim Wiederauwachen durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im ATP-Gehalt/Zelle (Abb. 2 C). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der konstant hohen Viabilität der verwendeten Krebszelllinien vor und nach der Kryokonservierung und bestätigt einmal mehr, dass ATP-Assays für kontinuierliche Zelllinien zweifelsfrei als Viabilitätsmarker eingesetzt werden können.

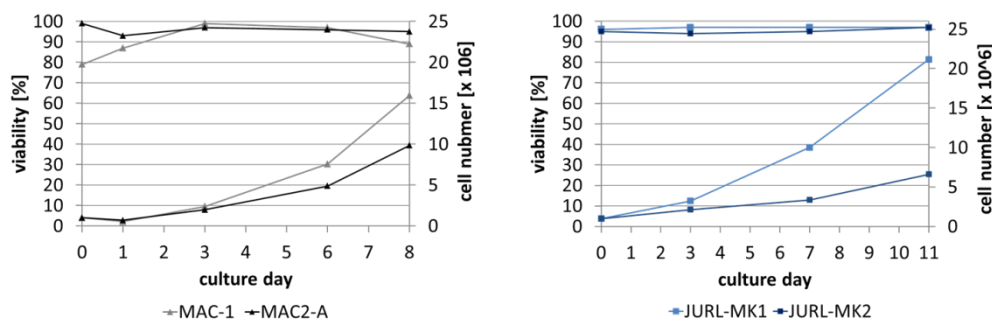


Abb. 6. Viabilität und Wachstum der isogenen Schwesterzelllinien nach Kryokonservierung.

Um gezielt den Einfluss von DMSO auf die isogenen Krebszelllinien zu untersuchen wurde zunächst der IC₅₀ bei Kultivierung in Gegenwart des Kryoprotektors bestimmt. Der Unterschied innerhalb eines Schwesterzelllinienpaares war marginal. Grundsätzlich waren aber die JURL-MK1 (IC₅₀ = 1,36 %) und JURL-MK2 Zellen (IC₅₀ = 1,33 %) sensitiver gegenüber DMSO als die MAC-1 (IC₅₀ = 1,89 %) und MAC-2A Zellen (IC₅₀ = 2,19 %). Die DMSO-Sensitivität scheint folglich in keinem direkten Zusammenhang mit den beobachteten Viabilitäts- bzw. Wachstumsunterschieden nach Kryokonservierung in DMSO-haltigem Einfriermedium zu stehen. Da bekannt ist, dass DMSO Einfluss auf das Epigenom und den Differenzierungsstatus einer Zelle nehmen kann, wurde schließlich überprüft, ob die Expression von epigenetisch-aktiven Enzymen und Differenzierungsmarkern durch den Kryoprotektor beeinflusst wird. In der Tat konnte mittels quantitativer PCR gezeigt werden, dass DMSO die Expression von Differenzierungsmarkern in den beiden kryosensitiven Zelllinien herunter reguliert. Interessanterweise wurde auch die Expression des in die DNA-Demethylierung involvierten Enzyms TET3 in drei der vier Zelllinien herunterreguliert.

Zusammengefasst zeigte sich in diesem Teilprojekt, dass die Kryokonservierung von kontinuierlichen Tumorzelllinien in DMSO-haltigem Einfriermedium und das Wiederauwachen insgesamt sehr erfolgreich angewendet werden. Die zuvor empirisch beobachtete Kryosensitivität der untersuchten Modellzelllinien ist systematisch betrachtet eher gering ausgeprägt und Wachstums- wie Viabilitätsunterschiede ein temporäres gut handhabbares Phänomen, welches auch von natürlichen Unterschieden zwischen den Verdopplungszeiten der Zelli-

nien beeinflusst wird. Interessant ist aber die Beobachtung, dass in den kryosensitiven Zelllinien die Expression von Differenzierungsmarkern durch DMSO beeinflusst wurde sowie unabhängig von der Kryosensitivität die Aktivität von epigenetisch aktiven Enzymen verändert wurde. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob diese Nebenwirkungen von allgemeiner Bedeutung sind und ob der Einsatz des Kryoprotektors DMSO zu irreversiblen Veränderungen in den Tumorzelllinien führt. Sollte der Einfluss von DMSO nicht reversibel sein, könnte ein Selektionsdruck auf die Zellkultur ausgeübt werden und die Bildung von Subklonen die Folge sein.

Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (EPSAG)

Effekte der Kryokonservierung auf die epigenetische Stabilität und den ATP-Gehalt von Mikroalgen

T Darienko, M Siegesmund, M Lorenz, T Friedl

Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Kryokonservierung die genetische und phänotypische Stabilität von Organismen optimal unterstützt. Aber Temperaturextreme, Kryoprotektoren und Kryoschädigungen durch freie Radikale können Kryostress und genetische Veränderungen verursachen. Die genetische Stabilität von kryokonservierten Mikroalgen wurde durch Analysen des amplifizierten Fragmentlängenpolymorphismus (AFLP) nachgewiesen (Müller et al. 2007). Es blieb jedoch unklar, ob kleine Veränderungen bei einigen kryokonservierten Stämmen auf genetische (Mutationen) oder epigenetische Effekte (DNA-Methylierung) zurückzuführen sind. Daher analysierten wir die epigenetische Integrität in kryokonservierten grünen Mikroalgen mittels Cytosin-methylierungssensitiver AFLP (MS-AFLP unter Verwendung von MspI- und Hpa II-Enzymen). Im Rahmen des KAIT-Projekts wurde die MS-AFLP erstmals eingesetzt, um epigenetische Effekte von Kryostress auf Algen und andere Organismen nachzuweisen. Um ihr Potential als Routinemethode in Kryokonservierungsstudien zu testen, wurde MS-AFLP verwendet, um a) die Methylierungsrate und b) das Methylierungsmuster vor und nach der Kryokonservierung zu detektieren.

