

**Grenzen des Überlebens:
Flechten als Modellsystem für das Potential von
Adaptationsmechanismen eines Symbioseorganismus
unter Extrembedingungen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jean-Pierre Paul de Vera
aus Ratingen

Düsseldorf
August 2005

Aus dem Institut für Botanik
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. S. Ott
1.Koreferent: Prof. Dr. Schurr
2.Koreferent: Prof. Dr. Grube

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2005

Es gibt unzählige Sonnen und unzählige Erden, die um ihre Sonnen kreisen ... diese Welten sind von Lebewesen bewohnt.

Giordano Bruno (1548-1600)

***Weite Welt und breites Leben,
Langer Jahre redlich Streben,
Stets geforscht und stets gegründet,
Nie geschlossen, oft geründet,
Ältestes bewahrt mit Treue,
Freundlich aufgefaßtes Neue,
Heitern Sinn und reine Zwecke:
Nun! man kommt wohl eine Strecke.***

>>Zur Naturwissenschaft überhaupt<<
Heft I, 1887
Johann Wolfgang Goethe

***Ein Mensch, der an die wesentliche Güte der Geschöpfe glaubt, ist imstande, alle Geheimnisse der Schöpfung zu entdecken, um ohne Unterlass das ihm von Gott anvertraute Werk zu vervollkommen. [...]
Es ist viel mehr eine große Herausforderung, die Schöpfung - sich selbst und die Welt - zu vervollkommen.***

Johannes Paul II., 1994

I. Einleitung.....	11
I.1. Zusammenfassung der Arbeitsziele.....	16
II. Material und Methoden.....	19
2. Material.....	19
2.1. <i>Fulgensia bracteata</i> aus der bunten Erdflechtengesellschaft auf Gotland.....	19
2.2. <i>Xanthoria elegans</i> aus Habitaten des Hochgebirges (Alpen).....	19
2.3. <i>Xanthoria parietina</i>	20
2.4. Materialgewinnung für die Analyse des 3-Komponenten-Systems.....	21
2.4.1. Ascosporen von <i>F. bracteata</i> , <i>X. elegans</i> und <i>X. parietina</i>	21
2.4.2. Mycelien der Mycobionten von <i>F. bracteata</i> und <i>X. elegans</i>	22
2.4.3. Kulturen der Photobionten von <i>F. bracteata</i> und <i>X. elegans</i>	22
3. Methoden.....	24
3.1. Hardware / Technik.....	24
3.1.1. Bestrahlungsversuche an den Space-Facilities im DLR.....	24
3.1.2. Vakuum- bzw. Niederdruck und die Koppelung mit den UV-Versuchen.....	26
3.1.3. Asteroiden-Impact-Versuche am Ernst Mach Institut (EMI / Fraunhofer Gesellschaft).....	27
3.1.4. Verwendete Parameter.....	29
3.1.4.1. UV-Dosimetrie.....	29
3.1.4.2. Simuliertes Weltraumvakuum (Niederdruck des Erdnahen Orbits/Marsdruck).....	32
3.1.4.3. Erwartete und tatsächliche Werte der Asteroiden-Einschlags- Simulations-Parameter.....	32
3.1.5. Präparation der Proben.....	34
3.1.5.1. Anfertigung der Schnitte.....	35
3.1.5.2. Präparation der Photobionten.....	35
3.1.5.3. Präparation der Mycobionten.....	35
3.1.5.4. Präparation der Ascosporen durch Sporulationsversuche.....	36
3.2. Kulturversuche.....	37
3.2.1. Lichtmakro- und mikroskopische Untersuchungen.....	37
3.2.2. Nährmedien.....	37

3.2.3. Wachstumsbedingungen (Temperatur, Licht).....	39
3.3. Confokale Laser-Mikroskopie (CLSM).....	40
3.3.1. Das Confocale Lasermikroskop	40
3.3.2. Bildgebende Verfahren und Bildanalyse.....	42
3.3.2.1. Channel-Imaging (Kanalbildanalyse).....	43
3.3.2.2. Overlay-Imaging (Simultanbildanalyse).....	44
3.3.2.3. Reflexionsbildanalyse (Topografische Bildanalyse).....	44
3.3.2.4. Kopplung von Reflexionsbildern und Fluoreszenzbildern.....	45
3.3.2.5. Bildsequenzanalyse.....	45
3.3.2.6. Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten / Korrelation zur Vitalität.....	46
3.3.2.7. Aufsummierung der Fluoreszenzintensitäten in Contour-Images.....	50
3.3.3. Ausgewählte Fluoreszenzfarbstoffe.....	51
3.3.3.1. FUN I.....	51
3.3.3.2. SYTOX-green.....	51
3.3.4. Vitalitätstests.....	52
3.4. Verwendung von Image-Tool als Zählprogramm und zur statistischen Auswertung...	53
3.5. UV-Schäden an der DNA der Flechte <i>X. elegans</i> und ihrer Bionten über die Detektion von Photoprodukten mit Hilfe der HPLC (am C.E.N.G in Grenoble).....	53
3.5.1. DNA-Extraktion.....	54
3.5.2. DNA-Hydrolyse.....	55
3.5.3. HPLC-MS/MS-Analyse.....	56
3.6. Molekularbiologische Analyse der Photobionten.....	59
3.6.1. DNA-Sequenzierung und Auswertung.....	60
3.7. Präparation der Gabbroplättchen für Impactversuche.....	60
III. Ergebnisse.....	62
4.1. Vitalität von Flechtenthalli untersucht mit SYTOX-green und FUN I am CLSM.....	62
4.1.1. Vitalität der Flechtenthalli nach UV-Strahlung definierter Wellenlänge.....	62
4.1.2. Vitalität der Flechtenthalli nach UV-Strahlung im gesamten UV- Spektralbereich (A, B, C) unter Vakuum.....	63

4.1.3. Ergebnisse eines zweiwöchigen Langzeitversuchs unter UV- und Vakuumeinfluss.....	64
4.1.3.1. Vitalität der Flechtenthalli nach Vakuumeinfluss.....	65
4.1.3.2. Vitalität der Flechtenthalli nach UV-Strahlung und Vakuumeinfluss.....	66
4.2. Vitalität des Mycobionten von <i>Fulgensia bracteata</i> und <i>Xanthoria elegans</i> mit Hilfe von SYTOX-green und FUN I.....	67
4.2.1. Vitalität des Mycels nach UV-Strahlung definierter Wellenlänge.....	67
4.2.2. Vitalität des Mycels nach Exposition zu polychromatischer UV-Strahlung (UV A, B, C).....	68
4.2.3. Vitalität des Mycels nach Vakuumeinfluss.....	69
4.2.4. Vitalität des Mycels nach Exposition zu polychromatischer UV-Strahlung (UV A, B, C) unter Vakuumeinfluss.....	71
4.3. Vitalität des Photobionten von <i>Fulgensia bracteata</i> und <i>Xanthoria elegans</i> mit den Live/Dead-Fluoreszenzfarbstoffen SYTOX-green und FUN I.....	72
4.3.1. Vitalität des Photobionten nach UV-Strahlung definierter Wellenlänge.....	72
4.3.2. Vitalität des Photobionten nach polychromatischer UV-Einstrahlung (UV A, B, C; $200\text{nm} \leq \lambda \leq 400\text{ nm}$).....	74
4.3.3. Vitalität der Photobionten nach Vakuumeinfluss.....	75
4.3.4. Vitalität der Photobionten nach Exposition zu polychromatischer UV-Strahlung und Vakuumeinfluss.....	76
4.4. Vitalität der Ascosporen	78
4.4.1. Vitalität der im Apothecium geschützten Ascosporen von <i>F. bracteata</i> und <i>X. elegans</i> nach Simulation der Weltraumparameter.....	79
4.4.2. Vitalität der isolierten Ascosporen von <i>F. bracteata</i> und <i>X. elegans</i>	80
5. Keimungsfähigkeit der Ascosporen nach UV- und Vakuum-Exposition	82
5.1. Keimungsfähigkeit der durch den Fruchtkörper geschützten Ascosporen von <i>F. bracteata</i> und <i>X. elegans</i>	82
5.2. Keimungsfähigkeit der isolierten, ungeschützten Ascosporen von <i>F. bracteata</i> und <i>X. elegans</i>	84
6. Keimungsfähigkeit der Ascosporen von <i>F. bracteata</i> und <i>X. elegans</i> oder ersatzweise <i>X. parietina</i> nach Weltraumsimulation und Einsatz verschiedener Medien.....	84
6.1. Keimungsfähigkeit der Ascosporen von <i>F. bracteata</i> und <i>X. parietina</i> auf verschiedenen Nährmedien nach monochromatischer UV-Bestrahlung ($\lambda = 254\text{ nm}$)...	85

6.2. Keimungsfähigkeit der Ascosporen von <i>F. bracteata</i> und <i>X. elegans</i> auf JSC-Marsanalogon-Medium nach Weltraumsimulation (UV und Vakuum).....	88
7. Wachstum der Mycelien des Mycobionten von <i>F. bracteata</i> und <i>X. elegans</i>	88
7.1. Wachstum der Mycelien nach monochromatischer UV-C Exposition ($\lambda = 254$ nm).....	89
7.2. Wachstum der Mycelien nach polychromatischer UV (A, B, C) Exposition ($\lambda \geq 200$ nm).....	91
7.3. Wachstum der Mycelien nach Niedrigdruck-Exposition (Vakuum).....	92
7.4. Wachstum der Mycelien nach Einsatz der Weltraumsimulation (UV und Vakuum).....	93
8. Wachstum der Photobionten von <i>F. bracteata</i> und <i>X. elegans</i>	96
8.1. Wachstum der Photobionten nach monochromatischer UV-C Strahlung.....	96
8.2. Wachstum der Photobionten nach polychromatischer UV-Strahlung (A, B, C).....	98
8.3. Wachstum der Photobionten nach Vakuumexposition.....	100
8.4. Wachstum der Photobionten nach Einsatz der Weltraumsimulation (UV und Vakuum).....	102
8.5. Molekulare Analyse zur Artbestimmung der Photobionten von <i>X. elegans</i>	104
9. Ergebnisse der simulierten Asteroiden-Impakt-Versuche (10 GPa bis 50 GPa).....	105
9.1. Ergebnisse der Strukturanalyse des gesamten Flechtengewebes.....	105
9.2. Vitalitätstests mit Live/Dead-Kit Fun I.....	107
9.2.1. Prozentualer Anteil des vitalen Flechtengewebes.....	109
9.2.2. Prozentualer Anteil der vitalen Myco- und Photobionten.....	111
10. DNA-Photoprodukte nach Bestrahlung der Flechte <i>X. elegans</i> und ihrer isolierten Bionten...	112
11. Zusatzergebnisse	116
11.1 Ergänzende Ergebnisse aus der Bildanalyse.....	116
11.2. UV-Absorption durch Parietin und Rinde.....	118
11.3. Höhere Resistenz der Photobionten durch Clusterbildung.....	120
11.4. Höhere Resistenz der Mycobionten von Struktur und Gallerte unabhängig.....	120
11.5. Unterschiede der Kristallabscheidungen auf den Apothecien zwischen beiden untersuchten Flechtenarten.....	122
11.6. Die Bedeutung des Ascus als Schutz gegen extreme Umweltbedingungen.....	123
IV. Diskussion.....	124
12. Vitalität und Resistenzmechanismen.....	124
12.1. Resistenzmechanismen.....	125

12.1.1. Bedeutung der Thallusmorphologie und -anatomie für die UV- und Vakuumresistenz.....	126
12.1.1.1. Schutzfunktion des Cortex in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand.....	127
12.1.1.2. Schutzfunktion des Cortex von verschiedenen Flechtenarten.....	127
12.1.2. UV- und Vakuumschutz durch Clusterbildung.....	128
12.1.3. Bedeutung der Gallerte für die Bionten sowie für die Flechtensymbiose....	129
12.1.4. Strahlungsschutz durch Parietin und Chitin.....	130
12.1.5. Resistenz hyaliner Ascosporen	132
12.2. Funktion latenten Lebens	133
13. Wachstumsverhalten des Mycobionten	134
13.1. Wachstum nach UV-Strahleneinfluss.....	134
13.2. Wachstum nach Vakuumexposition.....	135
13.3. Der unterschiedliche Anpassungsgrad des Mycobionten und des Flechtenthallus.....	135
13.4. Wachstum auf unterschiedlichen Substraten.....	136
14. Wachstumsverhalten des Photobionten nach simulierter Weltraumexposition	137
15. Schlussfolgerungen aus der Photoproduktanalyse des 3-Komponenten-Systems von <i>X. elegans</i>	138
16. Resistenzmodell gegenüber den Weltraumparametern in Abhängigkeit von Art und Symbiosegrad.....	140
17. Erörterung: Interplanetarer Austausch von Leben am Beispiel von <i>X. elegans</i>	141
17.1. Interpretationen für die Hochdruckresistenz von <i>X. elegans</i>	142
17.2. Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Panspermie der Flechte <i>X. elegans</i>	143
17.3. Hypothetische Überlegungen über den Transfer von Leben zwischen Mars und Erde...	143
17.4. Welche Bedingungen könnten einen erfolgreichen interplanetaren Transfer von Leben ermöglichen?.....	144
V. Zusammenfassung.....	147
VI. Literaturverzeichnis.....	149
Anhang.....	161
Ergebnisse in Tabellen und ergänzende Bilder der vorliegenden Arbeit.....	161

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Publikationen:

- de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., S. Ott, 2003. The potential of lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space. – I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *International Journal of Astrobiology* 1 (4), 285-293, Cambridge University Press.
- de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2004. The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space. II: Germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. *Advances in Space Research* 33, 1236-1243, Elsevier/science@direct
- de Vera, J.-P., Horneck, Rettberg, P., Ott, S., 2004. In the Context of Panspermia: May lichens serve as shuttles for their bionts in Space? *Proc. of the III European Workshop on Exo-Astrobiology. Mars: The search for Life, Madrid, Spain, 18-20 November 2003 (ESA SP-545, March 2004)*, 197-198.
- de Vera, J.-P., Rettberg, P., Ott, S., 2005. Life at the limits: peculiar features of lichen symbiosis related to extreme environmental factors. *Advances in Space Research*, contributed paper at proof stage.
- Horneck, G., Stöffler, D., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C.S., Möller, Meyer, C., de Vera, J.P., R., Fritz, J., Natalia A. Artemieva 2005. Microbial Rock Inhabitants Survive Impact Ejection: A Feasible Route to Panspermia. *Nature* (in prep.)

Vorträge:

- de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2003. The symbiotic state of lichens as an advantage to cope with simulated extreme conditions. ISS, Halifax 2003.
- de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2004. Life at the limits: peculiar features of lichen symbiosis related to extreme environmental factors. 35th COSPAR, Paris 2004.
- de Vera, J.-P., Horneck, G., Stöffler, D., Ott, S., 2004. The lichen *Xanthoria elegans* as a model system for survival of eukaryotic symbiotic associations after simulated Meteorite-/Asteroid Impacts. EANA 2004. „Life in Extreme Environments“, Open University, Milton Keynes.
- de Vera, J.-P., Horneck, G., Stöffler, D., Ott, S., 2004. Shockwave experiments and results on the epilithic lichen *Xanthoria elegans*. Impact-Meeting at the Naturkundemuseum Berlin (Humboldt-University) 2004.
- de Vera, J.-P., 2005. Mikroorganismen, Boten des Lebens im All? –Wahrscheinlichkeit und Konsequenzen. Einladung zum Vortrag im Naturkundemuseum Berlin (Humboldt-Universität, Freie Universität Berlin).

Posterpräsentationen:

de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2002. Lichens as a model-system for symbiotic organisms under extreme conditions. Water in the upper Martian surface. Workshop, AWI Potsdam.

de Vera, J.-P., Ott, S., 2002. Lichens as a model-system for symbiotic organisms under extreme conditions. International Mycological Congress Oslo.

de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2002. Lichens as a model-system for symbiotic organisms under simulated extreme space conditions. World Space Congress/COSPAR 2002 Houston.

de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2003. In the context of Panspermia: May lichens serve as shuttles for their bionts in space? III European Workshop on Exo-Astrobiology, Mars: The search for Life, Madrid 2003.

de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2004. Life at the limits: peculiar features of lichen symbiosis related to extreme environmental factors. 35th COSPAR, Paris 2004.

Durch diese Arbeit entstandene Kooperationen und Forschungsarbeitsgruppen:

1. Abteilung für Strahlenbiologie des Instituts für Luft- und Raumfahrtmedizin am Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) in Köln, Porz/Wahn (Dr. G. Horneck, Dr. P. Rettberg, Dr. G. Reitz)
2. British Antarctic Survey, Open University of Milton Keynes (Prof. Dr. C. Cockell)
3. Naturkundemuseum Berlin, Humboldt-Universität (Prof. Dr. Stöffler)
4. DLR Berlin (Prof. Dr. Möhlmann)
5. Ernst-Mach-Institut der Fraunhofer Gesellschaft in Efringenkirchen (Dr. U. Hornemann)
6. INTA Madrid, Spanien (Dr. R. de la Torre)
7. C.E.N.G. in Grenoble, Frankreich (Dr. T. Douki)
8. Università della Tuscia in Viterbo, Italien (Prof. Dr. S. Onofri)

Abkürzungen

CLSM	Confocale Laser Scanning Mikroskopie
DLR	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
DNA	Desoxyribunucleinsäure
EMI	Ernst Mach Institut
ESA	European Space Agency
GPa	Giga Pascal
K	Kelvin
kJ	Kilo Joule
Mars-JSC-1 Analogon	Mars-Johnson-Space-Center-1-Substrat
mm	Millimeter
μm	Mikrometer
MY	Malz-Hefe-Extrakt
NASA	National Aeronautics and Space Administration
p	Druck
Pa	Pascal
REM	Rasterelektronenmikroskop
t_e	Expositionszeit
t_i	Inkubationszeit, Kultivierungszeit
TOM	Trebouxia-Organic-Medium
UV	Ultraviolette Strahlung

I. Einleitung

Das Leben begann auf unserem Planeten vor mindestens 3.5 Milliarden Jahren. Diese Datierung wird aufgrund von Fossilfunden belegt, in denen man eindeutige Indizien für die Bildung von Stromatolithen zu diesem frühen erdgeschichtlichen Zeitpunkt gefunden haben will, die nur durch bakterielle Aktivität entstanden sein konnten (Campbell et al. 2003). In einigen Publikationen wird sogar auf zugrunde liegende Kohlenstoffisotop-Analysen der Beginn des Lebens in Form kleinster Mikroorganismen, die zudem mit der Fähigkeit der biologischen CO₂-Fixierung ausgestattet gewesen sein sollen, auf 3.8 Milliarden Jahren wenn nicht sogar auf 4 Milliarden Jahren zurückdatiert (Schidlowski 2001). Während die Welt der Mikroorganismen, nämlich der Prokaryota und Archaea in dieser frühen praekambrischen Biosphäre vorherrschte, so lässt die molekulare Uhr (Wang et al. 1999) vermuten, dass das Divergieren der Lebensformen in Pflanzen, Tieren und Pilzen vor annähernd 1.5 Milliarden Jahren seinen Anfang nahm, was somit auch den Beginn der Entwicklung der Flechtensymbiose bedeuten könnte und den bisherigen molekulargenetisch angenommenen Fossil-Rekord nach Taylor et al. (1995) vordatieren müsste (Lutzoni 2001). Taylor et al. (1995) datierte beispielsweise das erste Auftreten flechtenartiger Symbiosen anhand von Fossilien auf das untere Devon-Zeitalter (0.4 Milliarden Jahre). Neuere, erst kürzlich entdeckte Fossilfunde in China gehen sogar von 0.6 Milliarden Jahre für den Beginn erster Vorläufer der Lichinisierungsprozesse und somit dem ersten Kontakt zwischen einem Pilz und einer Alge aus (Yuan et al. 2005). Die Frage besteht, welche Besonderheit bei Flechten existiert, dass sie sich so lange in der Evolution erfolgreich behaupten konnten und welche Rolle man der Symbiose in diesem Kontext, aber auch für die zukünftige Evolution, zuerkennen mag.

Der Fortschritt der biologischen Evolution ist bekanntlich in hohem Maße beeinflusst und abhängig von den vorherrschenden Umweltbedingungen, die zu Mutationen führen können und durch Selektion unter den gegebenen Bedingungen die stärksten Lebensformen überleben lassen (Darwin 1859). Der größte Erfolg in der biologischen Evolution und somit der Weiterentwicklung aller Arten basiert jedoch auf der Fähigkeit der Organismen, Adaptationsmechanismen, wie die Ausbildung von Resistenzmechanismen gegen extreme Umweltfaktoren auszubilden. Dies war auch insofern notwendig, als über den genannten Zeitraum der Milliarden Jahre andauernden Evolution die Umwelt auf dem Planeten Erde nicht zuletzt durch die Kontinentaldrift und Polwanderung sich stets wandelte und neue Anpassungsstrategien der Lebensformen erforderte. Die Symbiose ist in diesem Kontext eine

I. Einleitung

der erfolgreichsten Strategien für Resistenz und Adaptation (Margulis 1993). Die Fähigkeit in symbiotische Assoziation zu treten und dabei bis zur Endosymbiose zu gelangen, wäre einer der erfolgreichsten Schritte auf dem Weg zu optimaler Resistenz (Margulis 1993). Man könnte sogar so weit gehen und im Fall der Endosymbiose von einer hervorzuhebenden, kraftvollen, dynamischen Maschinerie der Evolution sprechen, da erst durch die Endosymbiose die Entwicklung zu höheren Organisationsformen wie Pflanzen und Tieren möglich war. Man nimmt an, dass Eukaryoten durch Endosymbiose eines autotrophen Archaeobakteriums als Wirt und einem Eubakterium als Symbiont entstanden sind (Martin & Russell 2003). Dieser Vorgang war in der Evolutionsgeschichte aber keineswegs ein einmaliger Vorgang, da sowohl Plastiden wie die Chloroplasten oder die Zellorganellen wie die Mitochondrien durch Endosymbiose entstanden sind (Race et al. 1999, Martin et al. 1998, Melkonian 2001). Aber nicht nur die Endosymbiose scheint eine der erfolgreichsten Adaptationsmechanismen zu sein. So gibt es eine Vielzahl anderer symbiotischer Vergesellschaftungen von Arten, die man als Exosymbiose bezeichnen könnte. Dabei reicht das Spektrum von lockeren Beziehungen innerhalb eines Ökosystems bis zu verschiedensten, symbiotischen Gemeinschaften mit unterschiedlichstem Abhängigkeitsverhältnis (Zook 1999). In diesem Kontext wären beispielsweise die Assoziation von zwei oder mehr eukaryotischen Arten welche auch gemischt mit prokaryotischen Lebensformen in Biofilmen vergesellschaftet sein können (Belnap et al. 2001, Flemming & Wingender 2001) oder assoziiert in der Flechtensymbiose vorkommen (Poelt 1977, Lawrey 1991) zu nennen. Diese zu letzt genannte besondere Form der Exosymbiose, nämlich die Flechtensymbiose, findet man praktisch in allen Biomen der Erde und dominiert insbesondere in so genannten extremen Nischen mit heißen oder sehr kalten und harschen Umweltbedingungen, wie sie in vulkanischen Gebieten und Wüsten (Büdel & Wessels 1986; Fahselt 1995), polaren Standorten oder Hochgebirgsregionen (Brodo et al. 2001, Poelt 1969), vorherrschen. Die Dominanz der Flechten gerade in diesen extremen Gebieten zeigt die Fähigkeit dieser symbiotischen, poikilohydrischen Organisationsform, extreme, exogene Umwelteinflüsse wie Kälte - nahe dem Gefrierpunkt -, Austrocknung, Hitze, hohe UV- und harte Sonneneinstrahlung standhalten zu können und spiegelt den hohen Grad an Flexibilität und Plastizität der Flechtensymbiose wider (Ott & Jahns, unpubl). Dieser hohe Grad der Plastizität und Flexibilität wird nicht zuletzt durch die symbiotische Assoziation der Bionten erreicht. Die symbiotische Assoziation und damit Einbettung der Bionten in eine Gallertmatrix schafft einen erweiterten Genpool auf engstem Raum mit einer Mannigfaltigkeit an Synthesewegen, die zur Produktion einer ganzen Reihe von sekundären Flechteninhaltsstoffen führen, welche

der Flechtensymbiose die Möglichkeit geben, mit extremen Umweltbedingungen klar zu kommen (de Vera et al. 2004). Abgesehen von den in dieser Arbeit untersuchten Flechtenarten darf in diesem Kontext auch nicht unerwähnt bleiben, dass die Flechtensymbiose - allgemein betrachtet - auch durch ein breites Spektrum an Reproduktionsstrukturen gekennzeichnet ist. Der Pilz kann sich sexuell durch die Bildung von Ascosporen und asexuell durch die Ausbreitung von Thalloconidien vermehren. Die Alge kann sich jedoch selber nur durch die asexuelle Produktion von Autosporen vermehren. Die Gesamtheit eines Flechtenthallus kann aber auch noch je nach Artzugehörigkeit eine Vielzahl an weiteren asexuellen Reproduktionseinheiten, die so genannten Diasporen ausbilden. So wären hier diesbezüglich die meist in Morphologie und Anatomie sowie dem Ort der Ausbildung sich unterscheidenden Propageln zu nennen, die aufgrund ihrer Vielfalt der morphologischen Struktur begrifflich in Isidien, Soredien, Phyllidien und Schizidien unterteilt werden, wobei die Ausbreitung durch Fragmentation der Thalli nicht außer acht gelassen werden sollte (Henssen and Jahns 1974; Hestmark 1991; Honegger 1993; Ott 1987b, Ott et al. 1993, Jahns & Ott 1997). Aus diesem Grund kann man schlussfolgern, dass Flechten ein Modellsystem der Symbiose sind (Hawksworth 1988, Honegger 1998), welche als Ergebnis eines langen co-evolutionären Prozesses von Pilzen (meist Ascomyceten) und Grünalgen bzw. Cyanobakterien (früher Blaualgen) gelten können. Der Pilz in der Flechtensymbiose wird in den Termini der Lichenologie und Mycologie allgemein als Mycobiont bezeichnet und die photosynthetisch aktiven Grünalgen und/oder Cyanobakterien (Blaualgen) werden folglich als Photobionten benannt. Diese in der Flechtensymbiose assoziierten Bionten lassen aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu einer Vielzahl taxonomischer Gruppen einen polyphyletischen Ursprung vermuten (de Priest 2004, Hawksworth 1988; Henssen & Jahns 1973; James & Henssen 1976, Lutzoni et al. 2001; Santesson 1967; Smith 1975, Soili & de Priest 1998). Aber sie überleben meist außerhalb der Symbiose unter denselben extremen Bedingungen nur eingeschränkt und können ebenfalls dadurch die so charakterisierten extremen Standorte auf Dauer nicht besiedeln. Das bedeutet, dass um unter Extrembedingungen existieren zu können, die Bionten erst in Interaktionen mit anderen Bionten der Flechtensymbiose spezielle Leistungen erbringen können und müssen (Lange 1954, 1969; Lange et al. 1986, 1996; Kappen 1988, 2000; Kappen et al. 1987, 1991; Schroeter et al. 1994; Sojo et al. 1996; Schaper 2003b). Die Leistungen der Bionten im Vergleich zu der Gesamtflechte, die notwendig sind, um die Vitalität unter extremen Bedingungen aufrecht zu erhalten, sollen in dieser Arbeit geprüft werden und in einem Kontext zur Symbiose und den sich daraus resultierenden Resistenzmechanismen gebracht

I. Einleitung

werden sowie mit den Resistenzmechanismen anderer Organismen, die sich außerhalb symbiotischer Assoziationsformen befinden, in Beziehung gebracht werden. So ist beispielsweise bekannt, dass Endosporenbildung und Pigmentierung bei Prokaryoten, wie *Bacillus subtilis* und weitere *Bacillus*-Arten eine wichtige Rolle für die Strahlenresistenz bedeuten (Feofilova 2003, Moeller et al. 2005, 2003; Nicholson et al. 2000). Zusätzliche Resistenzmechanismen kann man auf molekularer Ebene feststellen, wo effektive DNA-Reparaturmechanismen Strahlungsschäden oder Schäden durch extreme Trockenheit (Vakuum) rückgängig gemacht werden können. Ein sehr ausführlich studiertes Objekt, welches aufgrund molekularer, enzymatischer Reparaturmechanismen die Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung oder UV-Strahlung sowie Vakuum erreicht, ist *Deinococcus radiodurans* (Caimi & Eisenstark 1986; Rettberg et al. 2003; Mattimore & Battista 1996; Moseley 1983; Setlow & Bowling 1965). Dieser Mikroorganismus wird meist auch als der Spitzenreiter unter den resistierenden Prokaryoten bezeichnet und ihm wird sogar die Fähigkeit zugebilligt, unter Marsbedingungen überleben zu können.

Durch die vorliegende Arbeit soll in diesem Zusammenhang ergänzend versucht werden, die Frage des Überlebens der Flechtensymbiose und ihrer Bionten unter extraterrestrischen bzw. Marsbedingungen zu beantworten. Dabei kann durch die hier eingesetzten Experimente nur eine Tendenz aufgezeigt werden, da aufgrund der Vielzahl der Strahlungsquellen im Weltraum eine vollständige Simulation aller möglichen für den Testorganismus schädlichen Strahlen, wie ionisierende Strahlung von γ -Strahlung, Elektronenstrahlung und korpuskulare Strahlung, Röntgenstrahlung, Radioaktivität und andere Formen der galaktischen Strahlung (Mc Cormack et al. 1988) nicht möglich war, und nur der Effekt des gesamten UV-Spektrums unter bewusster Ausblendung anderer Strahlungsformen getestet werden konnte. Die Wirkung von Niedrigdrücken auf die Flechtensymbiose und ihre Bionten, wie sie im nahen Erdorbit und nur annähernd auf dem Mars auftreten, wurde ebenfalls getestet. Diese Tests sollen erkennbar darstellen, wie weit ein erstmals derart zu untersuchendes eukaryotisches Symbiosesystem die Vitalität des Systems sowie der einzelnen Bionten nach sehr starker Austrocknung durch Vakuum zu konservieren vermag, und ob Flechten ebenfalls wie *Deinococcus radiodurans* Marsbedingungen überleben und sogar die Bedingungen des freien Weltraums möglicherweise fast schadlos überstehen könnten. Der Hintergrund für die in der vorliegenden Arbeiten erfolgten Experimente basiert ebenfalls auf astrobiologischen Fragestellungen, die sich im Rahmen einer Kooperation mit dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) stellten und denen man bereits mehrere Jahre durch verschiedene Forschungsvorhaben an Prokaryoten bei der ESA (European Space Agency) und NASA

gleichfalls nachgeht. Gemeint ist die Theorie der Panspermie. Hinter dieser Theorie steckt die erstmals 1865 aufgeworfene Idee des Interplanetaren Transportes von mikroskopischen Lebensformen, die wie dort beschrieben, von einem belebten Planeten ausgehend einen anderen inerten Planeten mit Leben befruchten (Richter, 1865) und später präziser von Arrhenius (1903) als Theorie der Panspermie ausformuliert wurde (Horneck, 2001c, Mileikowsky 2000) und letztendlich von Giordano Brunos (1548-1600) Satz: „*Es gibt unzählige Sonnen und unzählige Erden, die um ihre Sonnen kreisen ... diese Welten sind von Lebewesen bewohnt*“ (Gatti 1999) inspiriert zu sein schien. Nicht zu letzt erlangte diese Theorie der Panspermie äußerste Popularität, als im Jahr 1996 die NASA einen wissenschaftlich äußerst kritisch betrachteten und umstrittenen „Fossilfund“ in einem Marsmeteoriten mit der Bezeichnung ALH 84001 publik machte (McCay et al. 1996). Interessanterweise konnte zu den umstrittenen Fossilfunden auch die Besiedlung des betreffenden Meteoriten durch irdisches Leben aufgrund von REM-Aufnahmen anhand von Mycelstrukturen nachgewiesen werden. Damit war erstmals auch der Beweis möglich, dass außerirdisches Material zudem sogar als Grundsubstrat für irdische, sekundär besiedelnde, cryptoendolithische Organismen, eventuell aus der Ordnung der *Actinomyetales* diene (Steele et al. 2000, Toporski et al. 2003).

Zur Verifikation oder Falsifikation der Panspermie-Theorie bedarf es aber einiger aufwendiger Versuche, da bei einem hypothetischen interplanetaren Transfer von Leben angenommen werden muss, dass Lebensformen das Schwerefeld eines Planeten nur durch Herauskatapultieren mit Hilfe großer Asteroiden- bzw. Meteoriteneinschläge verlassen können. Deshalb gibt es auf diesem Forschungsgebiet auch nur wenige Arbeiten, die bisher veröffentlicht wurden. Abermals sind nur Ergebnisse über das Überlebenspotential von zumeist in Monolayern befindlichen Prokaryoten wie *Bacillus subtilis* und *Rhodococcus erythropolis* bekannt (Burchell et al. 2004, Horneck et al. 2001a). Hierbei konnte man sogar Überlebensraten von 10^{-4} bis 10^{-7} Zellen bei simulierten Einschlagsdrücken von bis zu 78 GPa feststellen. Jedoch liegen noch keine Ergebnisse bezüglich der Impakt-Überlebensrate von zumeist mehrlagigen (polylayer) und somit gewebeartig strukturierten Eukaryoten vor. Dies soll nun in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls am Symbioseorganismus Flechte überprüft werden.

Für eine experimentelle Simulation und somit das Nachstellen eines interplanetaren Transfers von Leben bedarf es der Berücksichtigung von 3 Phasen: (i) die Auswurfphase durch einen Asteroiden-/ Meteoriteneinschlag, (ii) die Transferphase bzw. ein Langzeitaufenthalt im Weltall und (iii) die Wiedereintrittsphase bzw. das Auftreffen auf einen anderen Planeten

I. Einleitung

(Horneck 2001c). In der vorliegenden Arbeit wurde das Überleben von Flechten nach Simulation der ersten Phase, nämlich des Asteroideneinschlags getestet, während die zweite Phase durch verschiedene Simulationen am DLR nur unvollständig überprüft werden konnte. Es gibt jedoch ergänzende Arbeiten mit der Flechte *Xanthoria elegans* sowie auch mit anderen Flechten, wie der Krustenflechte *Rhizocarpum geographicum*, die im Zuge der Vorbereitungen für Experimente auf der Weltraumstation ISS im Rahmen eines EXPOSE-Projektes bzw. eines BIOPAN-Experiments ergänzend zu der vorliegenden Arbeit wichtige Aussagen über das Resistenzverhalten der Flechte während eines simulierten Weltraumaufenthalts machen können (de la Torre, R. et al. 2002, de la Torre et al. 2004) und hierbei das hohe Überlebenspotential außer Frage stellen. Weitere Weltraumprojekte für Expositionsexperimente und Wiedereintrittversuch sind als Ergebnis dieser genannten Arbeiten und der hier vorliegenden Dissertation geplant und liegen bei der ESA bereits vor.

I.1. Zusammenfassung der Arbeitsziele

In der vorliegenden Arbeit sollen Flechten von bekannten, extremen Standorten, wie z.B. aus dem Hochgebirge bis polaren Gebieten und aus gemäßigten bis mittleren Breiten (Inseln in der Baltischen See) auf die Fähigkeit getestet werden, wie weit das Überlebenspotential dieser Flechten aus Extremstandorten mit bereits bekannter hoher Sonnen- und UV-Einstrahlung sowie längeren Trockenperioden reicht, und wann die Grenzen für das Überleben erreicht sind. Es werden auch Vergleiche zu Flechten mit extremeren Standorten (*Buelia frigida* - kontinentale Antarktis) sowie von gemäßigten Schattenstandorten (*Peltigera aphthosa*) gezogen und Untersuchungen mit Flechtenproben im humiden Zustand berücksichtigt, die in einer parallel zu meiner Doktorarbeit angelegten Diplomarbeit mit Anwendung der CLSM-Methodik ausgeführt wurden (Wieners 2005). Bei allen Flechten, ob von Extremstandorten oder gemäßigten Standorten, werden bisher bekannte extreme Umweltfaktoren wie Strahlung und Austrocknung artifiziell um ein Vielfaches erweitert. Dies wird durch Simulation der Weltraumparameter im Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) in Köln erreicht. Es soll unter anderem auch die Frage geklärt werden, ob das Lebens- und Überlebenspotential in einer Symbiose sogar auf extraterrestrische Bedingungen erweiterbar ist. Welche Bedeutung hätte die Symbiose, welchen Rang würde sie im Rahmen der Theorie des interplanetaren Austauschs von Leben (Panspermie; Horneck et al. 1999, 2001a, 2001b) einnehmen? Dafür müssen auch Bedingungen simuliert werden, wie sie im Rahmen eines Asteroideneinschlags vorherrschen. Dies erfordert sehr hohe Einschlagsdrücke und

Temperaturen, die durch Sprengungen am Ernst-Mach-Institut der Fraunhofer Gesellschaft in Efringen-Kirchen bei Freiburg mit hilfreicher Unterstützung von Prof. Dr. Hornemann erreicht wurden. Als Quintessenz kann zusammenfassend die Zielsetzung dieser Arbeit auf zwei Punkte fokussiert werden:

1. Die Erforschung der Grenzen des Überlebens unter simulierten Extrembedingungen
2. Das Potential und die Rolle der einzelnen Bionten in der Flechtensymbiose unter extremsten Bedingungen

Dies beinhaltet Fragen wie:

1. Welche Bedeutung hat die Flechtensymbiose für die Bionten unter extremen Bedingungen und wäre dieses symbiotische, eukaryotische System in der Lage, Weltraumbedingungen zu überstehen, so dass Flechten als Kandidaten für eine erfolgreiche Panspermie in Betracht gezogen werden können?
2. Sind in der Symbiose bestehende Resistenzstrategien effizienter als bei den bisher untersuchten Prokaryota?

Die Flechten sind, wie bereits oben erläutert, für die Art von Tests, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt werden, prädestiniert. Eine Fülle von Arbeiten weisen auf die hohe Resistenzfähigkeit aufgrund ihrer Poikilohydrie (Wechselfeuchtigkeit) hin (Lange 1954, 1969) und somit ihrer Fähigkeit in den Zustand latenten Lebens zu treten (Feofilova 2003). Zudem sind viele Flechteninhaltsstoffe bekannt, die ein gewisses Quantum an schädlicher Strahlung des UV-B und UV-C-Spektrums absorbieren (Quilhot et al. 1996, Holder et al. 2000). Bezogen auf die Bionten der Flechtensymbiose könnte man auch aufgrund des Vorhandenseins sekundärer Inhaltsstoffe wie MAAs (mycosporine-like amino acids) in eukaryotischen Algen und Pilzen (Garcia-Pichel & Castenholz 1993, Ishikura et al. 1997) auf die Präsenz ähnlicher intrazellulärer, cytoplasmatischer Sonnenschutz-Pigmente schließen. Es ist ebenfalls erst kürzlich bekannt geworden, dass sogar schädliche Sekundäreffekte, wie die Sauerstoffradikalbildung durch UV-Strahlung von einigen Flechten abgepuffert werden können, sofern die Bionten lichenisiert sind bzw. im Verband der Symbiose verweilen (Kranner et al. 2005). Jedoch sind insgesamt betrachtet die Grenzen des Überlebens (sofern sie überhaupt bestehen) unbekannt. Zudem ist die Resistenzfähigkeit der einzelnen, außerhalb eines schützenden Thallus befindlichen, isolierten Bionten gegenüber einem breiten Spektrum

I. Einleitung

an Strahlung und Austrocknung noch weitestgehend unbekannt. Die Analyse eines 3-Komponenten-Systems (Flechten, Mycobiont und Photobiont) soll dies in der vorliegenden Arbeit ebenfalls klären. Hierzu dienen Vitalitätstests durch Überprüfen der Stoffwechselaktivität oder möglicher Autolyseaktivität unter apoptotischen Bedingungen, die im Zuge von möglichen, schädlichen Umweltfaktoren induziert worden sein können, was mit Hilfe der Confokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Dr. Knust erfolgte. Ein anderer Faktor ist die Überprüfung der Reproduktionsfähigkeit der Flechten nach Exposition zu den extremen Parametern. Hierzu wird das vegetative, asexuelle Wachstum der Mycelien und der Photobionten sowie die Fähigkeit der sexuellen Reproduktion durch Vitalitätstests, Keimungsanalysen und Wachstum der Ascosporen überprüft. Auch die Mutagenität der extremen Umweltparameter wird durch die Analysen an der DNA von den exponierten Flechten und ihren isolierten Bionten mit Hilfe der gekoppelten HPLC-Massenspektroskopie-Analyse über die Detektion der Thymindimerproduktion untersucht, was mit Unterstützung von Herrn Dr. Douki am C.E.N.G. in Grenoble erfolgte. Damit wird ein breites Spektrum der für die Resistenz und somit für das Überleben notwendigen Lebensfunktionen überprüft, und man kann schließlich zu grundlegenden Aussagen kommen, die über die Bedeutung der Flechtensymbiose in der Vergangenheit der Evolution sowie der zukünftigen Evolution unter irdischen sowie möglicherweise außerirdischen Bedingungen Aufschluss geben können. Die vorliegende Arbeit kann somit ein wichtiger Beitrag für die postulierte Plastizität und Flexibilität der Flechtensymbiose (Ott und Jahns, unpubl.) im Hinblick auf die Anpassungsfähigkeit und Resistenz gegenüber extremsten Bedingungen sein und nicht unbedeutende Antworten für das Potential der Symbiose bezüglich einer möglichen Panspermie liefern.

II. Material und Methoden

2. Material

2.1 *Fulgensia bracteata* aus der bunten Erdflechtengesellschaft auf Gotland

Proben der Flechte *Fulgensia bracteata* (Hoffm.) Räs. wurden auf der Karst-Alvar von Grogarn und Ardre sowie auf der Kiesalvar von Farö und Ardre (GPS: N 56°55'50.1'') auf der schwedischen Ostseeinsel Gotland gesammelt. *Fulgensia bracteata* ist ein typischer Vertreter der Bunten Erdflechtengesellschaft und kommt in engen Assoziationen mit anderen Flechten vor, wo sie teils parasitisch teils mutualistisch lebt (Meier 1994, Osenberg 1993, Ott et al. 1995, 1996, 1997). Sie besiedelt vornehmlich kalkhaltige Böden, Flechten, Moospolster und sonnenexponierte Standorte. Ihre Farbe wechselt von hellgelb zu dunkel gelb und ihre Fruchtkörper erscheinen meist in dunklem, orangefarbenem Ton. Die Färbung kommt wie bei allen *Telochistaceae* aufgrund des an der Oberfläche der Flechte abgesonderten kristallinen sekundären Flechteninhaltsstoffes Parietin (Brodo et al., 2001, Schöller 1997) zustande.

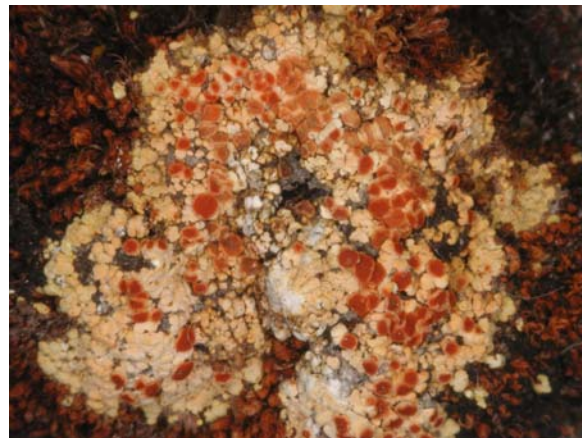


Abb. 1. *Fulgensia bracteata*: Flechtenlager mit gelb gefärbten Areolen (Thalli) und orange gefärbten Fruchtkörpern (Apothecien)

2.2. *Xanthoria elegans* aus Habitaten des Hochgebirges (Alpen)

Proben der Flechte *Xanthoria elegans* (Link) Th.Fr. wurden nahe des Sanetsch Gletschers (Wallis, Schweiz GPS: N46°21.799'; E007°17.844', am 02.Juli 2002) und auf der Seiser Alm (Südtirol, Italien N46° 54', E11°62') gesammelt.