DNA-Methylierungsraten

Bisher sind nur wenige Studien über die DNA-Methylierung von Algen veröffentlicht. Um eine Basislinie zu erhalten, wurde die Methylierungsrate von 20 Stämmen kokkaler Mikroalgen ermittelt, welche 6 Gattungen aus zwei Klassen von Grünalgen repräsentierten (Fig. 7). Hauptsächlich wurden Arten der Gattungen *Chlorella* (Trebouxiophyceae) und *Acutodesmus* (Chlorophyceae) ausgewählt, da diese in Lebensräumen mit hoher Temperaturvariabilität weit verbreitet sind und Modellorganismen (*A. obliquus*, *C. vulgaris*, *C. variabilis*) und biotechnologisch wichtige Arten enthalten. Beide Gattungen enthalten laut früherer Studien kryosensitive und kryorobuste Arten.

Die DNA-Methylierungsraten ungestresster Grünalgen variierten zwischen 26 und 57% (Fig. 6). Die Methylierungsrate in allen 9 untersuchten *Acutodesmus*-Stämmen war signifikant höher (47-57 %) als in *Chlorella* (7 Stämme, 40-43 %). Ein Stamm von *Micractinium*, eng verwandt mit der Gattung *Chlorella*, hatte eine ähnliche Methylierungsrate von 41 %. Im Gegensatz dazu zeigte *Viridiella fridericiana*, eine aus heißen Fumarolen isolierte extremophile Alge, eine viel niedrigere Methylierungsrate (26 %) als alle anderen untersuchten Stämme. Um prinzipielle phylogenetische oder ökophysiologische Unterschiede in der DNA-Methylierungsrate nachzuweisen, sind weitere Analysen erforderlich.

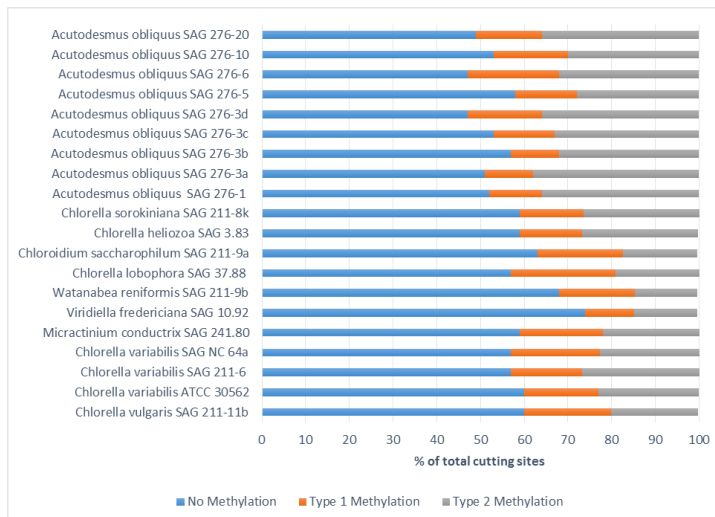


Abb. 7. DNA-Methylierungsraten von 20 Stämmen kokkaler Grünalgen, analysiert mittels Cytosin-Methylierungs-sensitiver AFLP (MS-AFLP unter Verwendung von MspI- und Hpa II-Enzymen).

DNA-Methylierungsraten vor (Prekryo) und nach Kryokonservierung (2 Wochen Postkryo) von insgesamt 16 Stämmen ermittelt und erwiesen sich als relativ stabil. Alle 9 Stämme der sehr kryorobusten Art *Acutodesmus obliquus* waren vor und nach der Kryokonservierung durch sehr stabile Methylierungsraten charakterisiert (<1% Unterschied). Zum Vergleich wurden Kryoeffekte auf Methylierungsraten in *Chlorella*-Stämmen und nahen Verwandten gemessen. Diese umfassten Stämme, von denen bekannt war, dass sie kryobust (z. B. *C. vulgaris*), kryosensitiv (1 Stamm von *C. variabilis*) und mittelempfindlich (z. B. *Micractinium conductrix*) sind. Alle Stämme zeigten während der Kryokonservierung kleine Veränderungen (3-10%) in der Methylierungsrate (Tab. 1). Die Unterschiede korrelierten jedoch nicht mit der Kryosensitivität.

Tab. 1. Auswirkungen der Kryokonservierung auf die DNA-Methylierungsrate und das DNA-Methylierungsmuster verschiedener Mikroalgen. Vergleich von 7 Grünalgenstämmen unterschiedlicher Kryosensitivität. Überlebensraten ermittelt durch FDA-Vitalfärbung.