II. Material und Methoden

X. elegans ist eine krusten- bis lobenförmige Flechte, die vornehmlich in alpinen und polaren Regionen vorkommt. Ihre Färbung variiert von blass gelb orange bis dunkel rot orange (Brodo et al. 2001). Die Färbung kommt ebenfalls wie bei der Flechte *F. bracteata* aufgrund der oberflächlichen Absonderung des kristallinen Inhaltsstoffes Parietin zustande (Brodo et al, 2001). Sie wächst meist auf Gneis, Dolomit oder anderem felsigem bis kalkhaltigem Gestein und ist an den von ihr besiedelten Standorten direkter Sonneneinstrahlung ausgesetzt. Dabei kann in ihren Vorkommensgebieten auch auf eine erhöhte UV A und UV B-Einstrahlung geschlossen werden. Für die Kulturversuche, Keimungsfähigkeit und Wachstum der Sporen und Hyphen musste teilweise auf eine Artverwandte Flechte (*X. parietina*) ausgewichen werden, da für einige Versuche mit Sporen von *X. elegans* nicht genügend Ausgangsmaterial für statistische Auswertungen zur Verfügung standen.

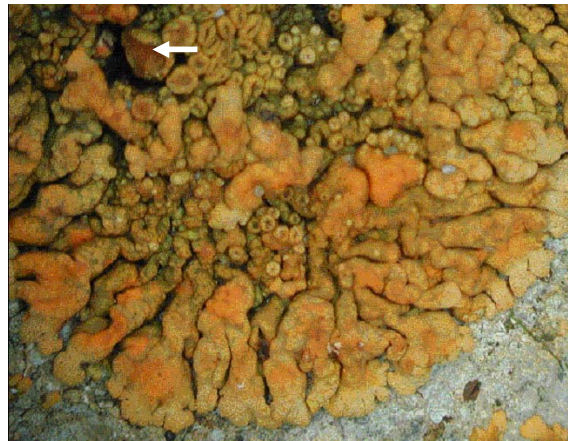


Abb. 2. *Xanthoria elegans*: rot-orange gefärbter Thallus mit dunkel gefärbten, schüsselförmigen Fruchtkörpern (siehe Pfeil).

2.3. *Xanthoria parietina*

Xanthoria parietina (Fr.) Th. Fr. nom. cons. wurde auf der schwedisch-baltischen Insel Gotlands gesammelt. Es handelt sich hierbei um eine kosmopolitische Flechte (ausgenommen Polarzone und Hochgebirge) mit schwerpunktmäßiger Verbreitung in den gemäßigten Breiten (Poelt 1969). Sie wird auch als stark nitrophil bezeichnet. Ihre Erscheinungsform wechselt von lappig bis schuppig, blasig-warzig verunebnet bis feinlobig zerteilt. Die Lager sind meist durch den sekundären Inhaltsstoff Parietin (Brodo et al. 2001) orange bis rot gefärbt, wobei die Fruchtkörper (Apothecien) lecanorin, aufsitzend sind. Sie besiedelt Baumrinden, Holz und Gestein und wächst sowohl an sonnen exponierten als auch an schattigen Standorten. Die Flechte wurde zusätzlich aufgrund ihrer phylogenetischen Nähe zur Hochgebirgsflechte

Xanthoria elegans und aufgrund größerer Mengen an Sporenproduktion mit geringer saisonaler Abhängigkeit bezüglich ihres Streuverhaltens für Kulturversuche, Keimungsfähigkeit der Sporen und Wachstum des Mycobionten verwendet.

2.4. Materialgewinnung für die Analyse des 3-Komponenten-Systems

Um das Resistenzpotential der in der Flechtensymbiose befindlichen Bionten mit dem Potential der außerhalb der Symbiose befindlichen Bionten vergleichen zu können, und Rückschlüsse auf die Bedeutung der Symbiose ziehen zu können, war eine Isolierung der einzelnen Bionten notwendig. In den folgenden Kapiteln wird der Schwerpunkt auf eine Materialbeschreibung der Bionten des zu analysierenden 3-Komponenten-Systems (Flechte, Mycobiont, Photobiont) gelegt, spricht aber gleichfalls kurz die dafür notwendigen Isolierungsmethoden unter Verweis auf die ausführlicheren Methodik-Beschreibungen im Kapitel 3 an. Die Gewinnung der Ascosporen, welche im anschließenden Kapitel in einer reinen Materialbeschreibung Erwähnung finden, wird im Kapitel 3.2.4. gesondert beschrieben, da in den hier folgenden Kapiteln schwerpunktmäßig auf die ausdifferenzierten Bionten (Algencluster, Mycelien) fokussiert werden soll.

2.4.1. Ascosporen von *F. bracteata*, *X. elegans* und *X. parietina*

Zur Analyse der Keimungsfähigkeit der indirekt (den Weltraumparametern exponierten Fruchtkörper) und direkt exponierten Ascosporen mussten die Sporen aus dem Fruchtkörper gewonnen werden, was über Sporulationsversuche (siehe Kap. 3.2.4.) erfolgte. Innerhalb der Fruchtkörper der Gattung *Xanthoria* befinden sich im Ascus 8 zumeist hyaline beziehungsweise farblose, dipolare zweizellige Sporen während bei *F. bracteata* die 8 schmalen bis breit elliptischen Sporen hyalin aber einzellig und unpolar sind.

II. Material und Methoden

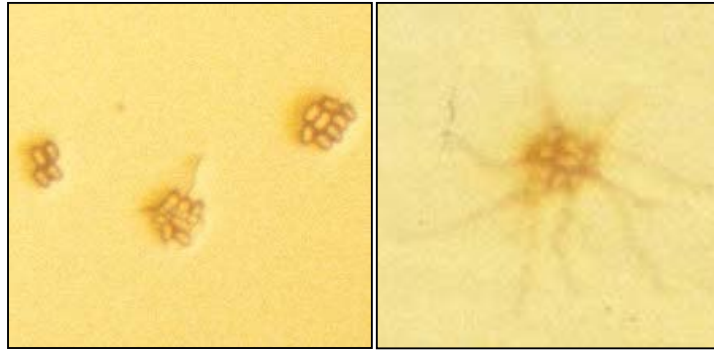


Abb. 3.: Keimende Ascosporen von *X. elegans* und Auswachsen eines Mycels in das Nährsubstrat.

2.4.2. Mycelien der Mycobionten von *F. bracteata* und *X. elegans*

Die Mycelien wurden aus den Flechten direkt oder durch Sporulationsversuche gewonnen. Kulturen aus direkten Thallusfragmenten erforderten eine spezielle Vorbereitung. Vor der Isolierung der Bionten wurden einzelne Thallusstücke der verschiedenen Flechtenarten für 30 bis 60 Minuten unter fließendem Wasser gespült, um oberflächliche Kontaminationen zu beseitigen. Mit Hilfe eines Skalpellmessers wurden anschließend die gespülten Thallusfragmente zerkleinert. Mit Hilfe eines Skalpells wurde in den entsprechenden Thallusbereichen, wie oberes Mark, der Mycobiont herausgeschnitten und zunächst auf einem Malz-Hefe Substrat (MY) kultiviert. Die Isolierung und Kultivierung von Mycelien des Mycobionten gestaltete sich jedoch durch die Sporulationsversuche als weniger schwierig (siehe Kap. 3.1.5). Die Unterscheidung der Mycelien von *F. bracteata* und *X. elegans* kann wie folgt beschrieben werden: die Hyphen von *F. bracteata* wachsen in kleinen Spots und bilden weit verzweigte Kolonien weißlicher Färbung und können zu einem weiß bis gelblichen Rasen zusammenwachsen, während die Hyphen von *X. elegans* lokal ein anschwellendes weiß bis zart rosa gefärbtes Mycel bilden, das ab einer Größe von ungefähr 4 bis 6 mm kleinere Tochtermycelien bildet, die sich nicht weit vom Muttermycel entfernt entwickeln.

2.4.3. Kulturen der Photobionten von *F. bracteata* und *X. elegans*

Wie bereits in Kap. 2.5. beschrieben, erforderte die Gewinnung von Photobionten-Kulturen sowie die Herstellung von Mycobionten-Kulturen aus Thallusfragmenten der jeweiligen Flechtenvertreter eine spezielle Vorbereitung. Vor der Isolierung der Photobionten sind einzelne Thallusstücke der verschiedenen Flechtenarten für 30 bis 60 Minuten unter

fließendem Wasser gespült worden, um oberflächliche Kontaminationen zu beseitigen. Mit Hilfe eines Skalpellmessers wurden anschließend die gespülten Thallusfragmente zerkleinert. Aus der Algenschicht sind mit einer fein ausgezogenen Glaspipette oder einer Spritze mit einer feinen Nadelspitze Algenkolonien unter mikroskopischer Beobachtung entnommen worden. Diese wurden anschließend zwecks Zellvermehrung auf festes und auch flüssiges Trebouxia-Organic Medium (TOM, Ahmadjian 1967) übertragen.

Die Photobionten beider Flechten gehören zu der Gattung *Trebouxia* wobei bei *F. bracteata* molekulargenetisch verschiedene Unterarten von *Trebouxia* (Schaper et al. 2003a, Schaper 2003b) im Thallus nachgewiesen wurden. Die Photobionten beider Flechten unterscheiden sich auch im Wachstum unter standardisierten Kulturbedingungen. Während *Trebouxia* von *X. elegans* ein ausgeprägtes glattes und flächiges Wachstum mit nur wenigen Agglomeraten aufweist, agglomerieren die Photobionten von *F. bracteata* sehr leicht zu blumenkohlartigen Strukturen.

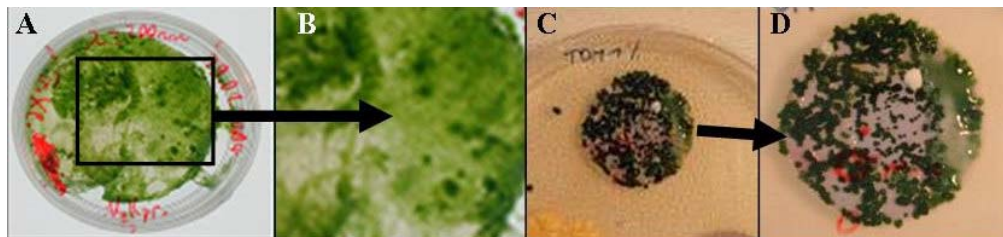


Abb. 4.: A. Photobionten der Gattung *Trebouxia* der Flechte *X. elegans* nach 12tägiger Kultivierung. B: Ausschnitt aus A. Deutlich sind vereinzelte Cluster erkennbar. C: Photobionten der Flechte *F. bracteata* nach 12tägiger Kultivierung. D: Ausschnitt aus C; ein starkes Cluster-Wachstum ist erkennbar.

II. Material und Methoden

3. Methoden

3.1. Hardware / Technik

3.1.1. Bestrahlungsversuche an den Space-Facilities im DLR

Um die Flechten den extremsten Bedingungen auszusetzen, die je bei diesen Organismen getestet wurden und möglichst die Grenzen für das Überlebenspotential der Flechtensymbiose zu erforschen sowie die astrobiologischen Fragestellungen beantworten zu können, wurden Parameter simuliert, die den Weltraumbedingungen sehr nahe kommen. Die Simulation erfolgte in einer der Simulationsanlagen des DLR. Speziell handelte es sich dabei um die Simulationsanlage mit dem Pumpstand 6 (Horneck 1999, siehe auch die Web-Seite www.strahlenbiologie.dlr.de, Abb.5).

Bei diesem Pumpstand handelt es sich um ein Turbomolekulares Pumpsystem von Pfeiffer Blazers des Typs DV0 004B mit der Nr. PK D42 706-A/P5082F, welches optimale Niedrigdrücke von 10^{-5} Pa bis Optimal-niedrigdrücke von 10^{-6} Pa in einem Stahlprobenzylinder erreichen kann. Gemessen wurden die tatsächlichen Werte über ein Messgerät von Pfeiffer Vakuum des Typs TCP 380. Der Pumpstand ist zusätzlich mit einer Deuteriumlampe (Heraeus D200 F mit einem Synthetik Silicon Fenster) als UV-Quelle in der Abdeckung des Simulationszylinders ausgestattet. In einem Abstand von 13.4 cm der beschriebenen UV-Quelle zum horizontal verstellbaren Probenstisch erreicht man Wellenlängen von $\lambda \geq 160$ nm. Die Bestrahlungsstärke des UV-

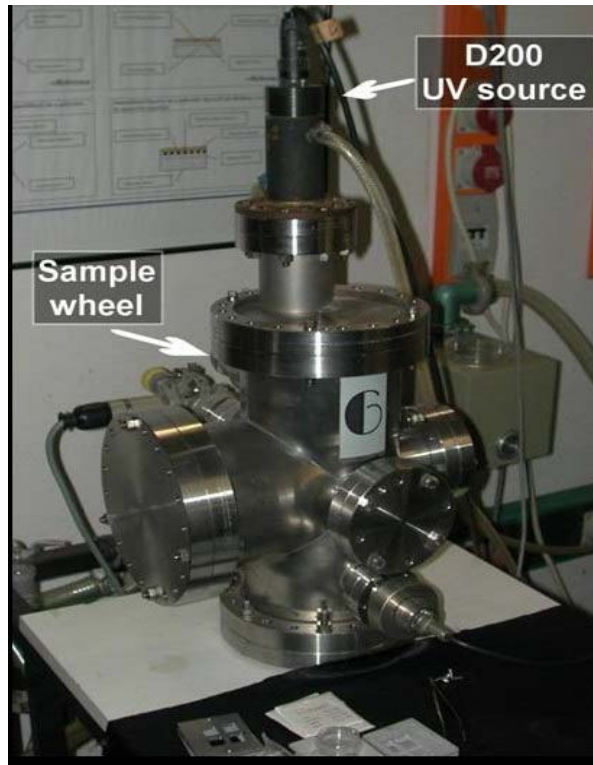


Abb. 5: Pumpstand 6 für Weltraumsimulation (Space facility der Strahlenbiologie am DLR in Köln (Porz/Wahn))

Spektrums ($200 \text{ nm} \leq \lambda \leq 400 \text{ nm}$) wurde in Höhe der Probenebene spektroradiometrisch

(Bentham 150) mit dem Wert 2.7556 Wm^{-2} bestimmt. Um die Bestrahlungsdosis beim erweiterten Wellenlängenbereich mit $\lambda \geq 160 \text{ nm}$, welche bei zusätzlich eingesetzten Vakuum erreicht werden kann, bestimmen zu können, wurden die spektroradiometrischen Messungen durch Verwendung der Daten des Lieferanten auf 8.084 Wm^{-2} extrapoliert.

Die Bestrahlung der Proben mit UV C eines definierten Wellenlängenbereichs mit $\lambda = 254 \text{ nm}$ erfolgte über eine Quecksilber-Niederdruck-Lampe (Heraeus Typ NN 8/15, monochromatische UV C-Strahlungsquelle), die einer Bestrahlungsstärke von $40 \mu\text{W cm}^2$ oder $70 \mu\text{W cm}^2$ in Höhe des Probenisches erreichte, woraus man letztendlich die tatsächliche Dosis in Abhängigkeit von Zeit (Bestrahlungsdauer) und tatsächlichem Abstand der Probe zur UV-Quelle errechnen konnte (siehe verwendete Parameter in Kap. 3.1.4.). Genauer handelt es sich bei dieser Strahlungsquelle nach nachträglichen Messungen durch Spektrometrie um eine Lampe, die eine Hauptemissionslinie im Bereich der Wellenlänge von

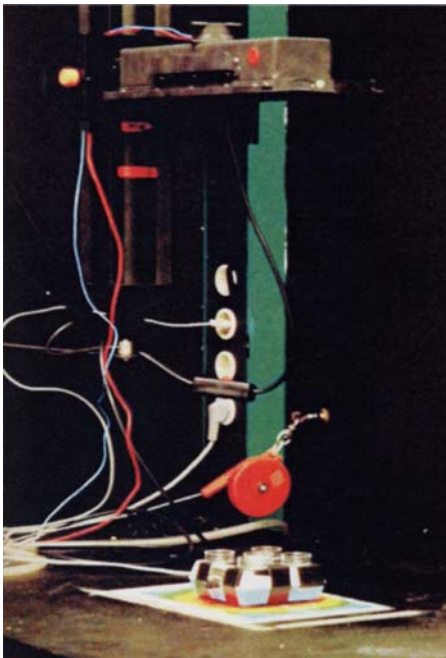


Abb. 6. Quecksilber-Niederdrucklampe (UV C-Strahler)

253,7 nm aufweist (Abb. 6 ; de la Vega 2004). Die Verwendung derartiger Quecksilber-Niederdrucklampen zur UV-Inaktivierung von Mikroorganismen gilt in der Photobiologie als experimenteller Standard. Die Anwendung dieser Lampe ermöglicht somit direkte Vergleiche mit bisher veröffentlichten Daten. Der Strahler (Abb. 6) befindet sich in einem höhenverstellbaren, rechteckigen Kasten, der mit einem Abdunklungsschieber versehen ist und an der Oberseite durch eine Öffnung mit Hilfe eines Ventilationsmotors von PAPST Germany des Typs 612 M gekühlt wird.

Durch Öffnen und Schließen des Schiebers werden die Bestrahlungszeiten additiv auf die Proben reguliert.

Das Bestrahlungsfeld der in dieser Arbeit präsentierten Experimente befand sich in Höhe von 30 cm unter der

Strahlenquelle und ist aus früheren Messungen mit Hilfe eines UVX-Radiometers in seine Fluenzverteilung auf einer Unterlage eingeteilt worden (Abb. 7).

II. Material und Methoden

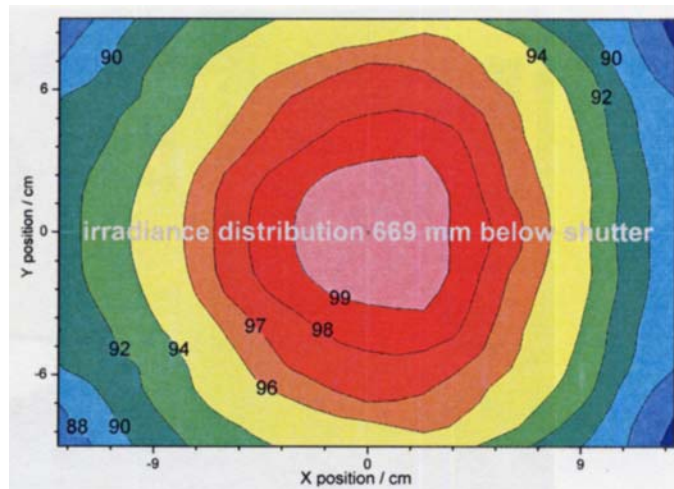


Abb.7: Bestrahlungsfeld bei UV C-Strahlung (DLR, Porz/Wahn)

In dem in diesem Experiment verwendeten Bestrahlungsfeld (30 cm^2) betrug die Homogenität zwischen 97 % und 99 %. Die Bestimmung der oben angeführten Bestrahlungsstärke erfolgte nach dem Vorheizen der Lampe mit einer Einbrenndauer von 30 min vor Bestrahlungsbeginn mit Hilfe eines UV-Radiometers mit einem Sensorkopf für 254 nm (Kapitel 3.1.4.) und wurde während der Experimentierzeit immer wieder kontrolliert. Die gesamte Apparatur befand sich während der Bestrahlungsexperimente in einem zur Verhinderung vor unkontrollierter Reflexion schwarz gestrichenen, abgedunkelten UV-Labor (PEA III) des Instituts für Luft- und Raumfahrtmedizin des DLR in Köln/Porz-Wahn.

3.1.2. Vakuum- bzw. Niederdruck und die Koppelung mit den UV-Versuchen

Wie bereits in 3.1.1. beschrieben, wurde für die Niederdruck- und Vakuumversuche schwerpunktmäßig der Pumpstand 6 der Space-Facility-Anlage im DLR verwendet, der durch ein Turbomolekulares Pumpsystem optimale Niederdrücke von 10^{-5} Pa bis Maximalniederdrücke von 10^{-6} Pa in einem Stahlprobenzylinder erreichen kann. Die niedrigsten Drücke wurden jedoch aufgrund von Abdichtungsproblemen und Ausgasen der Proben selten erreicht. Meist bewegte sich der Niederdruck zwischen 10^{-3} Pa und 10^{-5} Pa, was ebenfalls zeitabhängig ist. Je länger die Expositionszeit dauerte, umso niedriger wurde der Druck bis er sich um einen Wert einpendelte und konstant blieb. Um besseres Vakuum zu erreichen, wurde der Pumpstand 1 der DLR-Anlage verwendet, wo sogar Drücke von 10^{-6} Pa bei sehr tiefen Temperaturen erreicht werden konnten. Dazu wurde eine LAUDA Ultra-Kryomat RUL 8-Pumpe verwendet und die tatsächlichen Werte am Blazers-Messgerät des Typs TPG 300 über einem Digitaldisplay abgelesen. Hier war aber nur unter großem Aufwand eine Koppelung

mit UV-Bestrahlung möglich, so dass darauf verzichtet wurde und die Vakuum-UV Exposition vornehmlich im Pumpstand 6 der Anlage erfolgte.

3.1.3. Asteroiden-Impact-Versuche am Ernst-Mach Institut (EMI/Fraunhofer Gesellschaft)

Während in den beiden vorangegangenen Kapiteln die Versuchsanordnungen für die Exposition der Proben im Hinblick auf die Simulation extremer Bedingungen wie UV-Strahlung und Vakuum bzw. Niederdrücken beschrieben worden sind, so wird in diesem Kapitel die Versuchsanordnung, die eingesetzte Hardware und Technik für Asteroiden-Simulationsversuche beschrieben. Dabei wurden am Ernst-Mach Institut in Efringen-Kirchen die Auswirkungen sehr hoher Drücke und damit sehr hoher Temperaturen, wie sie bei Asteroiden- bzw. Meteoriteneinschlägen vorkommen, auf die Flechte *X. elegans* getestet. Für die Simulation dieser Asteroiden-Impact-Versuche und die nachträgliche Bestimmung der Stoßwellendrucke (Meyer 2005) verwendete man eine spezielle Technik, welche von Müller und Hornemann (1969) sowie Stöffler und Langenhorst (1994) entwickelt und verwendet wurde (Horneck et al. 2001a), jedoch aufgrund der von uns veränderten Probengröße in ein wenig abgewandelter Form eingesetzt werden musste.

Man verwendete hierzu einen Versuchsaufbau, wie er in Abb. 8 dargestellt ist. Präparierte 50 µm dicke Flechtenproben (siehe Kap. 3.7), die zwischen zwei 0,49 mm dicke Gabbroplättchen angeordnet waren, wurden in eine Vertiefung eines Armcoeisenzylinders mit einem Durchmesser von 1,51 cm eingesetzt. Dieser Probenhalter-Zylinder wurde in einem größeren Armcoeisencontainerzylinder eingepasst welcher wiederum von einem Stahlblock ummantelt wurde. Der Sinn dieser Anordnung ist die Verhinderung von Kontamination der Proben und der Erhalt der Proben auf kleinstem Raum nach der Einschlagssimulation, was ohne diese Apparatur nach der Simulation eine Verteilung der Proben auf großer Fläche bedeutet hätte und unmöglich hätte wieder eingesammelt werden können. Auf den ummantelten Probenzylinder wurde eine so genannte Fireplate (Feuerplatte) über einen Plexiglasabstandsring (Spacing ring) positioniert und darüber die Sprengladung mit der Zündschnur gesetzt. Die gesamte Apparatur wurde in einen Sprengbunker des EMI-Steinbruchs gestellt und vor der Sprengung hermetisch abgeriegelt. Die Sprengung nahm ein Sprengmeister vor (Abb. 9a).

II. Material und Methoden

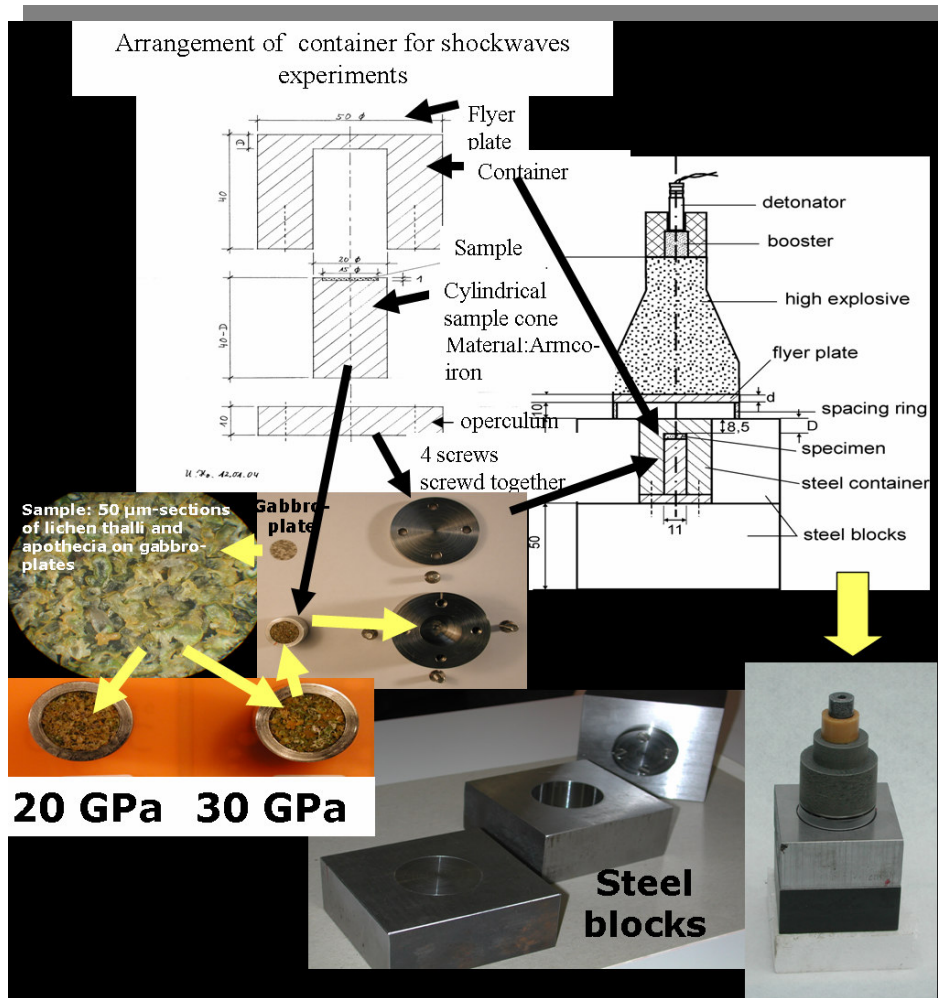


Abb. 8.: Versuchsaufbau für die Schockwellenexperimente: Mikrotomschnitte der Flechten werden dicht an dicht auf Gabbro-Unterlagen versetzt und schließlich in einem Armcoeisen-Zylinder sowie einem speziellen Container überführt, worüber letztendlich die Sprengung erfolgt und den Druck eines Asteroideneinschlags von hier 20 oder 30 GPa simuliert.

Nach den jeweiligen Sprengversuchen und direkter Kühlung der Probe (meist 1,5 bis 2 min nach der Sprengung) wurden die Containerzylinder in der Werkstatt des DLR in Köln (Abb. 9b) durch mechanisches Aufdrehen und Kühlen des durch die Drehung erhitzten Armcoeisens geöffnet und die Probenzylinder letztendlich unter der Clean-bench in unserem Institut von den Proben befreit, welche nun für die Vitalitätstests am CLSM bereit standen.



Abb. 9a: Sprengungsvorbereitungen durch den Sprengmeister am EMI in Efringenkirchen.

Abb. 9b: Öffnung der durch Sprengung deformierten Container in der Werkstatt des DLR

3.1.4. Verwendete Parameter

Um den Grad der Vitalität der Flechte und der Bionten, die Keimungsfähigkeit der Ascosporen und das Wachstum der Photo- sowie Mycobiontenkulturen nach der Exposition definiert simulierter Weltraumbedingungen untersuchen zu können, sind in dieser Arbeit bestimmte Parameter ausgewählt worden, die beispielsweise das gesamte UV-Spektrum mit UV A, B und C mit einer Wellenlänge ab $\lambda \geq 160$ nm umfassen und zusätzlich verschiedene Vakuumdrücke appliziert worden, die im folgenden detailliert beschrieben werden.

3.1.4.1. UV-Dosimetrie

Die gemessenen Bestrahlungstärken wurden für die Weltraumsimulation am Pumpstand 6 mit Hilfe des Spektroradiometers Bentham 150 unter der Leitung von Herrn Dr. Facius, DLR Köln, bestimmt. Für die Bestimmung der Bestrahlungstärken der UV C-Lampe diente das UVX-Radiometer mit dem entsprechenden Sensor des Typs UVX-25 für 254 nm (UVP_{INC} Ultra-Violett Products, Cambridge, UK). Die somit schnelle und einfache Bestimmung der Bestrahlungsstärke diente zur letztendlichen Berechnung der Dosis. Zur Bestimmung der Fluenz in Jm^{-2} multipliziert man die ermittelten Werte der Bestrahlungsstärke (Einheit Wm^{-2} , hier μWcm^{-2}) mit der Bestrahlungszeit in Sekunden.

Es wurde zunächst mit einer geringen Dosis begonnen, die bei Versuchen mit Bakterien getestet wurden (Cockell 1998). Nach den ersten Untersuchungen ohne nennenswertes Absinken der Dosiseffekt-Kurve wurde der Versuchsansatz auf Langzeitexperimente erweitert.

Für die in dieser Arbeit präsentierten Experimente ergaben sich damit folgende Werte für die Dosis:

II. Material und Methoden

1. UV-Bestrahlung mit der Wellenlänge $\lambda \geq 160$ nm; Bestrahlungsstärke: 8.084 Wm^{-2}

Expositionszeit (t_e)	Dosis (kJm^{-2})
1 min	0.485
5 min	2.42
15 min	7.28
30 min	14.55
1 h	29.1
2 h	58.2
4 h	116.4
8 h	232.8
16 h	465.6

2. UV-Bestrahlung mit der Wellenlänge $\lambda \geq 200$ nm; Bestrahlungsstärke: 2.7556 Wm^{-2}

Expositionszeit (t_e)	Dosis (kJm^{-2})
1 min	0.165
5 min	0.826
15 min	2.48
30 min	4.96
1 h	9.92
2 h	19.84
4 h	39.68
8 h	79.36
16 h	158.72
2 Wochen	3333.17

3. UV-Bestrahlung mit der Wellenlänge $\lambda \geq 254$ nm; Bestrahlungsstärke: $70 \mu\text{Wcm}^{-2}$

Expositionszeit (t_e)	Dosis (kJm^{-2})
1 min	0.042
5 min	0.21
15 min	0.63
30 min	1.26
1 h	2.52
2 h	5.04
4 h	10.08
8 h	20.16
16 h	40.32

4. UV-Bestrahlung mit der Wellenlänge $\lambda \geq 254$ nm; Bestrahlungsstärke: $40 \mu\text{Wcm}^{-2}$

Expositionszeit (t_e)	Dosis (kJm^{-2})
1 min	0.024
5 min	0.12
15 min	0.36
30 min	0.72
1 h	1.44
2 h	2.88
4 h	5.76
8 h	11.52
16 h	23.04

II. Material und Methoden

3.1.4.2. Simuliertes Weltraumvakuum (Niederdruck des Erdnahen Orbits/Marsdruck)

Die Standardisierung des Niederdruckes war aufgrund des Ausgasens der Proben fast unmöglich. Im folgenden werden nur die im Mittel auftretenden eingesetzten Drücke aller Experimente aufgezeigt. Genauere Angaben bitte ich aus den Diagrammen im Ergebnisteil zu entnehmen.

t_e	Druck (Pa)
1 min	2.8×10^{-1}
5 min	7.4×10^{-2}
15 min	1.1×10^{-4}
30 min	6.1×10^{-5}
1 h	4.4×10^{-5}
2 h	3.6×10^{-5}
4 h	3.2×10^{-5}
8 h	3.2×10^{-5}
16 h	3.1×10^{-5}
2 Wochen	10^{-5} bis 9.1×10^{-6}

3.1.4.3. Erwartete und tatsächliche Werte der Asteroiden-Einschlags-Simulations-Parameter

Bei der hier beschriebenen Versuchsreihe ging es um die Simulation der Parameter eines Asteroideneinschlags, wie sie im Bereich der Spalationszone (= Auswurfzone) eines Einschlagskraters auf dem Mars errechnete wurden. Es wurden zugrunde liegende Marsdaten (Artemieva et al. 2004) genommen, um einerseits die astrobiologische Fragestellung zu erörtern,

1. wie wahrscheinlich in der Vergangenheit ein interplanetarer Austausch von Leben zwischen Mars und Erde nach einem Asteroiden- Einschlag auf dem Mars gewesen sei, wenn der Mars möglicherweise Leben hervorgebracht hätte und
2. das Überlebenspotential der Flechtensymbiose unter erweiterten Extrembedingungen zu erforschen, was Aufschlüsse über das Fortbestehen von Leben nach einem Asteroideneinschlag geben könnte und neue Erkenntnisse über das Lancieren einer

Neubesiedlung mit eventuell einer neuen Evolution eines verwüsteten Planeten nach einem derartigen Einschlag geben könnte.

Da die Simulation der Stoßwellendrucke von Asteroideneinschlägen, wie sie auf der Erde nötig wären, um genügend Material ins All zu katapultieren, im Rahmen unseres limitierten DFG-Budgets für das Projekt äußerst kostspielig gewesen wäre, wurden schwerpunktmäßig Drücke simuliert, wie man sie aufgrund von Einschlagskratern auf dem Mars berechnen konnte. So kann in dieser Arbeit auf einen erweiterten Teil der ersten Fragestellung bzgl. einer möglichen Infektion des Mars durch irdisches, biologisches Material nach Asteroideneinschläge auf der Erde und anschließendem interplanetaren Austausch nur bedingt eine Antwort gegeben werden.

Es wurden folgende adäquate Marseinschlagsdrücke der Marskraterspalationszonen nach Berechnung aller Abstände, Materialcharakteristika der Hardware (siehe Abb. 8) und dem dafür nötigen Sprengsatz erwartet: 10 GPa, 15 GPa, 20 GPa, 30 GPa, 40 GPa und 50 GPa.

Die letztendlich tatsächlich erreichten Drücke ergaben sich nachträglich durch mineralogische Untersuchungen am eingesetzten Träger- und Deckmaterial der Gabbroplättchen, welche am Mineralogischen Institut des Naturkundemuseums in Berlin (Humboldt-Universität) der Mineralogin C. Meyer unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Stöffler durchgeführt wurden. Durch Veränderungen der Kristallstrukturen sowie der Chemie des Minerals, was mit Hilfe mikroskopischer, optischer Methoden sowie durch Raman-Spektroskopie ermittelt wurde, konnte man letztendlich den tatsächlichen Druck, der auf die Proben eingewirkt hat, sowie weitere Parameter des simulierten Einschlags, wie Stoßwellentemperatur während und nach dem Einschlag und die Impulsdauer, ermitteln. In der nachfolgend aufgeführten Tabelle können die tatsächlichen Werte der auf die Proben einwirkenden Parameter abgelesen werden.

Schockwellendruck [GPa]	Schock-Temperatur D [K]	Post-Schocktemp. D [K]	Impulsdauer [µs]
10	4	3	1.41
15 ±	14*	11*	n.b.
20 ± 6	12 - 103	9 - 63	0.66
32 ± 3	91 - 456	57 - 256	0.39
42 ± 3	591 - 1035	328 - 557	0.16
50 ±	1446*	762*	n.b.

Daten aus C. Meyer 2005 * nach Berechnungen; Untersuchungsergebnisse lagen noch nicht vor
n.b. = nicht bestimmt

II. Material und Methoden

3.1.5. Präparation der Proben

Um die Auswirkungen der extremen, weltraumähnlichen Bedingungen (UV-Strahlung und Vakuumdrücke) auf die Flechten und ihre Bionten sowie die Unterschiede zwischen der Symbiose und den außerhalb der Symbiose befindlichen Bionten untersuchen zu können, wurde dieses 3-Komponenten-System (Flechte, Photobiont, Mycobiont) unter den oben beschriebenen, möglichst gleich gehaltenen Parametern getestet. Dabei wurden die Proben der Flechtenthalli vor der Exposition auf dem Boden einer Petrischale mit Hilfe von Leit-Tabs des Typs G3347 (PLANO W. Plannet GmbH) für die SEM (Scanning elektron microscopy) festgeklebt (Abb. 10).



Abb. 10: Trockene Flechtenproben auf den Böden der Petrischalen geklebt. Links: *X. elegans*, rechts: *F. bracteata*

Zur Präparation dienten die bereits in Kap. 2 vorgestellten Flechten. Dabei waren folgende Elemente der Flechte von Interesse: (1) 8 Flechtenthalli und 8 Apothecien (Fruchtkörper) *in vivo* pro Bestrahlungsgang und (2) Flechtenthalli sowie Apothecien gleicher Anzahl mit entfernter Rinde für das Studium der möglichen Schädigung durch direkte Strahlung ausgesetzter lichenisierter Bionten sowie (3) die in der Wachstumsphase befindlichen, isolierten Bionten, welche auf speziellen Nährmedien (siehe Kap. 3.2.2.) kultiviert wurden. Die Entfernung der Rinde erfolgte über ein Mikrotom des Typs MGW LAUDA (Fa. Leitz, Wetzlar) bei -25°C bis -27°C mit ungekühltem Messer. Da die Rindendicke je Standort unterschiedlich ausfällt, wurden die in einen Eistropfen eingefrorenen Proben vorsichtig von der Tropfenoberfläche bis zum Tropfenkern in $20\ \mu\text{m}$ -Schnitten geschnitten, wobei an der Probenoberfläche vorsichtig in $15\ \mu\text{m}$ -Schritten bis an die Grenze zur Photobiontenschicht heran geschnitten wurde. Die so artifizuell von ihrer Rinde befreiten Flechten konnten dann im Vergleich mit den unbeschädigten Flechten das Maß für die Schutzfunktion der Rinde gegen hohe UV-Strahlung und Vakuum-Austrocknung aufzeigen.

3.1.5.1. Anfertigung der Schnitte

Nach der Bestrahlung wurden die Flechtenthalli und Apothecien sowie die Mycelien der Mycobionten mit Hilfe des oben beschriebenen Mikrotoms für die Vitalitätstests (siehe Kap. 3.3.4) vorbereitet. Es wurden vertikal zur Flechtenoberfläche 120 µm-Querschnitte der Flechtenproben oder der Proben des Mycobionten für die Durchmusterung angefertigt und in einen Wassertropfen auf einem Objektträger überführt.

3.1.5.2. Präparation der Photobionten

Die in Flüssigkultur kultivierten und in der Wachstumsphase befindlichen Photobionten wurden durch Filtrieren auf MFTM-Membran Filter aus Nitrocellulose der Firma MILLIPORE (Durchmesser 25 mm, Porengröße 45 µm) überführt. Die Auswahl der Filter beruht auf Erfahrungen, die bei der Durchführung früherer Kulturversuche erzielt wurden. Diese mit den Photobionten versehenen Filter wurden in sterile Petrischalen mit Nocken der Firma Greiner bio-one (Durchmesser 35 mm, Höhe 10 mm, Typ ADR Klasse 000020, Nr. 3918843) gelegt und anschließend den einzelnen Parametern exponiert. Nach der Exposition wurden die Filter entweder direkt am Confocalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) hinsichtlich der Vitalitätstests untersucht oder in neue Petrischalen auf die Nährmedien (TOM, siehe Kap. 3.2.2.) gegeben. Hierbei ist auch noch wichtig zu erwähnen, dass die Photobionten auf den Filtern aufgrund ihres heterogenen Wachstums teils als Monolayer und teils als Agglomerate aufliegen und insbesondere die Agglomeratbildung der Photobionten von *Fulgensia bracteata* über 50 % lag.

3.1.5.3. Präparation der Mycobionten

Nach der Isolierung der Mycobionten aus den Flechtenthalli und nach einer Kultivierungs- und somit Wachstumszeit der Mycelien von zwei Monaten wurden diese nach Ablösen des Primärsubstrats (meist MY-Medium) ebenfalls auf Millipore Filter (Durchmesser 25 mm, Porengröße 45 µm) in sterilen Petrischalen der Firma Greiner (Durchmesser 35 mm, Höhe 10 mm, Typ ADR Klasse 000020, Nr. 3918843) überführt. Hernach fand die Exposition der Mycobionten zu den einzelnen Parametern statt und nach den Simulationsexperimenten wurden die Bionten entweder direkt, wie in 3.1.5. beschrieben für die Vitalitätstests präpariert

II. Material und Methoden

oder zwecks Beobachtung des Wachstumsverhaltens auf die verschiedenen Sekundär-Nährmedien (Kap. 3.2.2.) überführt.

3.1.5.4. Präparation der Ascosporen durch Sporulationsversuche

Für die Sporulationsversuche wurden von den entsprechenden Flechtenthalli Apothecien abpräpariert und 30 Minuten unter fließendem Wasser gespült. Die Apothecien wurden anschließend mit Vaseline auf die Deckelunterseite der mit Medium ausgegossenen Petrischalen fixiert, so dass die Sporen aus den Fruchtkörpern auf die Agaroberfläche oder den auf dem Substrat aufliegenden Filter oder Leit-Tabs ausgeschleudert werden konnten. Nach erfolgreicher Sporulation sind die Deckel mit den Fruchtkörpern gegen neue sterile Deckel ausgetauscht worden, um eine mögliche Kontaminierung auszuschließen.

Das Streupotential der Flechte *F. bracteata* war aus einer Reihe vorangegangener Untersuchungen (Schaper 2003b) in unserem Institut bereits bekannt. Aufgrund saisonaler Abhängigkeit des Sporulationsverhaltens diente Herbstmaterial als Ausgangsprobe. Nur hier konnte man eine statistisch auswertbare Ausbeute mit über 1000 Sporen erhalten. Da jedoch für die im Sommer gesammelte Flechte *X. elegans* die Sporenausbeute nicht annähernd so groß war, als wie es nach mikroskopischen Untersuchungen der Fruchtkörper zu vermuten war, kann gleichfalls auf ein saisonales Optimum des Reifezustands der Sporen und somit der Streufähigkeit der Apothecien geschlossen werden. Um das Optimum des Streupotentials herauszufinden, wäre eine Langzeitbeobachtung (ein Jahr) vor Ort nötig geworden, was aber aus zeitlichen Gründen in meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Somit kann in den Untersuchungen bezüglich Strahlen- und Vakuumresistenz der Sporen von *X. elegans* nur eine Tendenz aufgezeigt werden und abweichend davon eine nahe verwandte, im Reifezustand der Sporen saisonal unabhängige Flechtenart wie *X. parietina* zusätzlich als Vergleich zu *F. bracteata* hinzugenommen werden.