Stamm-Nr.	Art	DNA-Methylierungsrate [%]			Überlebensrate [%]	Kryosensitivität (*robust, **mittel, ***sensitiv)	Variabilität des MS-AFLP Musters [% variable Positionen]
		pre-kryo	post-kryo 2Wo. Regeneration	post-kryo 8 Wo. Regeneration			
ATCC 30562	<i>Chlorella variabilis</i>	40	36	35	40-47	***	33,2
SAG 211-6	<i>Chlorella variabilis</i>	43	36	35	56-63	**	38,6
SAG 241.80	<i>Micractinium conductrix</i>	41	42	45	57-62	**	15,7
SAG 211-11b	<i>Chlorella vulgaris</i>	40	39	31	87-91	*	39,3
SAG 10.92	<i>Viridiella fridericiana</i>	26	36	26	75-85	*	45,9

SAG 211-9b	<i>Watanabea reniformis</i>	32	37	38	77-84	*	45,1
SAG 37.88	<i>Chlorella lobophora</i>	43	47	n.d	85-90	*	32,2

DNA-Methylierungsmuster

Entgegen der Hypothese, dass die Organismen auf epigenetischer Ebene auf Kryostress reagieren werden, erwiesen sich die Methylierungsraten als relativ stabil. Daher wurde eine weitergehende Analyse der MS-AFLP-Methylierungsmuster etabliert. So konnten signifikante, kryoinduzierte Unterschiede in den Methylierungsmustern nachgewiesen werden (Tab.1 und Abb. 8). Ausführliche Analysen an 7 Stämmen ergaben eine hohe Variabilität von 16 bis 46% aller Schnittstellen. Diese Unterschiede basierten auf der zunehmenden allgemeinen Anzahl von Schnittstellen und dem Verlust oder Gewinn von MS-AFLP-Fragmenten und könnten auf epigenetische Veränderungen durch Hoch- oder Herunterregulierung einzelner Gene zurückzuführen sein.

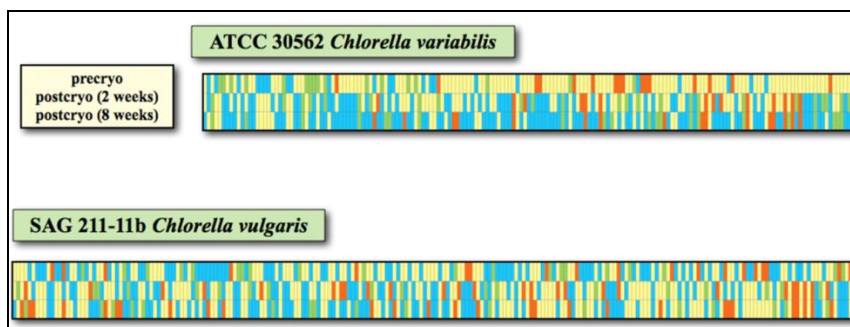


Abb. 8. Beispiel für kryoinduzierte Variationen des Methylierungsmusters eines kryorobusten (*C. vulgaris*) und eines kryosensitiven Mikroalgenstammes (basierend auf EcoRI + C MS-AFLP, Fragmente mit identischem Status nicht dargestellt).

In einigen Stämmen unterschied sich das Methylierungsmuster nach 2 Wochen Regeneration stärker von den Prekryo-Proben als nach längerer Regeneration. In anderen Stämmen ähnelten sich die Postkryo-Methylierungsmuster jedoch untereinander stärker als den Prekryo-Proben. Die Methylierungsmuster eines kryosensitiven und eines mittelempfindlichen Stammes von *Chlorella variabilis* zeigten unterschiedliche epigenetische Reaktionen auf Kryostress. Der kryorobuste Modellorganismus *Chlorella vulgaris* zeigte mehr kryoinduzierte Veränderungen im Methylierungsmuster als die kryosensitiven und mittelempfindlichen Stämme von *Chlorella variabilis*. Vermutlich können sich kryorobuste Mikroalgen durch Hoch- oder Herunterregulierung vieler Gene epigenetisch besser an Kryostress anpassen. Welche Gene hoch- oder herunterreguliert werden lässt sich mit der deskriptiven MS-AFLP-Methode leider nicht nachweisen. Hierzu sind andere Verfahren erforderlich (z. B. Bisulfit-Sequenzierung; Sequenzierung von Restriktionsstellen-assoziierten DNA-Markern).

Epigenetische Effekte des Kryoprotektors DMSO

An drei Stämmen (SAG 211-11b *Chlorella vulgaris*, ATCC 30562 *Chlorella variabilis* und SAG NC64A *Chlorella variabilis*) wurde der alleinige Einfluss des toxischen Kryoprotektors DMSO auf die epigenetische Stabilität untersucht. Die Methylierungsmuster wurden stark von einer DMSO-Inkubation beeinflusst, die vergleichbar mit der Standardbehandlung bei der Kryokonservierung war. Aber im Gegensatz zu den Kryokonservierungsexperimenten nahmen auch die Methylierungsraten zu. Weitere Experimente sind notwendig, um einen experimentellen DMSO-Bias auszuschließen.

Epigenetische Stabilität bei langjähriger Kultivierung

Trotz einiger Nachteile ist der serielle Transfer von lebenden Kulturen immer noch eine verbreitete Methode zur Archivierung der mikrobiellen Diversität von Mikroalgen. Um die Stabili-

tät über langen Perioden des seriellen Transfers zu testen, wurde die Methylierungsrate von zwei DNA-Proben eines Stammes verglichen, die 2006 bzw. 2014 extrahiert wurden. Die Methylierungsraten waren auch über viele Generationen hinweg äußerst stabil. Leider waren keine weiteren für MS-AFLP-Analysen geeigneten alten DNA-Proben für einen weiteren Vergleich verfügbar.