Um den Grad der Vitalität und das Keimungsverhalten der Ascosporen beider Flechten zu testen sowie die Strahlen- und Vakuumschutz-Funktion des die Sporen umgebenden hymenialen Gewebes der Apothecien zu untersuchen, wurden zwei Versuchsreihen gestartet. Bei der ersten Versuchsreihe handelt es sich um Sporulationsversuche bestrahlter und/oder dem Niedrigdruck exponierte Apothecien, und in der zweiten Versuchsserie wurden Sporen unbestrahlter und/oder dem Niedrigdruck nicht exponierte Fruchtkörper vor der Exposition zur Streuung gebracht. Die Sporen bestrahlter Apothecien brachte man direkt über den Nährmedien für anschließende Beobachtungen des Keimungsverhaltens zum Streuen,

während Sporen unbestrahlter Apothecien für die direkte Exposition der Sporen zunächst auf SEM Leit-Tabs des Typs G 3347 (PLANO W. Plannet GmbH) zur Ausstreuung gebracht und anschließend den Parametern exponiert wurden. Die isolierten Sporen auf den Leit-Tabs konnten aus Präparationsgründen und der überdurchschnittlichen Kontaminationshäufigkeit, obwohl es immer wieder zur Keimung kam, nur für korrekte statistische Auswertungen von Vitalitätstest verwendet werden. Parallel dazu fanden Kontrollversuche statt.

3.2. Kulturversuche

3.2.1. Lichtmakro- und mikroskopische Untersuchungen

Zur Auswertung des Keimungsverhaltens der Ascosporen sowie des Wachstumspotentials der Mycelien des Mycobionten und einzelnen Photobiontenzellen sowie Photobionten-Cluster wurde das Lichtmikroskop DIALUX 20 EB und eine Mikro- und Millimeterskala verwendet. Die fotografische Dokumentation der Keimungsversuche erfolgte mit einem Tageslicht-Diafilm (Agfa RSX 200; Kamerakörper: Wild MPS 51; Fotoautomat: MPS 45). Um Fehlfarben zu verhindern, wurde zusätzlich für eine optimale Belichtung ein Tageslicht-Blaufilter benutzt. Die Dokumentation des Biontenwachstums erfolgte über eine Digitalkamera des Typs E 995 (Firma Nikon). Für makroskopische Aufnahmen wurde eine Stereolupe der Firma Wild, Heerbrugg (Modell M 3) mit einem Verbindungsobjektiv zur oben beschriebenen Digitalkamera verwendet.

3.2.2. Nährmedien

Die Keimungsfähigkeit der Sporen und das Wachstum des Photobionten sowie der Hyphen des Mycobionten ist ein Indikator für die Lebens- und Überlebensfähigkeit der Bionten nach den extremen, experimentellen Behandlungen. Die Ascosporen sowie die Mycelien der Mycobionten und die Photobionten der zu untersuchenden Flechten wurden nach der extremen Exposition auf verschiedene Nährmedien überführt:

Für den Mycobionten:

1. H₂O-Agar-Extrakt (CERO Agar Agar Roeper, Nr. 40.7798952, Typ 8952)
2. Kalkreicher Erdextrakt (gotländische Erde/H₂O 1:8) nach Esser, 1976, Ahmadjian 1964, Yamamoto et al. 1993 mit leichter Abwandlung

II. Material und Methoden

3. Martian Regolith Simulant JSC Mars-1-Extrakt (MARS/H₂O 1 :8) nach leichter Modifikation im Mischungsverhältnis basiert das Rezept auf Esser, 1976 unter der Verwendung des Erdersatzsubstrates Mars 1 (Allen et al. 1998, 2000)
4. MY (Malz-Hefe-Extrakt), Ahmadjian 1993

Für den Photobionten

5. Trebouxia-Organic-Medium (TOM) (Ahmadjian 1967)

Da bereits bei den Bestrahlungs- und Vakuumversuchen früh ersichtlich war, dass der Photobiont sehr sensitiv auf die verwendeten Parameter reagierte und Mangel an JSC-Mars 1-Substrat bestand, wurde auf die Bearbeitung der erweiterten astrobiologischen Fragestellung wie Wachstum des Photobionten auf Mars-Simulations-Substraten und die Referenzsubstrate wie Wasseragar und Erdextrakt verzichtet.

Im Folgenden soll noch einmal die Rezeptur verdeutlicht werden:

Malz-Hefe-Extrakt Agar (MY) (Ahmadjian 1993)

Malz Extrakt	20 g
Hefe Extrakt	2 g
Agar	20 g

Mit H₂O dd auf 1000 ml auffüllen

pH 5.6

JSC-Mars-1-Extrakt (MARS 1)

250 g MARS-1 (NASA) mit 2000 ml H₂O dd 1 h kochen, filtrieren und auf 1500 ml auffüllen, zentrifugieren und den Überstand erneut filtrieren (pH 7)

1000 ml der Lösung mit 20 g Agar vers.

Erd-Extrakt (EE)

250 g Erde vom Standort mit 2000 ml H₂O dd 1 h kochen, filtrieren und auf 1500 ml auffüllen, zentrifugieren und den Überstand erneut filtrieren (pH 7)

1000 ml der Lösung mit 20 g Agar vers.

Wasser Agar (WA)

1000 ml H₂O mit 20 g Agar

Trebouxia-Organic-Medium

(TOM) (Ahmadjian 1967)

Agar*	20 g
NaCl	25 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	25 mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	75 mg
KNO ₃	500 mg
(NH ₃) ₂ HPO ₄	250 mg
H ₃ BO ₃	11.42 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1.44 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8.82 mg
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	0.84 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1.57 mg
Co(NO ₃) ₂ x H ₂ O	0.49 mg
FeSO ₄ x H ₂ O	4.98 mg
NaEDTA x 2 H ₂ O	6.66 mg
Thiamin	10 mg
Biotin	1 mg
B 12	0.2 mg
Nikotinsäure	0.1 mg
HEPES	715 mg
Glucose	10 g
Proteosepepton	10 g

mit H₂O dd auf 1000 ml auffüllen

pH 5.5; * nicht bei Flüssigkultur

3.2.3. Wachstumsbedingungen (Temperatur, Licht)

Die angesetzten Kulturversuche auf den festen Nährmedien sind bei 16° C bis 20° C mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 7 h -14 h Licht (PPFD 25 – 45 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) durchgeführt worden und wurden vier- (Photobiontenkulturen) bis achtmal (Mycobiontenk.) wiederholt. Die Versuchsdauer umfasste für jede Versuchsreihe der Photobionten- und der Ascosporen-Keimungsanalyse zwischen 7 und 12 Tagen während jede Versuchsreihe der

II. Material und Methoden

Wachstumsuntersuchungen des Mycobionten einen Zeitraum zwischen 1 bis 3 Monaten umfasste, so dass groß angelegte parallel verlaufende Versuchsreihen gestartet wurden. Diese eingesetzten standardisierten Laborbedingungen wurden aufgrund von vorausgehenden, ausführlichen Voruntersuchungen bezüglich des Optimums von Temperatur, Medien und Hell/Dunkel-Rhythmus eingesetzt.

3.3. Confocale Laser Mikroskopie (CLSM)

3.3.1. Das Confocale Lasermikroskop

Das Confocale Laser Mikroskop ist vom Grundprinzip her ein Fluoreszenzlichtmikroskop, welches jedoch um ein spezielles Computer gestütztes Laserrasterverfahren erweitert worden ist und Gewebeproben in einzelne Schichten vertikal als auch horizontal abrastert und somit digitale Bilder von jeder Probenebene erstellen kann, so dass die Herstellung von extremen Dünnschnitten des Untersuchungsobjektes nicht mehr nötig sind. Außerdem verfügt es über verschiedene Software gesteuerte Filter, die das Licht bestimmter Wellenlängen kanalisieren. Je nach eingesetztem Fluoreszenzfarbstoff gewinnt man für die jeweilige Fragestellung über die Intensität und die Art des Spektrums Informationen über das analysierte Objekt. Das CLSM wird überwiegend in der Immunfluoreszenz-Analyse zur Identifizierung und Lokalisation bestimmter Organe, Organellen, Membranen, Enzyme, Proteine und Gene verwendet.

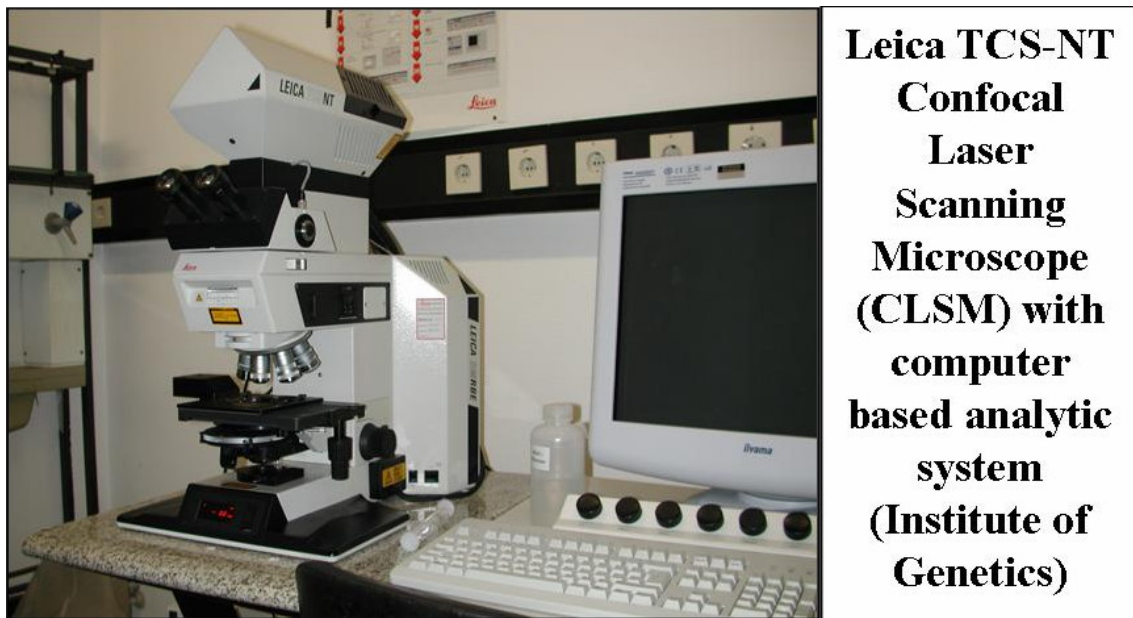


Abb. 11.: Das Confocale Laser Scanning Mikroskop (CLSM) mit der entsprechenden Hardware.

Bei dieser Methode nutzt man die Eigenschaften von spezifischen Antikörpern für bestimmte Proteine für die man sich interessiert. Steht dieser an das Protein andockende Antikörper mit einer fluoreszierenden Substanz in Verbindung oder dockt ein sekundärer fluoreszierender Antikörper als Sonde an den primären Antikörper an, so können die entsprechenden, gesuchten Proteine markiert werden und über das CLSM an jedem Ort des Objektes lokalisiert werden. Das CLSM dient aber auch zur Erkennung von Apoptoseprozessen und dem Grad der Vitalität von Zellen. Speziell dafür entwickelte Fluoreszenzfarbstoffe können hierbei Stoffwechselaktivitäten aufgrund von pH-Wert-Veränderungen oder Membranpotentialsänderungen sichtbar machen. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode ist eine besondere Form der Vitalitätsanalyse und wird in den folgenden Kapiteln näher erläutert. Für die Vitalitätsanalysen in der vorliegenden Arbeit wurde das Gerät Leica TCS NT Microscope von Leica Microsystems Heidelberg GmbH des genetischen Instituts (Leitung Frau Prof. Dr. Knust) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verwendet (Abb. 11). Für die Bilderstellung und Bildanalyse der Fluoreszenzmikroskopiebilder diente die speziell dafür entwickelte Software Leica TCS-NT/Confocal Systems (Version 1.0). Dieses System ist in der Lage, qualitativ sehr gute Aufnahmen zu erstellen und automatisiert oder über manuelle Befehle zu dokumentieren. Es können theoretisch Aufnahmen im UV sowie im sichtbaren Fluoreszenzlicht im Spektralbereich von 350-900 nm in allen vier Dimensionen des Objektes (3 Raumdimensionen und die zeitliche Dimension) erstellt werden. In dieser Arbeit konnte die zeitliche Analyse nur tangential behandelt werden, da ein entsprechender Softwarezusatz für filmische Dokumentation der zeitlichen Veränderungen während eines großen Zeitraums meiner Arbeit nicht zur Verfügung stand. Mit Hilfe von Momentaufnahmen, der Vorversuche und Ablesen der vergangenen Zeit an einer Uhr konnte jedoch ebenfalls auf eventuelles Ausbleichen (Bleaching) der Proben oder Fluoreszenzveränderungen über die Zeit geschlossen werden. Der in meiner Arbeit verwendete Spektralbereich für die Analysen lag jedoch zumeist zwischen 488 und maximal 700 nm, was sich aus den jeweiligen Spektralkurven in den Gebrauchsanweisungen der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe ergab und zudem vorgegeben war. Das System besitzt außerdem für die Bedienung des Mikroskops und seiner Laser ein ergonomisches User Interface (Bedienungsfeld) mit programmierbaren, interaktiven Kontrolltafeln mit 7 Wahlfunktionen für schnelles Umsetzen der an das Instrument geforderten Parameter. Fünf simultan über ein Verschmelzungs-Modul gekoppelte Laser mit motorisierten Anregungsfiltern (Argon-Krypton, Helium-Neon, siehe Tabelle 1) liefern die Anregungsenergien für die Fluoreszenzanalyse an den Objekten und ebenfalls fünf simultan angeschlossene Detektoren sind notwendig, damit die Informationen in den

II. Material und Methoden

einzelnen Kanälen eines bestimmten Fluoreszenz Spektralsatzes und die Informationen über reflektiertes sowie transmittiertes Licht in Bilder umgerechnet werden können. Dies führt auf dem Monitor zu mindestens 4 Bildern des Objektes: drei Bilder für grünes, rotes, und blaues Licht sowie ein Bild von der Überlagerung aller drei Fluoreszenzbereiche (genaueres über erweiterte Bildwiedergaben siehe Kap. 3.3.2.). Die Anwendung eines zusätzlichen UV-Lasers war nicht notwendig, da die in meiner Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe im sichtbaren Fluoreszenzbereich emittierten.

Tab. 1

Laser	Wellenlänge (nm) / durch Anregungsfilter
Argon-Krypton (ArKr)	488, 568, 647
Helium-Neon (HeNe)	488, 568, 633

Daten aus Leica TCS User Manual Book Rev. 99011

Die Software-Operationen erfolgten über das System WindowsTM NT und für optimale, mikroskopische Bildanalyse sorgte ein duales Monitorsystem mit „Cinemascope“ Desktop (Abb. 11). Für 2D und Pseudo-3D-Oberflächen-Messungen diente eine weitere Leica Standard software wobei 3D-Module auf AVS ExpressTM mit 24 bit Drei-Kanal-Wiedergabe bzw. -optionen basieren. Außerdem bot die Software auch optional Quantifizierungsfunktionen der Fluoreszenzpiks.

3.3.2. Bildgebende Verfahren und Bildanalyse

Wie bereits in 3.3.1. beschrieben, ist der Vorteil des hier verwendeten speziellen CLSM Leica TCS Analyseverfahrens die Möglichkeit alle Zellen in einem räumlichen Objekt in x-y-Ebene sowie in z-y-Ebene durchscannen zu können, wobei die Auflösung in der x-y-Ebene besser ist (bei 0.18 μm) als in der y-z-Ebene (0.35 μm). Dabei ist die Fähigkeit verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, die in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen emittieren können, simultan detektieren zu können von größter Wichtigkeit, da somit Farbveränderungen der Stoffe beobachtet werden oder Autofluoreszenzquellen in dem Objekt lokalisiert werden können. Zudem ist hierbei aufgrund der synchronen Lasertechnologie auch die Verwendung von zwei in unterschiedlichen Spektralbereichen fluoreszierenden Farbstoffe möglich. Kombinationen der Bilder und Verknüpfungen der Bildinformationen auf Programmebene erlauben letztendlich neuartige bildgebende Verfahren, die hier vorgestellt werden sollen.

3.3.2.1. Channel-Imaging (Kanalbildanalyse)

Bei der Kanalbildanalyse handelt es sich um die Verwendung der in 3.3.1. beschriebenen Anwendung der Filter für bestimmte Anregungsenergien, die in den jeweiligen grünen, roten oder blauen Kanal nach Emission und Detektion am Detektor registriert und durch das Computerprogramm in Bilder der entsprechenden Farben umgerechnet und wiedergegeben werden. Hiermit kann gezielt auf die Fluoreszenzfärbung der eingesetzten Farbstoffe fokussiert und Fremdfluoreszenzen wie Autofluoreszenzen, die eine andere Färbung von beispielsweise den sekundären Inhaltsstoffen aufweist, können herausgefiltert werden. Es können auch zwei bis alle drei zur Verfügung stehende Kanäle simultan geöffnet werden, wenn Fluoreszenzmarker verschiedener Färbung eingesetzt werden sollen oder Relationen von Autofluoreszenz und Färbung für die Auswertung gebraucht werden, wie es in dieser Arbeit der Fall ist (siehe Vitalitätstests Kap. 3.3.4). Ratsam ist auch eine Kanalbildanalyse vor Einsatz der Farbstoffe, um die Autofluoreszenz des Untersuchungsobjekts und dessen Intensität vorerst erkennen zu können. Dies ist in einer Reihe von Vorversuchen auch in dieser Arbeit geschehen.

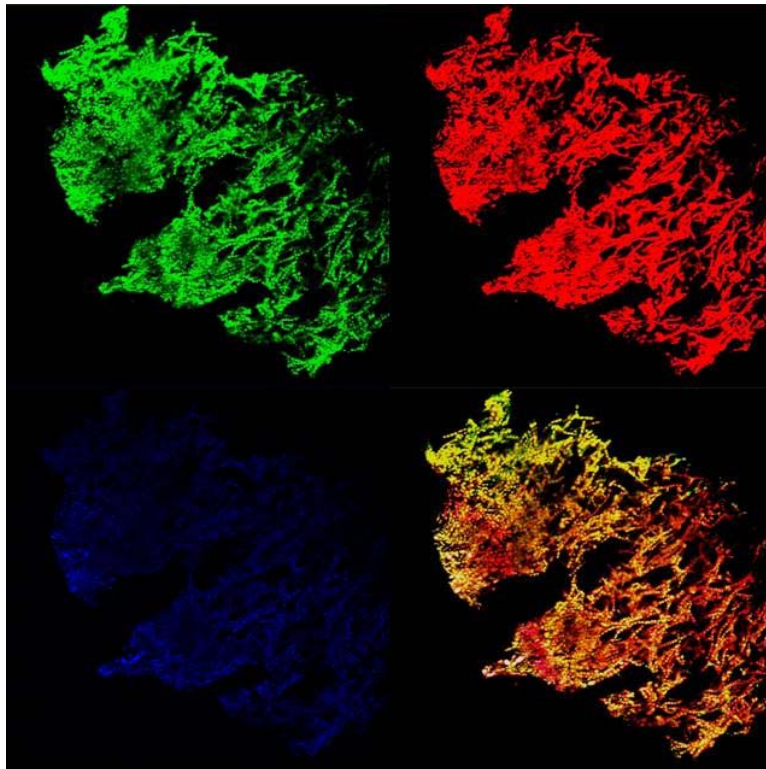


Abb. 12: Grüner, roter und blauer Kanal und die Überlagerung der Kanäle (Overlay) im unteren rechten Bild. Das abgebildete Objekt ist ein Mycel des Mycobionten von *X. elegans*.

II. Material und Methoden

3.3.2.2. Overlay-Imaging (Simultanbildanalyse)

Die Simultanbildanalyse zeigt ein Gesamtbild nach Öffnung aller Emissionskanäle (Abb. 13a). Hierbei werden zumeist alle Fluoreszenzbilder aller Bildebenen übereinander gestapelt und geben Zellen aller drei Dimensionen in einem zweidimensionalen Bild ab. Die Gesamtzahl der Zellen, wie hier beispielsweise im Flechtengewebe, im Mycel des Mycobionten oder im Photobionten-Cluster kann somit ermittelt werden. Hierzu sind jedoch auch noch einmal Vergleiche zu Durchlichtbildern und Bilder der topografischen Bildanalyse sowie der Rasterebenen des Objektes notwendig. Es können auch Einzelbilder der überlappenden Kanäle unter Ausblenden der anderen Schnittebenen eines Objektes erstellt werden. So erhält man ein Overlay-Image aller Fluoreszenzen nur einer Objektebene.

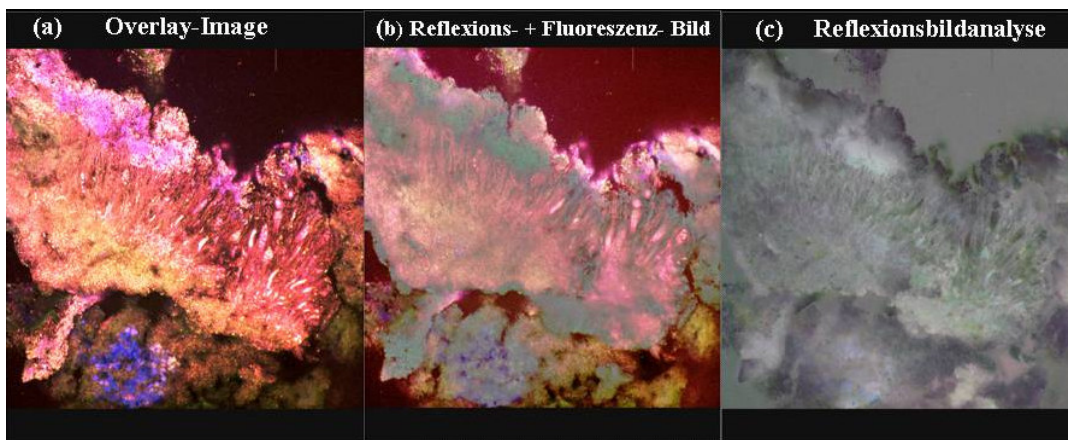


Abb. 13: Bilderserie aus den Analysen der Stoßwellenexperimente. Durch die unterschiedlichen Techniken erkennt man ebenfalls über Reflexionsanalyse die schützende Gallerte, welche die Fluoreszenzsignale diffus erscheinen lässt (b). Ist die Fluoreszenz ausgeblendet, ergibt sich ein Bild, wie in (c) abgebildet.

3.3.2.3. Reflexionsbildanalyse (Topografische Bildanalyse)

Außerhalb der Fluoreszenzanalyse können die Objekte auch topografisch über das Reflexionsverhalten der Oberflächen der Objekte erfasst werden. Die dabei entstandenen Bilder geben Aufschluss über die Dichteverteilung von Zellen und der sie umgebenden Bindematrix, wie beispielsweise die in dieser Arbeit oft erwähnte stark reflektierende Gallerte (Abb. 13c).

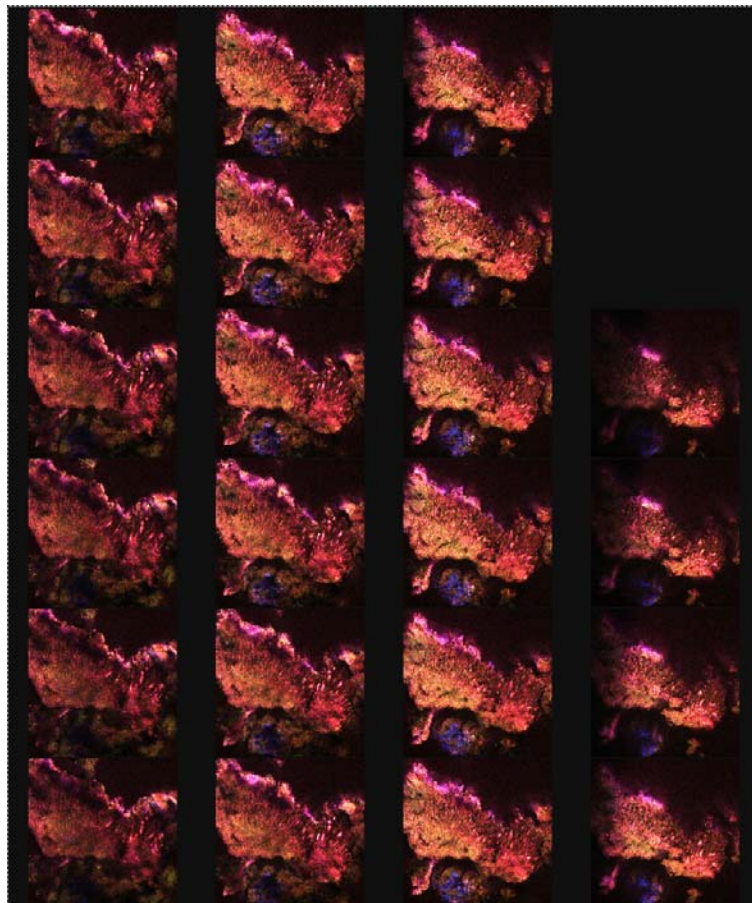
3.3.2.4. Kopplung von Reflexionsbildern und Fluoreszenzbildern

Die Kopplung der Reflexionsbilder und Fluoreszenzbilder ermöglicht in dieser Arbeit die Relation von Gallertverteilung und Gallertdichte mit dem Grad der Vitalität der Zellen, welcher durch die Fluoreszenz der eingesetzten Farbstoffe angezeigt wird, herzustellen (Abb 13 b).

3.3.2.5. Bildsequenzanalyse

Die Bildsequenzanalyse ermöglicht eine Gesamterfassung aller Zellen in jeder abgerasterten Objektebene. Es handelt sich hierbei um eine verbesserte Overlay-Image-Analyse, in der alle Fluoreszenzkanäle überlappt wiedergegeben sind, jedoch die Schnittebenen in einer Bildgalerie (Abb. 14) aufgereiht werden. Überlagerungen von versetzt liegenden Zellen werden ausgeblendet, indem bereits vor der Bildaufnahme und Bildsequenzherstellung manuell definierte Sektionsdimensionen (in μm) aller Bildebenen in das Computerprogramm eingegeben werden (Kap.3.3.4.).

Abb.14:
Verschiedene
Objektebenen der
zu untersuchenden
Probe werden
durch die
Bildsequenzwider-
gabe dargestellt.
Das Erfassen
möglichst aller
Zellen des
Flechtengewebes
mit Hilfe eines
Zählprogramms
wie Image-Tool ist
hierdurch möglich.



II. Material und Methoden

3.3.2.6. Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten / Korrelation zur Vitalität

Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten ist eine Methode, den Grad der Färbung der Zellen in dem zu untersuchenden Objekt in einem Kurvendiagramm darstellen zu können. Jeder Ort auf einer gescannten x-y-Objektebene besitzt einen bestimmten Intensitätspik und wird zweidimensional aufsummiert in einem Kurvendiagramm (Abb.15) dargestellt. Anhand von Anzahl und Höhe der Piks kann man Aussagen bezüglich der Farbstoffverteilung treffen, die bei entsprechender Berücksichtigung der Einwirkungszeit beispielsweise Aufschluss über den Zustand (in dieser Arbeit die Vitalität) der zu untersuchenden Probe gibt. Dabei ist die Höhe der Intensitätspiks weniger entscheidend als die Anzahl der Piks und die Lage der sich hierdurch ergebenen, verschiedenen Kurven zueinander (bei Photobiontenanalyse: blaue (Chlorophyll) und grüne Kurve (FUN I: vitale Cytoplasmafärbung)). Die Höhe der Piks ist deshalb nur sekundär entscheidend, da aufgrund des Ausbleichens des Farbstoffs die Maximalwerte der Intensität zeitabhängig sehr stark variieren. Somit müssen immer Mittelwerte vom Maximal- und Minimalwert der Kurven ermittelt werden, um eine Näherung des Grades der Vitalität wirklich bestimmen zu können (siehe Beispiel zu FUN I in Abb. 15).

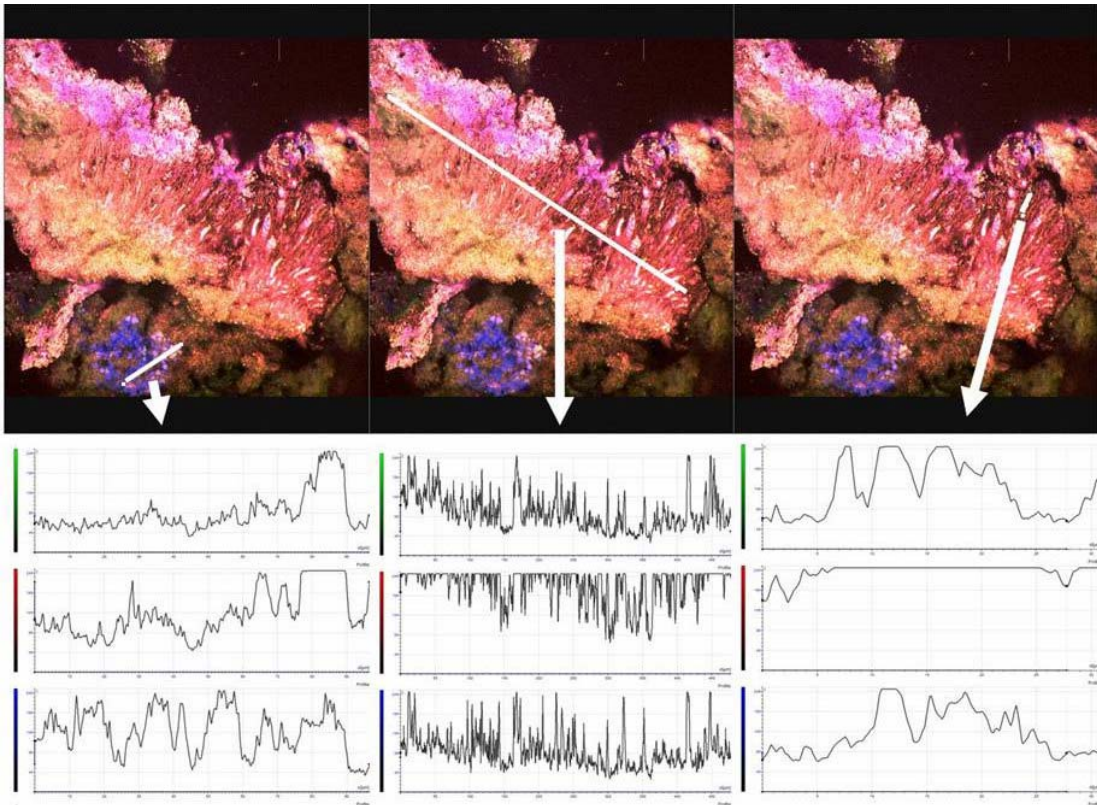


Abb. 15: Fluoreszenzanalyse über Signalquantifizierung. Starke Fun I-Signale im roten und grünen Kanal zeigen einen hohen Grad an Vitalität des untersuchten Gewebebereichs entlang der definierten Linien an.

Erste Näherungen zur Vitalität „v“ ergeben sich bereits durch die Betrachtung des Verhältnisses der Intensitätsmittelwerte, welche das Programm über die Anzahl der Gesamtpiks und die Summe der Optima und Minima der Intensitäten berechnet. Dieses Verhältnis einer ersten Näherung der Vitalität kann am Beispiel von SYTOX-green (Abb. 16 und 17 B + D) mathematisch schließlich wie folgt ausgedrückt werden:

$$v = I_b / I_g$$

wobei I_g in diesem Fall für die mittlere Intensität der grünen Fluoreszenz von SYTOX-green steht und somit den abstrahierten Wert für tote Zellen bzw. den toten Zellverband wiedergibt und I_b für die mittlere Intensität und somit dem abstrahierten Wert der blauen Autofluoreszenz des Chlorophylls aller vitalen ungefärbten Algen steht, so dass dann gilt:

$$\text{wenn } v = I_b / I_g > 1,$$

d.h. $v > 1$, dann ist das erwartete Ergebnis $v > 50 \%$;

$$\text{wenn } v = I_b / I_g \leq 1,$$

d.h. $v \leq 1$ ist, dann ist das erwartete Ergebnis $v \leq 50 \%$.

Ausformuliert bedeutet dies: ist der mittlere Wert von I_b größer als der von I_g , so nimmt die genäherte Vitalität v einen Wert größer 1 an und es kann die Aussage getroffen werden, dass in diesem Fall die Vitalität V der Probe in jedem Fall größer 50 % beträgt. Ist der Wert I_b jedoch kleiner oder gleichwertig wie I_g , so nimmt v einen Wert kleiner oder gleich 1 an und deutet ein Ergebnis kleiner oder gleich 50 % für die Vitalität V der untersuchten Probe an.

Setzt man die Mittelwerte der Intensitäten, wie sie in der Tabelle der Abb. 16 angegeben sind, in die Formel ein, so ergibt sich für eine halbstündige Vakuumexposition der Photobionten von *F. bracteata* ein Wert $V = 2.21$ und somit eine Vitalität für die untersuchten Zellverbände von mehr als 50 %. Für eine vierstündige Vakuumexposition der Photobiontenzellen und – Cluster kann man einen Wert $V = 0.27$ ermitteln, so dass V in jedem Fall kleiner 50 % ist.

Die hier getroffenen Aussagen können verifiziert werden, wenn man die genauen Werte des Zählprogramms Image-Tool und die hier noch im folgenden beschriebenen Fluoreszenzpikanalysen hinzuzieht und mit den dabei ermittelten prozentualen tatsächlichen Werten vergleicht.

II. Material und Methoden

Mit Hilfe von Image-Tool ermittelt man optisch die Anzahl toter Zellen N_d und lebender Zellen N_v . Das Verhältnis toter, grün gefärbter Zellen zur Gesamtzahl aller in der Probe befindlichen Zellen (Summe aus N_d und N_v) zeigt jedoch nicht den Wert für die Vitalität, sondern für den Anteil abgestorbener Zellen. Setzt man für den Grad der Vitalität V den Wert 1 (auch 100 %) und subtrahiert den Anteil abgestorbener Zellen davon, so erhält man den wahren Wert für die Vitalität. Dies ist in folgender Formel ausgedrückt:

$$\text{I.) } V = 1 - \left\{ \frac{N_d}{N_v + N_d} \right\}$$

Um zu zeigen, dass die absoluten, weil durch Zählung ermittelten Werte auch in Relation zu den Werteverhältnissen der Fluoreszenzprofile stehen und man mit Hilfe der Fluoreszenzprofilanalyse mindestens genauso gute Aussagen über die Vitalität treffen kann und somit aufwendiges Zählen vermeiden kann, wird hier das Proportionalitätsgesetz angewendet. Das Verhältnis der Anzahl toter Zellen zur Gesamtzahl aller Zellen wird hier in Relation zu dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten gesetzt. Das Intensitätsverhältnis drückt sich dabei durch die Summe aller grünen Intensitätspiks Σ_g zur Summe aller Intensitätspiks - der grünen, sowie der blauen Fluoreszenz - $\Sigma_g + \Sigma_b$ aus:

$$\text{II.) } \frac{N_d}{N_v + N_d} = \frac{\Sigma_g}{\Sigma_b + \Sigma_g}$$

Setzt man II.) in I.) ein, so erhält man:

$$\text{III.) } V = 1 - \left\{ \frac{\Sigma_g}{\Sigma_b + \Sigma_g} \right\}$$

Nun kann man die Werte für 30 min und 4 h Exposition aus der Tabelle in Abb. 16 in III.) einsetzen und erhält:

$$\begin{aligned} \text{Für 30 min: } V &= 1 - \left\{ \frac{113659}{427078 + 113659} \right\} = 1 - 0.21 = \mathbf{0.79} \text{ d.h. 79 \% vital!} \\ \text{Für 4 h: } V &= 1 - \left\{ \frac{184828}{83659 + 184828} \right\} = 1 - 0.69 = \mathbf{0.31} \text{ d.h. 31 \% vital!} \end{aligned}$$

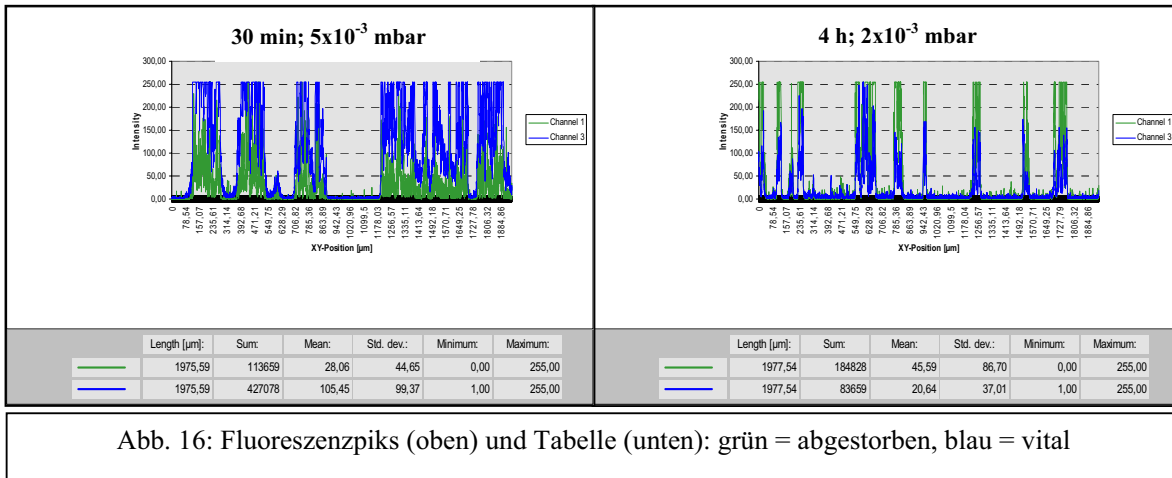
Damit wird auch die mathematische Herleitung für die Näherung v bestätigt, in der bereits die Aussage getroffen wurde, dass nach einer halben Stunde Exposition die Vitalität über 50 % und nach vier Stunden Exposition unter 50 % liegt.

Setzt man nun auch noch die gezählten Werte aus Abb. 17 B + 17 D) in die Gleichung I.) ein, so erhält man:

$$\begin{aligned} \text{Für 30 min: } V &= 1 - \left\{ \frac{346}{1177 + 346} \right\} = 1 - 0.23 = \mathbf{0.77} = 77 \% \text{ vital !} \\ \text{Für 1 h : } V &= 1 - \left\{ \frac{578}{220 + 578} \right\} = 1 - 0.72 = \mathbf{0.28} = 28 \% \text{ vital !} \end{aligned}$$

Es ist unschwer erkennbar, dass die Fluoreszenzintensitätsanalyse von der manuellen Quantifizierung der Zellen bei der Bildanalyse über Image-Tool nur um 2 bis 3 % abweicht. Da die Standardabweichung bedingt durch Zählfehler meist dieselben prozentualen Abweichungen aufzeigt, kann man davon ausgehen, dass die Daten aus den Diagrammen und Tabellen von den Fluoreszenzintensitäten äußerst genau sind und die tatsächlichen Werte widerspiegeln. Somit wurden diese Daten für die Auswertung ebenfalls verwendet. Abschließend ist es wichtig zu erwähnen, dass die Methode trotz Dämpfung der Fluoreszenz durch die Gallerte, nachdem ein Vergleich der Diagramme mit den Bildern erfolgt war, anwendbar ist. Die Dämpfung wirkt sich verhältnismäßig auf alle Fluoreszenzen aus. Außerdem war sehr selten eine zu geringe Signalstärke unter der Gallerte vorhanden, da das Programm abhängig von der Aufnahmetechnik den Effekt der Gallerte subtrahieren konnte. Häufig wiesen dadurch die Intensitätspiks der Fluoreszenz an Orten mit starker Gallertpräsenz ebenfalls die Maximalwerte auf, die denen der Fluoreszenzen in Bereichen geringer oder gar keiner Gallertummantelung der Zellen ähnelten und detektieren konnte.

II. Material und Methoden



Aufsummierung der Fluoreszenzintensitäten in Contour-Images

Die Intensitätsstärken der Fluoreszenz und somit der Vitalität können auch flächig in einem zweidimensionalen Bild wiedergegeben werden, so dass im Falle der

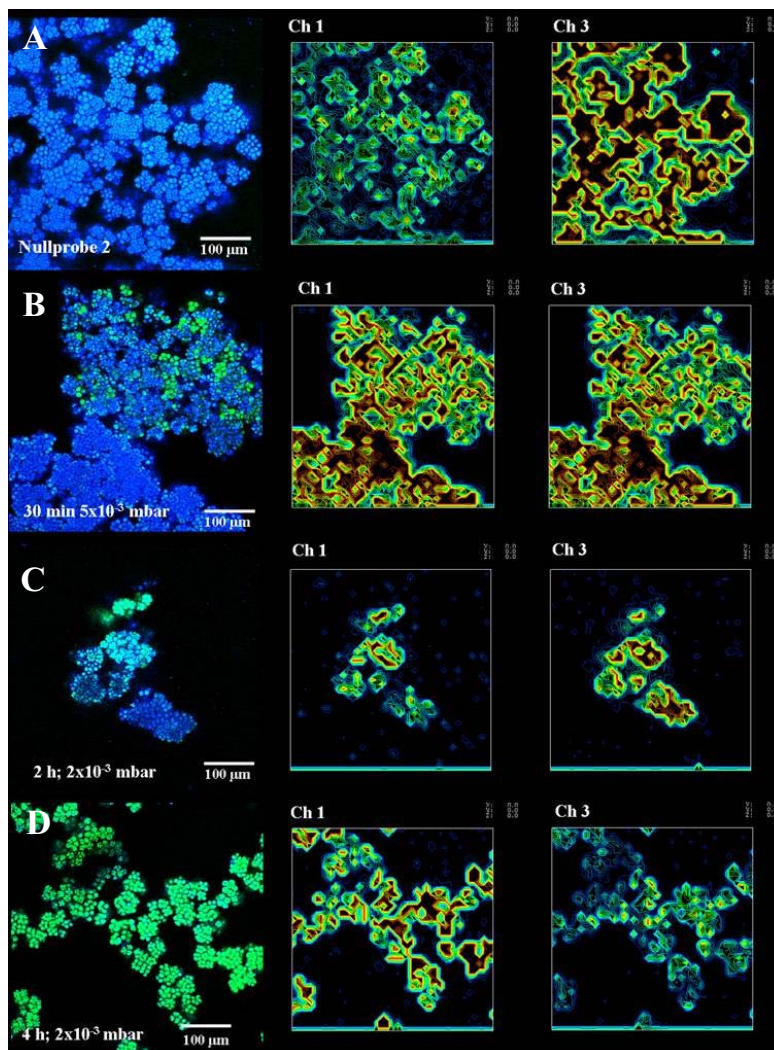


Abb. 17A-D: Fluoreszenzbilder von Photobionten der Flechte *F. bracteata*. A) Kontrolle; B)-D) dem Vakuum exponierte Photobionten. Mit zunehmendem Vakuum nimmt die Zahl der vitalen, blau gefärbten Zellen ab. Dies äußert sich auch durch Farbverschiebungen in der Falschfarbenanalyse, wo die Anzahl der intensiv rot gefärbten Areale im blauen Kanal (Ch3) mit zunehmendem Vakuum abnimmt und im grünen Kanal (Ch1) zunimmt. Aus dem Verhältnis der verschiedenfarbigen Areale zueinander kann ebenfalls auf den Grad der Vitalität geschlossen werden.