ATP-Gehalt als universeller Stressparameter

Der ATP-Gehalt wurde als universeller physiologische Stressparameter in Kooperation mit dem HKI gemessen. Die ATP-Gehalte waren bei kryorobusten Stämmen insgesamt höher, verringerten sich jedoch bei allen untersuchten Mikroalgen unter Kryostress (Abb. 2 B). Kryosensitive Organismen zeigten einen signifikant höheren ATP-Verlust. Eine vollständige Wiederherstellung des ursprünglichen ATP-Gehaltes zeigten nur kryorobuste Stämme, während es bei einigen mäßig-kryorobusten und kryosensitiven Organismen keine oder nur eine geringe Regeneration gab. Somit erwiesen sich ATP-Messungen als geeignet für die Detektion von Kryokonservierungsstress in Algen. Die praktische Anwendung für Algen ist jedoch wegen der notwendigen hohen Biomasse pro Probe fraglich (50 ml Kultur, $3,5-5,0 \times 10^7$ Zellen / ml). Zusätzlich behindern robuste Algenzellwände die Extraktion und es ist schwierig, einen geeigneten Referenzparameter zu finden. In unserer Studie haben wir verschiedene Parameter (Gesamtprotein und Chlorophyllgehalt) verwendet.

Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie Hans-Knöll-Institut (HKI)

Kälte- und Kryoanpassung des filamentösen Pilzes *Aspergillus nidulans*

B Hanf, O Kniemeyer, A Brakhage

Das Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie erforscht die Biologie von Pilzen mit den Schwerpunkten mikrobielle Naturstoffe und Infektionen. Im Rahmen des KALT-Projektes untersuchten wir die Anpassung von Pilzen an Kälte- und Kryostress.

Repräsentativ für die Pilze wurde die Spezies *Aspergillus nidulans* gewählt, bei dem es sich um einen gut charakterisierten, nicht-pathogenen, filamentösen Pilz handelt, der sich durch die Klassifizierung S1 auch für Arbeiten in Partnerlaboratorien dieses Projektes eignete. Zu Beginn des Projektes war bisher wenig über die Kältestressanpassung filamentöser Pilze bekannt. Im Fall von *A. nidulans* wurde nicht nur die Anpassungsfähigkeit der Sporen, sondern auch das Myzels ausgewertet. Bei *A. nidulans* fiel der ATP-Gehalt gleichzeitig mit der Temperatur ab (Abb. 2 C). Sobald diese wieder erhöht wurde, stieg auch der ATP-Gehalt entsprechend an (Abb. 9). Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität wurde auch der Sauerstoffverbrauch normalisiert zur Biomasse gemessen. Dieser war im Vergleich zum Sauerstoffverbrauch vor dem Einfrierprozess signifikant erhöht. Dies deutet darauf hin, dass nach Kryo-Konservierung die Zellen intakt bleiben, jedoch der Energiebedarf steigt, um entstandene Zellschäden zu reparieren.

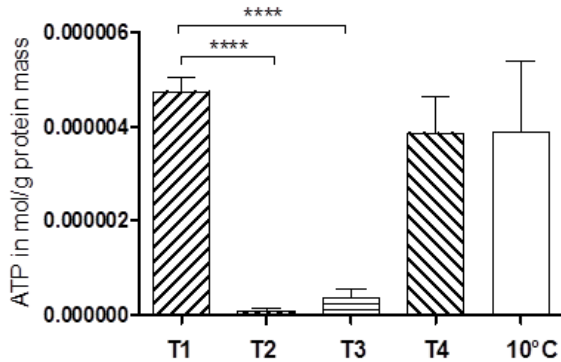


Abb. 9. ATP Level während des Einfrierprozesses in *A. nidulans*: T1 vor dem Einfrieren, T2 nach dem Einfrieren auf -80°C , T3 nach dem Auftauen, T4 nach dem rekultivieren für 12 h, 10°C Kultivierung der Zellen bei 10°C . Der ATP-Gehalt wurde anhand der Proteinmenge normalisiert.

Um die Stressresistenz von Pilzsporen und Myzel nach Kryokonservierung zu testen, wurde deren Vitalität nach dem Einfrieren und Auftauen ermittelt. Pilzsporen wurden in verschiedenen Glycerin-Konzentrationen eingefroren, wieder aufgetaut und die Überlebensrate anhand von koloniebildenden Einheiten bestimmt. Die höchsten Überlebensraten wurden mit 98% Glycerin im Mischungsverhältnis 1:1 (V:V) zum Wachstumsmedium (*Aspergillus Minimal Medium*) erzielt. Für die Pilz-Hyphen wurde der Sauerstoffverbrauch zur Vitalitätsbestimmung nach dem Einfrieren gemessen. Diese war vergleichbar mit der Kontrolle, die nicht eingefroren wurde. Ein Kryoprotektor ist somit nicht notwendig, um das Myzel bei der Kryokonservierung zu schützen.

In darauffolgenden Experimenten sollte auf molekularer Ebene untersucht werden, welche Prozesse bei niedrigen Temperaturen induziert werden und zur Resistenz gegenüber Kältestress beitragen. Dafür wurden zuerst Bedingungen definiert, bei denen Kältestress vorliegt, der Pilz aber noch wächst und metabolisch aktiv ist. Bei 10°C war aktiver Glukoseverbrauch und Wachstum nachweisbar, kaum mehr aber bei niedrigeren Temperaturen. Mittels verschiedener Omics-Ansätze wurden Kulturen bei 10°C mit Kulturen bei 37°C als optimale Wachstumstemperatur miteinander verglichen. Durch den integrierten Omics-Ansatz wurden viele unterschiedliche Aspekte der Kältestressanpassung beleuchtet, wodurch interessante Entwicklungsprozesse und metabolische Wege zum ersten Mal mit Kältestress in Verbindung gebracht werden konnten:

Mit Hilfe der von Transkriptom- sowie Proteomansätzen konnten Gruppen von Proteinen und Genen definiert werden, die bei 10°C eine erhöhte Anreicherung aufwiesen: 1) Kälteschutz, 2) Zelluläre Entwicklung und 3) Biosynthese von Sekundärmetaboliten. In der ersten Gruppe befanden sich Proteine und Gene wie z.B. Hitzeschock-Proteine oder Chaperone, die zur korrekten Faltung der Proteine beitragen. Weiterhin wurden Proteine und Gene gefunden, die diverse Zellschäden, wie z.B. der DNA, reparieren. In der zweiten Gruppe befanden sich insbesondere Proteine und Gene, die auf Änderungen in der Zellentwicklung zurückzuführen sind. Es sind Proteine und Gene überrepräsentiert, die der sexuellen Entwicklung zugeordnet werden können. In der dritten Gruppe kommen vor allem Proteine und Gene vor, die an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten wie z.B. Asperfuranon oder nicht charakterisierten Sekundärmetaboliten beteiligt sind.

In weiteren Analysen, wie z.B. mit qRT-PCR, konnte bestätigt werden, dass Gene der sexuellen Entwicklung unter Kältestress stärker exprimiert werden. Außerdem wurden Zellstrukturen (Hüllezellen) mikroskopisch identifiziert, die spezifisch für die sexuelle Entwicklung sind. Ebenso wurden die Überstände der 10°C Kulturen und der 37°C Kulturen auf Sekundärmetabolite untersucht. Es wurden in den Kältestress-Kulturen Verbindungen detektiert, die unter

den optimalen Wachstumsbedingungen nicht nachweisbar waren. Zudem wurden mittels LC-MS/MS Peaks identifiziert, die auf neue, bisher nicht charakterisierte Sekundärmetabolite deuten. Diese wurden fraktioniert und auf biologische Aktivität getestet. Sie wirken gegen verschiedene Pilze und Gram-positive Bakterien wachstumshemmend. Im weiteren Verlauf sollen diese Sekundärmetabolite genauer charakterisiert und die zugehörigen Gen-Cluster identifiziert werden.

Da Regulation auf posttranskriptioneller Ebene weniger Energie verbraucht, wurden auch die Auswirkungen von Kältestress auf das Acetylom untersucht. Dabei konnten insbesondere Änderungen an Proteinen des Sekundärmetabolismus und der Zellentwicklung festgestellt werden.

Als Folgevorhaben zeigen sich in allen drei Bereichen Perspektiven auf: Für den Kältestress ist besonders interessant, wie die Zelle die niedrigen Temperaturen wahrnimmt und wie das Signal weiter verarbeitet wird. Dabei könnten Kälterezeptoren eine wichtige Rolle spielen, über die in filamentösen Pilzen bisher wenig bekannt ist. Für die Zellentwicklung ist der Aspekt besonders interessant, wie die Regulation von der asexuellen Entwicklung zur sexuellen Entwicklung durch Kälte induziert wird, da bisher nur eine Licht-Regulierung oder eine Regulation über Nährstoffmangel bekannt ist. Für die Biosynthese der Sekundärmetabolite ist deren Charakterisierung insbesondere im Hinblick auf den Wirkmechanismus interessant. Außerdem können sich mögliche Anwendungsperspektiven für die biologisch aktiven Moleküle ergeben.

Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)

Sprossspitzen von *Arabidopsis thaliana*

J Stock, J Keller, H-P Mock, Graner

Um die zellulären Anpassungen an den Kryostress in verschiedenen Spezies zu untersuchen, wählten die Projektpartner der DSMZ, des IPK, des HKI und der SAG fachspezifische Modellorganismen, darunter Bakterien, Pilze, Algen, pflanzliche Sprossspitzen und Zelllinien sowie humane Zelllinien. Veränderungen während der Kryokonservierung wurden mittels ATP, einem universellen Vitalitätsmarker, validiert. Im Allgemeinen und in allen Modellarten besaß das ATP unter optimalen Wachstumsbedingungen einen konstant hohen Ausgangsgehalt. Die nachfolgende Behandlung mit Kryoprotektoren führte zu einer ATP Abnahme. Während der Regenerationsphase stieg der ATP Gehalt wieder an und konnte als Marker für eine erfolgreiche Kryokonservierung im Allgemeinen und bei *Arabidopsis* Sprossspitzen im Speziellen verwendet werden.

Zur weiteren Aufklärung grundlegender kryokonservierungsspezifischer Mechanismen wurde die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zur Hilfe genommen. Hierzu wurde zunächst ein Kryokonservierungsprotokoll für *Arabidopsis* Sprossspitzen etabliert, welches auf eine Vielzahl von Wildtyp-Akzessionen anwendbar ist (Stock et al., 2017) und sich an die Verfahrensweise zur Kryokonservierung von Kartoffel anlehnt. Dieses Protokoll diene als Grundlage zur weiteren Untersuchung des Einflusses verschiedener Kandidatengene auf die Regenerationsfähigkeit von *Arabidopsis* Sprossspitzen.