Vitalitätstests beispielsweise durch den Einsatz von SYTOX-green mit Hilfe von Falschfarben die stärkste Fluoreszenz und somit niedrigste Vitalität durch die rote Färbung gekennzeichnet ist und Bereiche höchster Vitalität eine blaue Färbung aufweisen (Abb. 17 A - D). Alle Flächen, die ab einer intensiven Grünfärbung über gelb nach rot aufleuchten, zählen zum nicht vitalen Bereich, wobei Grün den Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten zeigt. Die Relation von nicht vitalen zu vitalen Flächen ergaben letztendlich auch den Grad der Vitalität des Gewebes in Prozent an.

3.3.3. Ausgewählte Fluoreszenzfarbstoffe

Nach intensiver Recherche und Beratung mit Experten der Fluoreszenzfarbstoff-Produzenten (Molecular Probes, Haugland 2002), kamen besonders zwei Farbstoffe unter einer großen Anzahl weiterer Farbstoffe für die Vitalitäts- und Überlebensfähigkeitsanalyse des 3-Komponentensystems von Alge, Pilz und Flechte in Frage: FUN I und SYTOX-green.

3.3.3.1. FUN I

Fun I kommt aufgrund seiner Anwendung bei LIVE/DEAD-Tests von Hefen und Pilzen (Haugland 2002) insbesondere für Vitalitätstests des lichenisierten und nicht lichenisierten, isolierten Mycobionten der Flechte in Frage. Die Substanz kam bereits in anderen Untersuchungen wie z.B. bei der Erforschung der Antifungalwirkungen von Fungizide auf *Candida*-Arten zum Einsatz (Kretschmar et al. 1996). Die LIVE/DEAD-Färbesubstanz FUN I markiert vitale und physiologisch aktive Zellen. Intravacuoläre Strukturen werden durch eine rötliche Fluoreszenzfärbung und das Cytoplasma durch eine intensive grüne bis gelbliche Fluoreszenzfärbung markiert. Fortschreitende physiologische Aktivität über einen Zeitraum von wenigen Minuten bewirkt gleichfalls eine rötliche Färbung und nach einer Einwirkungszeit von einer Stunde sind alle vitalen Zellen ebenfalls durch eine rötliche Färbung markiert. Abgestorbene Zellen bleiben diffus gelb-grün gefärbt.

3.3.3.2. SYTOX-green

SYTOX-green markiert die DNA von geschädigten bis abgestorbenen Zellen. Dies wird durch eine grüne Fluoreszenzfärbung der betreffenden Zellen sichtbar. Insbesondere bei höheren Konzentrationen der Fluoreszenzlösung ist die geschädigte Zelle vollständig intensiv grün gefärbt. Die Substanz ist bisher von Vitalitätschecks an gram⁺, gram⁻-Bakterien, für die

II. Material und Methoden

Markierung von Viruspartikeln sowie Analysen von fixierten Zellen und Geweben (Haugland 2002) bekannt. Letzteres, sowie die Fähigkeit des Farbstoffs sowohl Prokaryonten als auch Eukaryonten und zudem höhere Organisationsformen, wie heterogene Gewebe markieren zu können, waren ausschlaggebend für die Verwendung dieser Substanz in meiner Arbeit, denn das Geflecht von Hyphen und Algen in Flechten kommt einem Gewebe am nächsten.

3.3.4. Vitalitätstests

Mit Hilfe der oben erwähnten Fluoreszenzfarbstoffe wurden Vitalitätstests bezüglich Untersuchungen über den Zustand physiologischer Aktivität und dem Zustand der Zell- sowie Kernmembran der Zellen durchgeführt. Zellen mit intakten Zellmembranen und normalem Stoffwechsel werden, wie bereits in 3.3.3 beschrieben, bei Einsatz von FUN I gefärbt und als vital klassifiziert, während nach UV-induzierten Apoptoseprozessen mit autolytischen Reaktionen und geringer Intaktheit der Kernmembran der Farbstoff SYTOX-green in der Lage ist, die betreffenden Membranen abgestorbener Zellen zu penetrieren und damit an die DNA binden und färben kann. Für auswertbare Bilder mit erkennbaren Fluoreszenzsignalen musste zunächst in Kontrollexperimenten die Intensität der Autofluoreszenz geklärt werden, welche von der Gesamtfluoreszenz subtrahiert wurde, und das Mischungsverhältnis des Lösungsmittels DMSO mit der jeweilig einzusetzenden Färbesubstanz ermittelt werden. Um die Konzentration der FUN I oder SYTOX-green/DMSO-Lösung herauszufinden, wurden mit beiden Substanzen Verdünnungsreihen hergestellt und an UV-behandelten sowie unbehandelten Flechten, Mycobionten sowie Photobionten getestet. Dabei ergaben sich nach Hinzufügen der Lösungen der Verdünnungsreihe zu den in einem Wassertropfen eingebetteten Proben eindeutig erkennbare Fluoreszenz-Signale von FUN I bei einer Molarität der Lösung von 15 μM und bei SYTOX-green in einer Lösung von 5 μM . Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen dienten in dieser Arbeit Mikrotomschnitte von Flechten und Mycobionten mit 120 μm Dicke und Photobiontenzellen sowie -Cluster im ungeschnittenen Zustand. Schnitte der Photobiontencluster waren nicht notwendig, da sie sehr leicht auf den Kulturfiltern mit Hilfe des CLSM aufgrund ihrer geringen Größe, die im Falle von Clusterbildung selten mehr als 150 μm überstieg, gescannt werden konnten. Die Mycobiontenmycelien wurden meist wenige Millimeter bis zu einige Zentimeter groß. Aus diesem Grunde mussten Mikrotomschnitte wie bei den Flechtenthalli angefertigt werden. Von den Serienschnitten zu jeweils 120 μm wurden für die Auswertung der Vitalitätstests nur die Zentralbereiche von 30 μm verwendet, da diese Regionen keine vom Mikrotommesser

beschädigten Zellen beinhalteten, so dass wirklich nur die durch Strahlung geschädigten Zellen in die Auswertung aufgenommen werden konnten. Meistens erfolgte alle 2 bis 3 μm ein CLSM-Scan, so dass dabei 10 bis 15 Bilder pro Objekt entstanden. Die Dimensionsgröße der Scanabstände wurde manuell vor der jeweiligen Bilderstellung definiert.

3.4. Verwendung von Image-Tool als Zählprogramm und zur statistischen Auswertung

Bei Image-Tool handelt es sich um eine über das Internet erhältliche Software, die eine Zellzählfunktion sowie Funktionen der Ausmessung von Linien und Flächen besitzt. Diese Möglichkeit erleichtert das Zählen von vitalen und nicht vitalen Zellen bzw. gekeimten und nicht gekeimten Sporen. Die Fehler von möglicherweise wiederholt gezählten Zellen, wie sie bei der klassischen Zählmethode über Rasterzählungen häufig auftraten, sind hierdurch ausgeschlossen. Man kann in diesem Sinne von einer Ermittlung absoluter Werte sprechen. Die integrale Ausmessung von Flächen hingegen gibt als Kontrollauswertung eher relative Werte der Vitalität an und fand insbesondere seine Anwendung bei der Auswertung der Countour-Images (siehe Kap. 3.3.). Aufsummierte Fluoreszenzintensitäten, die fluoreszierende Bereiche in den Proben zweidimensional als Fläche wiedergaben, konnten somit ausgemessen und in Relation zu der Gesamtfläche einer Probe gestellt werden. Die Messfehler lagen bei der zuletzt genannten Methode jedoch nur bei 0,1 – 0,3 %.

3.5. UV-Schäden an der DNA der Flechte *Xanthoria elegans* und ihrer Bionten über die Detektion von Photoprodukten mit Hilfe der HPLC (am C.E.N.G. in Grenoble)

Die hier beschriebene Methode wurde zur Analyse der extrahierten DNA der nach UV-Bestrahlung ausgesetzten Flechtenthalli von *X. elegans*, der bestrahlten Mycelien ihrer Mycobionten und ihrer Photobiontenzellen sowie deren Cluster angewendet. Ermittelt werden DNA-Photoprodukte, wie sie bei der Absorption von UV-Photonen entstehen. Es handelt sich bei den Photoprodukten vor allem um Pyrimidindimere und -Cyclodimere (TT, TC, CT und CC). Bisher ist diese Methode nur bei Prokaryonten, d.h. Bakterien und Archaea angewendet worden und wird somit in meiner Arbeit zum ersten Mal auf ein eukaryotisches Symbiose-System getestet. Es soll durch diese Untersuchungen festgestellt werden, wie weit die zumeist UV-sensitive DNA nun bei Flechten und ihren Bionten geschädigt wird und infolge ihrer Schädigung die charakteristischen Photoprodukte ausbildet. Es könnten dadurch möglicherweise wichtige Gene für den Stoffwechsel der Zelle beeinträchtigt werden oder

II. Material und Methoden

vollständig ausfallen. Bei der Auswertung und Schlussfolgerung dieser Versuchsreihe wird auf die Tatsache der Unvollständigkeit der Analyse bzgl. Detektion möglicher anderer UV-Schäden hingewiesen, da diese Methode sich nicht gleichfalls auf die Detektion von Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche oder UV-bedingte anders geartete Mutationen konzentriert. Es können nur Aussagen über die Häufigkeit der Schäden durch Ausbildung der DNA-Photoprodukte von Pyrimidindimeren und -Cyclodimeren getroffen werden und damit auf die mögliche Häufigkeit anderer Schäden hingewiesen werden. Die oben beschriebenen, verschiedenen Photoproduktarten können über die HPLC detektiert werden. Die Analyse der Photoprodukte in der DNA UV-bestrahlter Zellen erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. Thierry Douki vom Laboratoire des Acides Nucléiques, Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée, Services d' Études de Systèmes et des Architectures Moléculaires, C.E.N.G. in Grenoble, Frankreich. Die Analyse der getrockneten DNA-Isolate (siehe Kap. 3.5.1.) wurde mit Hilfe eines Hochdruckflüssigkeit-Chromatographen (**H**igh **P**ressure **L**iquid **C**hromatograph) gekoppelt an einem Tandem-Massenspektrometer (HPLC-MS/MS) durchgeführt (Douki et al. 2000a, 2000b, Douki & Cadet 2001 / Abb. 18).



Abb. 18 : HPLC-Tandem-Quadrupolar-Massenspektrometer (C.E.N.G.)

3.5.1. DNA-Extraktion

Um die durch UV-Strahlen mit definierten Wellenlängenbereiche induzierten UV-Photoprodukte in der DNA der Flechten, Mycobionten und Photobionten bestimmen zu können, war es nach der Bestrahlung notwendig, die DNA aus den Zellen zu extrahieren.

Die UV-bestrahlten Flechten und Bionten wurden über ein Ultrazerkleiner mit Hilfe von Glasperlen und bei den Wiederholungsgängen zwecks Optimierung mit Wolframkugeln

zermörsert, um möglichst viele Zellen mechanisch aufschließen zu können. Das zerkleinerte Material wurde anschließend in einem 300 µl Lysis-Puffer (Inaktivierungspuffer) suspendiert, um den Metabolismus zu blockieren. Da der Zellpuffer bei – 80° C aufbewahrt wurde, musste er zunächst aufgetaut werden. Der Puffer bewirkt aufgrund tropfenweiser Zugabe von ebenfalls 300 µl Lysozym das Auflösen der Zellwände und somit einer exocytotische Aufnahme von Natriumchlorid (NaCl) und EDTA, wobei besonders die Substanz von EDTA als komplexbildendes Agens für das Lysozym als Katalysator fungiert als auch die störenden Stoffwechselprodukte abfängt und somit den Zellmetabolismus inhibiert. Das Puffer-Zellgemisch wurde anschließend für 10 Minuten bei 37° C inkubiert und Proben die zwischenzeitlich noch nicht direkt für die nachfolgenden Schritte der Extraktion bearbeitet werden konnten, wurden vorerst wieder auf Eis gelagert. Nach der zehnmütigen Inkubation der Proben mit Lysozym/Puffer folgte ein zweiter fünfminütiger Inkubationsschritt nach Zugabe von 300 µl 20 %iger (w/v) SDS. SDS steht für Sodium-Dodecyl-Sulfat und ist entscheidend für die Denaturierung der Proteine und somit gezielt auch für das Befreien der an der DNA gebundenen Proteinkomplexe und das Auswaschen bzw. Fällen der Proteine notwendig. 1 ml Phenol (77607 Sigma Aldrich Fluka) wurde zu dieser in einem Matrix-Tube B blue befindlicher Lösung hinzugegeben und für 30 sec. mit der Hand geschüttelt. Weitere 45 sec wurde in einem Schüttler (Ribolyzer, FAST-PREP FP 120) mit einer Frequenz von 6.5 m/s geschüttelt bevor die Lösung für 5 min mit 10000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wird in ein weiteres 2 ml Eppendorfgefäß zusammen mit 1 ml Phenol/Chloroform (1:1)-Lösung gegeben. Der hier gebildete Überstand in Chloroform wird wiederum mit einer 0.8 ml Chloroform/Isoamyl-Alkohol-Lösung (24:1) versetzt. Nach Zugabe von 100 µl gesättigten NH₄Oac-Lösung und 0.8 ml Ethanol (ETOH) fand die DNA-Fällung statt. Der Überstand wurde abpipettiert und mit weiteren 0.75 ml ETOH gewaschen. Diese Suspension wurde 15 min in einer Zentrifuge mit einer Umdrehung von 14500 rpm zentrifugiert und der DNA-Pellet vom Überstand befreit sowie luftgetrocknet. Bis zum Transport für die weitere Analyse in Grenoble wurden die DNA-Pellets bei +4° C im Kühlschrank zwischengelagert.

3.5.2. DNA-Hydrolyse

Die Photoprodukt-Analyse beginnt mit einer schonenden Hydrolyse der DNA. Hierzu werden die jeweiligen luftgetrockneten DNA-Proben in 50 µl H₂O gelöst und mit jeweils 1 µl Phosphodiesterase II (0,004 U) sowie 2.5 U Nuclease P I, die in 2.5 µl Nuclease P 1-Puffer

II. Material und Methoden

gelöst worden waren und mit 2.5 µl HPLC-Puffer versetzt. Die so hergestellte Lösung wird etwa 10 s mit Hilfe eines Vortex-Gerätes stark gemischt und anschließend 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit wird nach einer Stunde Inkubation abermals kräftig gemischt, um eine gleichmäßige Hydrolyse zu erreichen. Anschließend fügt man jeweils den Proben einen weiteren Enzym-Cocktail bestehend aus 0.25 µl 0.003 U Phosphodiesterase I und 0.1 µl 2 U alkalische Phosphatase in 6 µl PA-Puffer hinzu. Das so bestehende Enzym-Cocktail/Proben/Puffer-Gemisch wird abermals 10 s durchmischt und weitere 2 h bei 37 °C inkubiert.

Hiernach gibt man zu jeder Probe 4 µl 1N HCL, 160 µl Aqua millipore und 30 µl Chloroform hinzu. Die Lösung wird kräftig gemischt und 5 min bei 10000xg zentrifugiert (SIGMA 3K 18, Bioblock Scientific). Damit erreicht man eine Phasentrennung, wobei sich in der wässrigen Phase die Hydrolyseprodukte (Nukleotide) befinden und in der organischen Chloroform-Phase die präzipitierten noch verbliebenen Proteine überführt worden sind. Unter äußerster Sorgfalt wird die wässrige Phase in ein frisches HPLC-Injektionsgefäß (Kurzgewindeflasche von Greiner, 32 x 11.6 mm) überführt.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Nukleotide zur schonenderen Dehydrierung zuerst bei -80°C ca. 20 Minuten eingefroren und anschließend über Nacht unter Vakuum gefriergetrocknet werden (SC Christ Alpha 1-2, Bioblock Scientific, Frankreich).

3.5.3. HPLC-MS/MS Analyse

Bei den hier verwendeten HPLC-Apparaturen (Abb. 18 + 19) handelt es sich um ein System des Laboratoire des Acides Nucléiques. Es setzt sich aus einem Agilent 1100 Serien-Chromatographen und einer Hitachi-Merck Pumpe (Merck, Darmstadt, Deutschland), welche mit einer automatischen SIL-9-Injektionseinheit (Shimadzu, Tokyo, Japan) verbunden ist. Bei der dazugehörenden Säule handelt es sich um eine Uptisphere ODB Octadecylsilyl-Silicagel Säule (Dimension: 150 x 2mm mit einer Partikelgröße von 5 µm, Interchim, Montlucon, Frankreich). Ein in das HPLC-System integrierter UV-Detektor misst die Absorption der Probe (Abb. 19). Dabei wird Absorption sowohl bei 260 nm als auch bei 280 nm gemessen. Die Messung bei 280 nm macht eine Aussage über den Grad der Verunreinigung durch nicht vollständig ausgewaschene Proteine oder noch in der Lösung befindliches Phenol. Nach der Aufreinigung liegt der Quotient A_{260}/A_{280} für DNA bei 1.8 und für RNA bei 2.0. Aufgrund dieses spezifischen Absorptionsverhaltens kann man somit den jeweiligen Anteil an RNA und DNA-Bestandteilen qualitativ und quantitativ bestimmen. Hieraus ermittelt sich ein

Korrekturquotient (Quotient: RNA-Menge, Dividend: DNA-Menge), der jeder Probe zugeordnet werden kann und bei der Auswertung berücksichtigt werden muss. Nach Aussagen der Experten vor Ort ist selbst bei einem Verhältnis von RNA zu DNA von 50:50 noch eine eindeutige Analyse möglich (de la Vega 2004, Douki 2005).

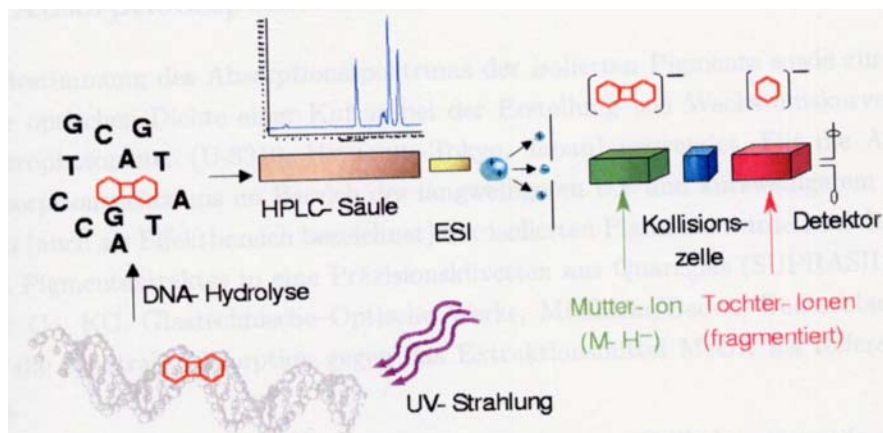


Abb. 19: Aufbau des HPLC-Tandem-Quadrupolar-Massenspektrometers, sowie die Eingliederung des Geräts in den gesamten Analyseprozess der UV-induzierten DNA-Photoschäden (Schema: Douki, de la Vega 2004)

Nachdem die Probe durch das HPLC-System geschickt wurde, überführt man sie in ein Tandem-Quadrupolar-Massenspektrometer (API 3000 Massenspektrometer, Perkin-Elmer/SCIEX, Thornhill, Canada). Der Übergangsbereich vom HPLC-System zur Tandem-Quadrupolar-Massenspektrometrie (Tandem-MS/MS) befindet sich unter Vakuum. In dieser Elektronenspray-Ionisierungseinheit bewirkt man durch zugeführte Hochspannung von bis zu 8 keV einen Zerfall der aus dem HPLC-Gerät kommenden Moleküle (Repulsion, Abb. 20), so

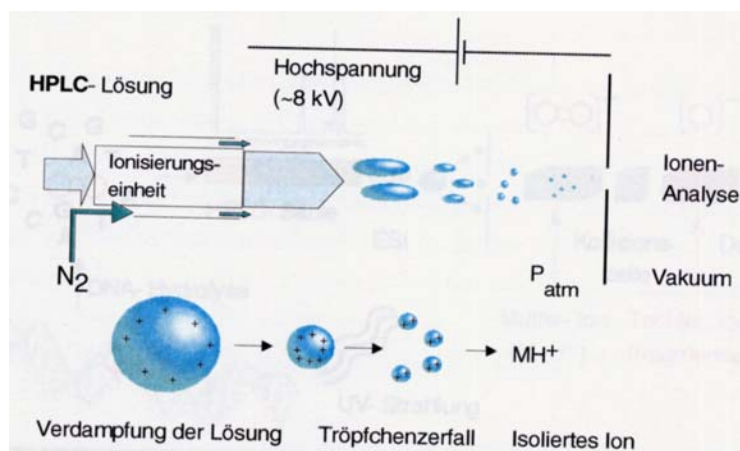


Abb. 20: Im Übergangsbereich vom HPLC-System zum Tandem-Quadrupolar-Massenspektrometer findet die Elektronenspray-Ionisierung (ESI) statt (Schema: de la Vega 2004).