Basierend auf einer Transkriptomstudie von Gross et al. (2016) konnten Kryostress-induzierte Gene in *Arabidopsis* identifiziert und charakterisiert werden. Durch die Arbeit mit transgenen T-DNA Insertionslinien konnten *WRKY22* und *PR5* (*Pathogenesis Related Gene 5*) als Kandidatengene detektiert werden. Der Knockout beider Gene führte zu einer verminderten Regenerationsfähigkeit im Vergleich zu den Wildtyp Pflanzen. Die regulatorischen Funktionen des Transkriptionsfaktor *WRKY22* wurden mit Hilfe einer Transkriptomanalyse untersucht (Kooperation mit DSMZ Sequenzierung). Der Vergleich von drei Phasen während der Kryokonservierung, 1) Sprossspitzenpräparation, 2) Dehydrierung und 3) Regeneration, deckte essentielle molekulare Anpassungen auf Ebene des Transkriptoms auf, die durch

Veränderungen auf ultrastruktureller Ebene bestätigt werden konnten. Insbesondere die Dehydrierung ist durch die Behandlung mit dem Kryoprotektor Plant Vitrification Solution 2 (PVS2) gekennzeichnet und verursacht eine De-Differenzierung der meristematischen Zellen im apikalen Sprossmeristem sowie Veränderungen im Primärmetabolismus. Während der nachfolgenden frühen Phase der Regeneration differenzierten sich meristematische Zellen, was eine direkte Sprossentwicklung zur Folge hatte. Sprossspitzen der *WRKY22*-T-DNA Insertionslinie zeigten besonders Veränderungen der Phytohormon-induzierten Trockenstressantwort. Bei *wrky22*-knockout Mutanten war der Trockenstress-induzierte Schließmechanismus der Stomatazellen gehemmt, was zu Veränderungen in der osmotischen Stressantwort führte.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *PR5* spezifisch während der Sprossspitzenpräparation in *Arabidopsis* induziert wird. Durch den Einsatz eines *in-vivo* Wasserstoffperoxidmarkers wurde nachgewiesen, dass das *PR5* Transkript in Abhängigkeit der zellulären Wasserstoffperoxidkonzentration exprimiert wird. Somit kann *PR5* als Marker für das Ausmaß der Zellschädigung nach der Sprossspitzenpräparation verwendet werden.

Die erzielten Ergebnisse dienen als Grundlage für einen weiterführenden DFG Antrag um weitere grundlegende Mechanismen, insbesondere den Einfluss und die Veränderung der Ribosomen während der Kryokonservierung von Sprossspitzen aufzuklären.

(Ludwig-Maximilians-Universität, München (LMU), Ultrastrukturforschung

Department Biologie I, Botanik)

Zellmorphologie der obligat symbiotischen bakteriellen Assoziation „*Chlorochromatium aggregatum*“

G Wanner

Durch Kryo-EM an der LMU wurde die Zellmorphologie der obligat symbiotischen bakteriellen Assoziation „*Chlorochromatium aggregatum*“ und damit der differentielle Effekt von Kryostress auf eine Symbiose zweier unterschiedlicher Bakterienarten untersucht. Das Konsortium besteht aus einem polar-begeißeltem Betaproteobakterium (Zentralbakterium), welches von grünen Schwefelbakterien (Epibionten) umgeben ist (Abb. 9). Diese Anordnung ist streng assoziiert und geordnet. Die mikroskopischen Analysen haben gezeigt, dass die Epibionten Polyphosphat als Granulat in der Zelle einlagern (Abb. 9 B). Die Epibionten sind mit einem Teil ihrer Zelloberfläche in direktem Kontakt mit dem Zentralbakterium (Abb. 10). Dieser Bereich kann bei den Epibionten durch die Abwesenheit von Chlorosomen (Lichtsammelkomplexe) definiert werden (Wanner *et al.*, 2008).

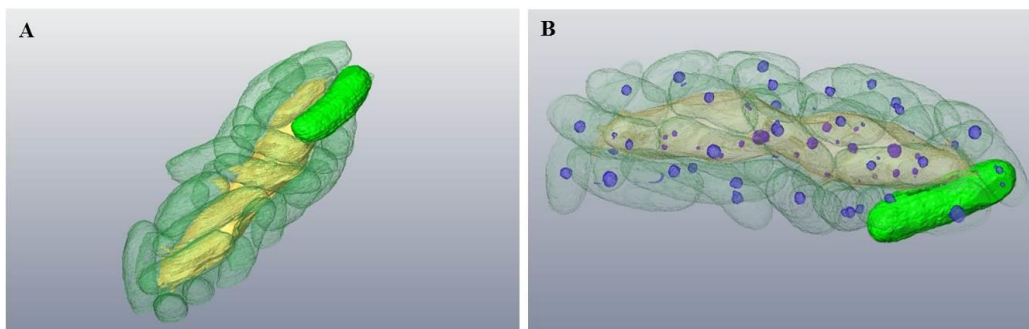


Abb. 9. FIB/SEM Serienschritte durch „*Chlorochromatium aggregatum*“ (Hochdruckkryofixierung, Einbettung in Eioxid). 3D-Rekonstruktion: Zentralstäbchen = gelb; Epibionten grün; Polyphosphatgranulae: violett.

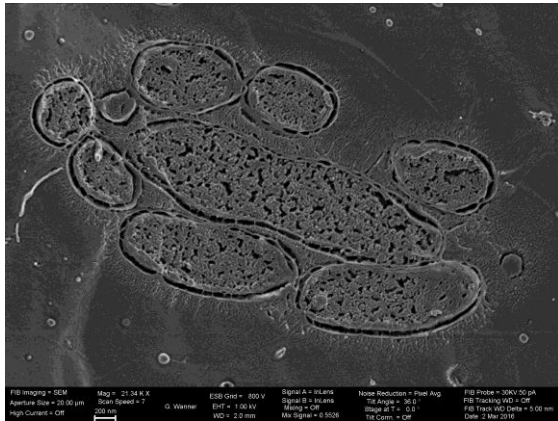


Abbildung 10. Kryobrüche durch „*Chlorochromatium aggregatum*“ (Hochdruckkryofixierung; Kryobruch und Krio-SEM frozen hydrated).

Veranstaltungen im Rahmen des KAIT Projektes

Mai 2013 Kick off Treffen, DSMZ Braunschweig

08.10.2013 Short Meeting im Rahmen der SLTB Konferenz, Hannover

10.-12.12.2013 Projekttreffen und DSC-Workshop, IPK Gatersleben

22.07.2014 Projekttreffen, EPSAG Göttingen

23.02.2015 Projekttreffen, HKI Jena

26.-29.07.2015 „KAIT-Session“ im Rahmen der CRYO Konferenz, Ostrava Tschechien

25.-26.11. 2015 Projekttreffen und Winter School Workshop, IPK Gatersleben

30.-31.05.2016 Abschlussprojekttreffen und Publikationsbesprechung, DSMZ Braunschweig

Publikationen im Rahmen des KAIT-Projektes

Publikationen

Bajerski F., Stock J., Hanf B., Darienko T., Heine-Dobbernack E., Lorenz M., Naujox L., Keller E. R. J., Schumacher M., Friedl T., Eberth S., Mock H.-P., Kniemeyer O. & Overmann J. (2017). The effect of cryostress on ATP content and cell viability across the diversity of life. To be submitted.

Stock J., Senula A., Nagel M., Mock H.-P., Keller E.R.J. (2017) A simple method for shoot tip cryopreservation of *Arabidopsis* genotypes. *Cryo Lett.* 38 (5) 364-371. In Press.

Stock J., Bräutigam A., Melzer M., Bunk B., Nagel M., Overmann J., Keller E.R.J., H.-P. Mock (2017) Adaptation to osmotic stress induced during *Arabidopsis thaliana* cryopreservation is regulated by *WRKY22*, a defense-related transcription factor. Submitted.

Stock J., Rutten T., Schwarzländer M., Keller E.R.J., H.-P. Mock (2017) *PR5* is induced by cell wounding in *Arabidopsis* shoot tips under the control of the transcription factor *WRKY22*. In preparation.

Abstracts

Bajerski F. & Overmann J. (2015). "Kryostress – Anpassung der Zelle an Tiefsttemperaturen". Jahrestagung des Deutscher Kälte- und Klimatechnischer Verein e.V. (DKV) 2015, Dresden, Deutschland. Vol 1:131, ISBN: 978-1-5108-1998-6.

Bajerski F., Senula A., Keller, Overmann J. (2015). Novel insights into cellular processes affecting the cryopreservation of bacterial and eukaryotic cells. *Cryobiology*. 2015 Dec; 71(3): 549.

Darienko T., Siegesmund M., Lorenz M., Friedl T. (2015). Effects of cryopreservation on selected green microalgae using AFLP fingerprinting for genomic and epigenomic stability assessment. ECCO XXXIV, European Culture Collections as tools in research and biotechnology. P. 51.

Darienko T., Siegesmund M., Lorenz M., Rybalka N., Friedl T. (2015). Effects of cryopreservation on selected green microalgae using AFLP fingerprinting for genomic and epigenomic stability assessment. *E. J. Phycology*, 50: sup1, 204-205. DOI:10.1080/09670262.2015.1069493

Darienko T., Lorenz M., Friedl T. (2015). Effects of cryopreservation on microalgae recovered using AFLP fingerprinting. *Cryobiology*, 71 p. 537.

Darienko T., Lorenz M., Bajerski F., Friedl T. (2017). MS-AFLP and ATP analysis reveal cryopreservation-induced stress on green microalgae. *Phycologia*, 56, 4: suppl. P.38.

Eberth S. (2014). Kryostress – Anpassungsmechanismen der Zelle an Tiefsttemperaturen. Jahrestagung des Deutscher Kälte- und Klimatechnischer Verein e.V. (DKV) 2014. Vol 1:89, ISBN: 978-1-5108-0001-4.

Hanf B., Krüger T., Mattern D., Kniemeyer O., Brakhage A. A. (2015). Adaption of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* to low temperature stress. *Cryobiology*, 71 p. 537.

Naujox L., MacLeod R., Kaufmann M., Drexler H., Eberth S. (2015). Does cryopreservation with Me2SO alter the epigenome and transcriptome of cryosensitive cancer cell lines? *Cryobiology* 2015. Vol 71,3 561-562.

Konferenzbeiträge

Wann	Was	Wo
2013-10	Vortrag (Lorenz M)	Annual Scientific Meeting of the Society of Low Temperature Biology, Hannover
2014-10	Vortrag (Bajerski F)	Annual Scientific Meeting of the Society of Low Temperature Biology, London, England
2014-10	Poster (Stock J)	Annual Scientific Meeting of the Society of Low Temperature Biology, London, England
2014-11	Eingeladener Vortrag (Eberth S)	Jahrestagung des Deutscher Kälte- und Klimatechnischer Verein e.V. (DKV), Düsseldorf
2015-03	Vortrag (Hanf B)	VAAM Jahrestagung, Marburg
2015-03	Poster (Hanf B)	Proteomic Forum, Berlin
2015-04	Vortrag (Hanf B)	MiCom 2017 (5th International Student Conference on Microbial Communication), Jena
2015-05	Poster (Darienko T)	ECCO XXXIV, European Culture Collections

		as tools in research and biotechnology, Institute Pasteur Paris
2015-07	KAIT Session: Vorträge (Hanf B, Johanna Stock, Tatyana Darienko), Eingeladener Vortrag (Bajerski F), Poster (Lisa Naujox)	CRYO2015, Meeting of the Society for Cryobiology, Ostrava, Czech
2015-08	Poster (Darienko T)	Sixth European Phycological Congress, London
2015-09	Poster (Hanf B)	DECHEMA -2nd European Conference on Natural Products, Frankfurt
2015-10	Vortrag (Stock J)	Annual Scientific Meeting of the Society of Low Temperature Biology, London
2015-11	Eingeladener Vortrag (Bajerski F)	Jahrestagung der Gesellschaft Deutsche Kryobanken, Gatersleben, Deutschland
2015-11	Eingeladener Vortrag (Bajerski F)	Jahrestagung des Deutscher Kälte- und Klimatechnischer Verein e.V. (DKV), Dresden, Deutschland
2016-02	Poster (Stock J)	29. Conference Molecular Biology of Plants, Dabringhausen
2016-07	Vortrag (Stock J)	CRYO2016 The 53rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ottawa, Kanada
2016-08	Eingeladener Vortrag (Lorenz M)	Workshop on Cryopreservation for Microorganisms and Plants at 2nd Global Genome Biodiversity Network Conference, Berlin
2016-09	Poster (Bajerski F)	Annual Scientific Meeting of the Society of Low Temperature Biology, Dresden
2017-02	Poster (Stock J)	30. Conference Molecular Biology of Plants, Dabringhausen
2017-03	Poster (Hanf B)	MiCom 2017 (6th International Student Conference on Microbial Communication), Jena
2017-04	Vortrag (Hanf B)	Proteomic Forum, Berlin
2017-08	Poster (Darienko T)	11th International Phycological Congress, Szczecin, Poland
2017-08	Vortrag, Poster (Hanf B)	International Fungal Biology Conference, Songdo, South Korea
2017-09	Vortrag (Stock J)	Botanikertagung, Kiel

Qualifikation von Forschern

Im Rahmen des Projektes wurden zwei Doktorarbeiten durchgeführt, die beide kurz vor der Fertigstellung stehen. Die Doktorandenstelle der EPSAG in Göttingen konnte nicht besetzt werden und wurde von einem Postdoc (vom 01.09.13 - 31.10.2014 Dr. Maria Siegesmund, vom 1.11.2014 bis 15.05. 2016 Dr. Tatyana Darienko) zu 50% bearbeitet.

Promotionen (kurz vor Fertigstellung)

- Johanna Stock (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, IPK)
- Benjamin Hanf (Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut, Jena)

Abschlussarbeiten

In Rahmen des Projektes wurde an der EPSAG Uni Göttingen eine Bachelor Arbeit durchgeführt: Bastian Montag: Kryostress und phylogenetische Differenzierung bei *Acutodesmus obliquus*: AFLP fingerprints und ITS rDNA.

Stellungnahmen

Kommerzielle Nutzung

Zu diesem Zeitpunkt sind keine kommerziellen Anwendungen geplant.

Kooperationen

Die Projektpartner des KAIT-Projektes profitieren auch in Zukunft von dem, im Rahmen des Projektes etablierten, Netzwerk. Neben den Projektpartnern gab es keine weiteren Kooperationspartner im In- und Ausland.

Sicherung und Verfügbarmachung der Forschungsdaten

Ein Teil der gewonnenen Daten wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht und auf nationalen und internationalen Konferenzen vorgestellt. Weitere Manuskripte befinden sich in Vorbereitung und sollen ebenso zeitnah veröffentlicht werden.

Zitierte Literatur

Gross, B.L., Henk, A.D., Bonnart, R., and Volk, G.M. (2016). Changes in transcript expression patterns as a result of cryoprotectant treatment and liquid nitrogen exposure in *Arabidopsis* shoot tips. *Plant Cell Reports* 36, 459-470

Müller et al. (2007) Assessing genetic stability of a range of terrestrial microalgae after cryopreservation using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Am. J. Bot.* 94 (5): 799-808.

Wanner, G., et al. (2008). "Ultrastructural Characterization of the Prokaryotic Symbiosis in "Chlorochromatium aggregatum"." *Journal of Bacteriology* **190**(10): 3721-3730.

Smyth, D.A., and Black, C.C. (1984). Measurement of the Pyrophosphate Content of Plant Tissues. *Plant Physiology* 75, 862-864.

Sock, J., Senula, A., Manuela, N., Hans-Peter, M., and E.R. Joachim, K. (2017). A simple method for cryopreservation of shoot tips of *Arabidopsis* genotypes. *Cryo Letters* 38.