II. Material und Methoden

dass nur noch Ionen übrig bleiben (gleichzeitig ablaufende Desolvatisierung und Ionisierung), die schließlich in das Tandem-MS/MS gelangen. Im API 3000 Tandem-MS/MS sind drei hintereinander angeordnete Quadrupolar-Massenspektrometer (Abb. 19). Das erste MS kann als Ionen-Filter bezeichnet werden, der nur die Ionen sammelt, die dem gesuchten Fragmentierungsmuster entsprechen, welches durch die Standardproben vorgegeben ist. Das zweite MS, wo die Kollisionszelle unter Argon-Druck steht, fragmentiert die vom ersten MS selektierten Ionen. Das dritte MS entspricht einem Analysegerät, das nur die relevanten Informationen erfasst, nämlich die hauptsächlich auftretenden Tochter-Ionen des Zielmoleküls detektiert. Diese Methode ermöglicht eine hochspezifische und hochempfindliche Analyse der induzierten Photoprodukte, sowie eine präzise Quantifizierung des Verteilungsmusters der Photoprodukte bei UV-Bestrahlung von sowohl isolierter wie auch von zellulärer DNA. Diese vollautomatische Analyse bedarf jedoch vor Inbetriebnahme einiger vorbereitender Schritte. Es müssen einige Parameter dem Analyseprogramm vorgegeben werden. Zum Beispiel müssen die Partikelgröße der HPLC-Säule, der Massenspektrometer-Modus (entweder negativ oder positiv, je nachdem welche Ladung bei den zu analysierenden Fragmenten dominiert) – in diesem Fall war er negativ (Douki et al. 2000, Douki et al. 2002) sowie die Flussrate (0.2 ml/min) angegeben werden. Für die Equilibrierung des Systems und Kalibrierung der Spektren wurden jeweils Standardproben aller zu erwartenden Photoprodukte in den Konzentrationen 0.1 μM , 0.05 μM sowie 0.025 μM mitgeführt. Bei den mitgeführten Standardproben handelte es sich um (6-4)-Photoprodukte, die Dewar-Valenzisomere sowie die trans-, syn-Cyclobutanpyrimidindimere

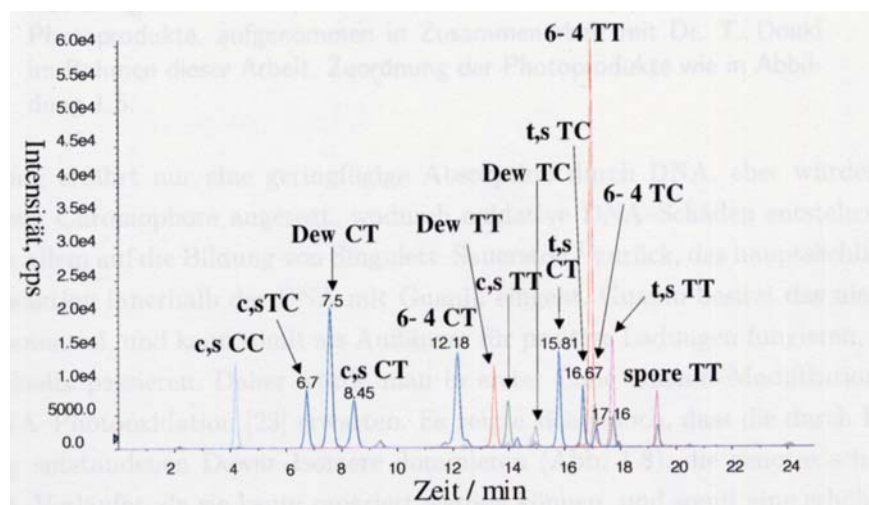


Abb. 21: Massenspektrometrie der Standard-Photoprodukte, aufgenommen von Dr. T. Douki (de la Vega 2004).

(CPDs) mit den Sequenzen CT, TC, TT und die cis-, syn-CPDs mit CC-, CT-, TC- und TT-Sequenzen. Weiterhin wurde ergänzend eine Standardprobe des TT-Sporenphotoprodukts und von Deoxy-Guanidin mitgeführt (Massenspektren der Standardproben siehe Abb. 21). Um eine möglichst genaue Equilibrierung des Systems durchweg aufrecht zu erhalten und zu garantieren, wurden zu Beginn der Analysereihe sowie in definierten Abständen (bei 20 Analyseproben ca. dreimal) die genannten Standardproben wiederholt in das HPLC-System injiziert.

Die gefriergetrockneten Analyse-Proben mit der DNA bestrahlter Zellen (s. Kapitel 3.5.2.) wurden in 30 µl HPLC-Puffer gelöst. Die Kurzgewindeflaschen wurden geordnet in den HPLC-Probenträger gestellt, und von den jeweils 30 µl wurden 20 µl für die Analyse injiziert. Die Injektionseinheit –bestehend aus einer Injektionsnadel und einem Teflongehäuse– wird dabei nach jedem Analysedurchlauf mit Aqua millipore gründlich gespült und unter Hochdruck getrocknet. Das Gehäuse, welches das Tandem-MS/MS umschließt, wird zweimal jährlich gereinigt. Dies ist ausreichend, da die Apparatur bereits Vorrichtungen besitzt, um eine Verschmutzung dieses Teils zu vermeiden. Beispielsweise bewirkt die zusätzliche N₂-Zufuhr, die sich vor dem Tandem-MS/MS befindet und in Richtung des HPLC-Systems gerichtet ist (Abb. 20), dass Salzurückstände gar nicht erst in das MS-System eindringen und sich festsetzen können.

3.6. Molekularbiologische Analyse der Photobionten

Für die Charakterisierung des Photobionten von *Xanthoria elegans* werden die Intertransskriptiven Spacer ITS 1 und ITS 2 rDNA Regionen analysiert.

Dazu wurde die Flüssigkultur der Photobionten zentrifugiert und aus den luftgetrockneten Pellets erfolgte die DNA-Extraktion. Die DNA-Extraktion, die anschließende Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) und Aufreinigung der Produkte erfolgte strikt nach den Rezepturen und Versuchsschritten, wie sie in Schaper (2003b) beschrieben sind und basieren ebenfalls auf die Methodik anderer Forschungsgruppen (Helms et al.2001, Friedl 1996, Friedl & Rokitta 1997). Eine Charakterisierung der Photobionten von *Fulgensia bracteata* ist bereits in Schaper 2003a und 2003b erfolgt. Die in dieser Untersuchung ermittelte Sequenz wird mit der Sequenz des Photobionten von *X. elegans* verglichen.

II. Material und Methoden

3.6.1. DNA-Sequenzierung und Auswertung

Die Sequenzierung der amplifizierten PCR-Produkte wurde nach dem Prinzip des „Cycle sequencing“, dem Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger unter Verwendung von fluoreszierenden Didesoxynucleotiden als Terminatoren (Big Dyes und Rhodamin Farbstoffe) durchgeführt. Die anschließende Analyse der Sequenzreaktion erfolgte auf einem ABI Prism 377TM (Gelelektrophorese) oder ABI Prism 3100 (Kapillarelektrophorese) von Applied Biosystems. Sequenziert wurden in der Regel beide DNA-Stränge.

Die resultierenden ITS rDNA Sequenzen wurden manuell mit Bioedit oder AlignIR angeordnet und mit bereits vorhandenen Photobionten Sequenzen von *F. bracteata* der Gattung *Trebouxia spec.* aus *Buellia elegans*, Clade I, 2. Untergruppe verglichen. Für die Datenanalyse wurde für die Gattung *Trebouxia* die nach Friedl et al. (2000) und Helms et al. (2001) vorgenommene Einordnung der Clades zu Grunde gelegt.

3.7. Präparation der Gabbroplättchen für die Impactversuche

50 µm-Schnitt der Flechte *Xanthoria elegans* wurden mit Hilfe des in Kapitel 3.1.5 beschriebenen Mikrotoms angefertigt und unter Vermeidung von größeren Zwischenräumen zwischen den Schnitten flächendeckend auf die Gabbroplättchen überführt.

Die so entstandene Flechtendecke wurde von einem zweiten Gabbroplättchen bedeckt, so dass ein artifiziell endolithisches System entstand. Der Zweck dieser Präparation ist, möglichst identische Effekte auf die Flechte der durch die Simulation auftretenden Parameter zu erreichen, welche gleichfalls bei den ebenso präparierten Bakterien einwirken. Damit wäre eine annähernde Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben, wobei jedoch die Flechte immer noch ein vielschichtiges Geflecht ist, während die Bakterien teils auch als Monolayer vorliegen. Zur Auswertung nach dem Impaktexperiment wurde das Gabbroplättchen wie in Abb. 22 zu sehen in Ringe mit jeweils 0.25 cm aufgeteilt, um eventuell Unterschiede der geschockten Proben im Hinblick auf Rand- und Zentralbereiche untersuchen zu können.

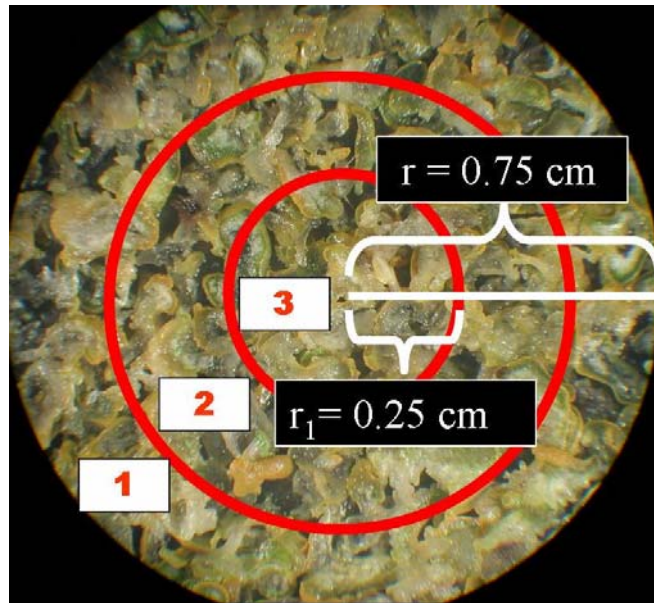


Abb. 22: Aufteilung des mit Flechtenproben bestückten Gabbros in drei Ringbereiche zwecks Analyse der Schockwelleneffekte in Abhängigkeit von Ort bzw. Lage der Proben.

III. Ergebnisse

4.1. Vitalität von Flechtenthalli und Apothecien untersucht mit SYTOX-green und FUN I am CLSM

Zu Beginn der Versuchsreihe bezüglich der Vitalitätstests sollte zunächst das vollständig intakte sowie artifiziell von dem Cortex oder oberen Hymenium befreite symbiotische System der Flechten getestet werden. Flechtenthalli und Apothecien wurden den verschiedenen Parametern gesondert oder in Kombination exponiert, das heißt: es erfolgten UV-Tests oder Vakuumtests oder gekoppelte Tests unter Einsatz beider Weltraumparameter. Hierbei sollte auch gleichzeitig die Rolle des Cortex und der Epinekralschicht sowie des oberen mit sekundären Inhaltsstoffen inkrustierten Hymeniums untersucht werden. Die hier präsentierten Ergebnisse ergaben sich sowohl aus den Untersuchungen mit der LIVE/DEAD-Färbesubstanz SYTOX-green als auch mit FUN I.

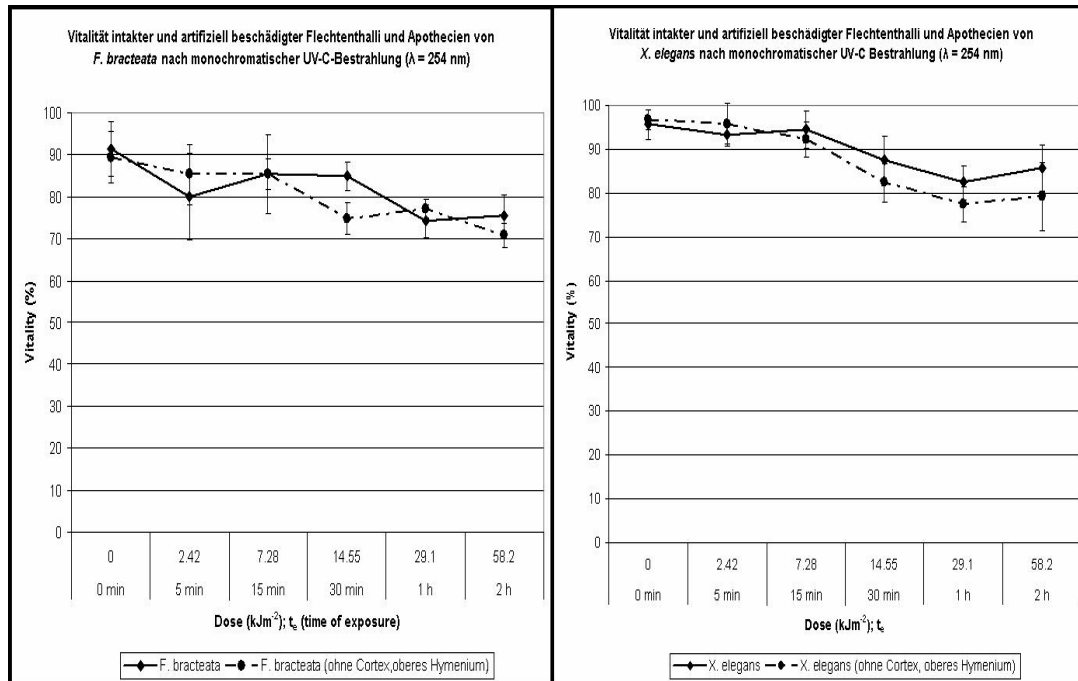
4.1.1. Vitalität von Flechtenthalli nach UV-Strahlung definierter Wellenlänge

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Vitalität bezüglich der artifiziell geschädigten oder ungeschädigten Flechten von *Fulgensia bracteata* und *Xanthoria elegans* nach Bestrahlung mit einer definierten Wellenlänge (254 nm). Die Entscheidung für den Einsatz dieser Wellenlänge in den ersten Versuchen ist aufgrund ihrer bekannten schädigenden Wirkung auf die meisten Arten (Cockell, 1998) getroffen worden. Somit sollte der Effekt der bekannten schädlichen UV-Wellenlänge in Bezug auf das intakte und artifiziell geschädigte symbiotische System der Flechte erstmals ausgelotet werden.

Wie aus dem Diagramm in Abb. 23 ersichtlich wird, ist keine nennenswerte Einschränkung der Vitalität beider Flechten erkennbar. Die Werte liegen durchweg, unabhängig von der Expositionszeit und somit eingesetzten Dosis, bei 70 bis 80 %. Es gibt nur leichte Abweichungen von etwa 3 bis 5 % zwischen geschädigten und unbeschädigten Flechten, die zudem nicht signifikant sind, da die Standardabweichungen sich überlappen. Eine leichte Tendenz der Vitalitätsabnahme ist höchstens bei *F. bracteata* erkennbar, wenn man die Werte nach 15 Minuten Exposition mit einer erreichten Dosis von 7.28 kJm^{-2} mit den Werten nach zweistündiger Bestrahlung mit einer Enddosis von 58.2 kJm^{-2} vergleicht. Die Abnahme der Vitalität unter Berücksichtigung einer jeweiligen 3 %igen Standardabweichung, die sich in

diesem Werte-Vergleich nicht überlappen, beträgt hier fast 10 (für intakte Flechten) bis 15 % (für geschädigte Flechten).

Abb.23:



X. elegans zeigt auch nur eine leichte Tendenz zur Vitalitätsabnahme, ist aber aufgrund der sich durchweg überlappenden Standardabweichungen nicht signifikant. Zusammenfassend kann man sagen, dass ein leichter Unterschied zwischen den beiden bestrahlten Flechten besteht, der weniger aufgrund der artifiziiellen Schädigung als auf die Artzugehörigkeit der Flechte und somit vermutlich auf einer artbedingten Resistenzfähigkeit und somit Anpassung zurückzuführen ist. Die im Folgenden beschriebenen Versuche sollen dies nun klären.

4.1.2. Vitalität der Flechtenthalli nach UV-Strahlung im gesamten UV-Spektralbereich (A, B, C) unter Vakuum

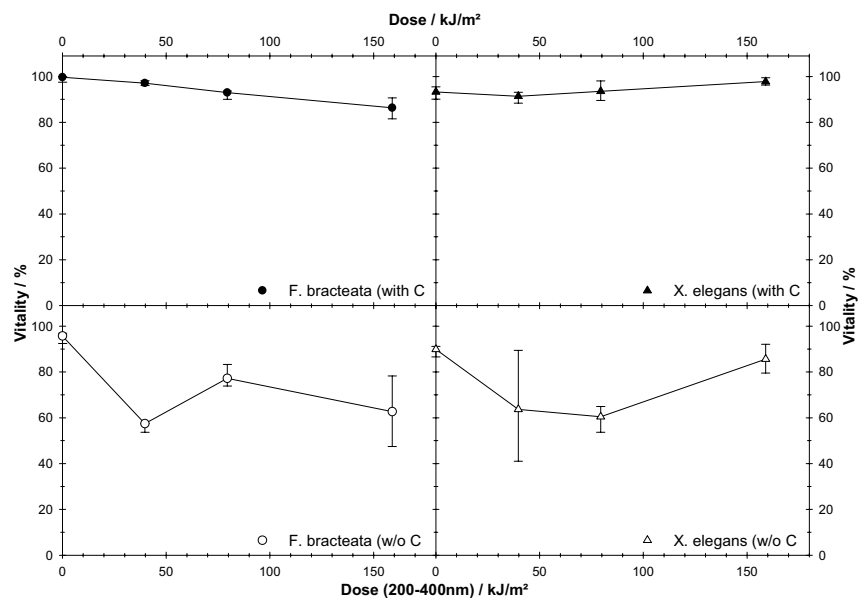
Die beiden Flechten wurden der Weltraum-UV-Strahlung, der so genannten Vakuum-UV-Strahlung ausgesetzt. Eine derartige Exposition bedeutet den Einsatz von UV im Spektralbereich von 200 nm (UV C) bis 400 nm (UV A). Nach dieser Versuchsreihe konnte man feststellen, dass beide Flechtenarten ohne Entfernung des Cortex die simulierten Weltraumbedingungen ohne große Einbußen der Vitalität überstehen können (Abb.24).

X. elegans hatte eine Vitalitätsrate während der gesamten Expositionszeit und den verschiedenen zunehmenden Strahlungsdosen von durchweg über 90 %. Die Vitalität von

III. Ergebnisse

F. bracteata bei Berücksichtigung der Standardabweichung nahm lediglich von 99 % des Kontrollwertes um ca. maximal 12 % auf ca. 87 bis 91 % ab. Jedoch ergeben sich beim Grad der Vitalität von Flechten ohne Cortex signifikante Unterschiede. Während der Kontrollwert beider unbestrahlten Flechten bei 90 bis 95 % Vitalität lag, so sank die Vitalität von *F. bracteata* um 30 % auf etwa 60 % ab, während die Werte von *X. elegans* sich bei etwa 80 % halten konnten. Der kurze Einbruch der Vitalität von *X. elegans* bei einer Enddosis von 79.36 kJm^{-2} ist auf die in diesem Versuch große Anzahl Proben mit zufallsbedingter geringer Gallerte zurückzuführen, wie sich nachträglich am CLSM herausstellte.

Abb. 24: Vitalität des Flechtengewebes nach Exposition zu polychromatischer UV (A, B, C) Strahlung und Vakuum ($p = 10^{-3} \text{ Pa}$). With C = mit Cortex; w/o C = ohne Cortex



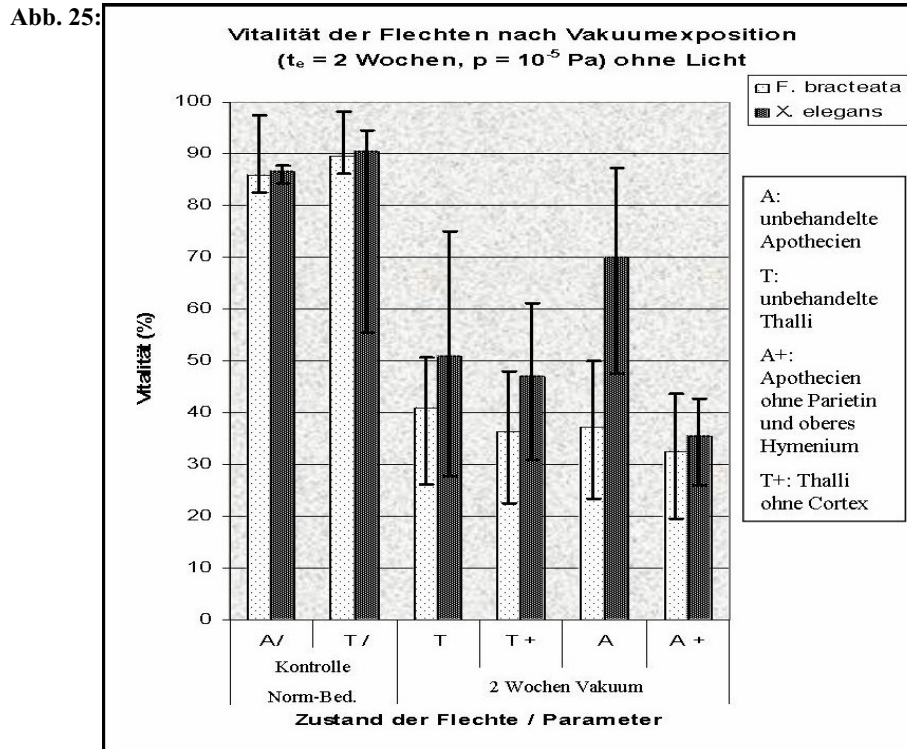
F. bracteata scheint im Vergleich mit *X. elegans* sensibler gegenüber den simulierten Weltraumparametern zu sein, was letztendlich aufgrund fehlender Eindeutigkeit jedoch nur Langzeitversuche klären können.

4.1.3. Ergebnisse eines zweiwöchigen Langzeitversuchs unter UV- und Vakuumeinfluss

Die in dem vorangehenden Kapitel nicht geklärten Fragen bezüglich Langzeitwirkung von Strahlung und Vakuum sowie die Klärung des Vakuumeinflusses unabhängig von der Strahlung sollen in diesem Kapitel ausführlicher behandelt werden. Zu diesem Zweck wurden die beiden Flechtenarten mit und ohne Cortex oder mit und ohne oberes Hymenium unter

Vakuum ohne zusätzliches Licht gesetzt oder mit UV-Licht und Vakuum behandelt. Die Thalli und Fruchtkörper wurden dabei gesondert betrachtet.

4.1.3.1. Vitalität der Flechtenthalli nach Vakuumeinfluss



Das Diagramm in Abb. 25 verdeutlicht, dass der Einfluss von Vakuum auf die Überlebensfähigkeit der Flechten einen nicht unbedeutenden Einfluss hat. Während die Kontrollwerte der Thalli und Apothecien von beiden Flechten bei 85 bis 90 % Vitalität liegen, sinken sie bei *F. bracteata* nach Vakuumexposition auf 40 bis 35 % wobei die geschädigten Thalli nahe 35 % und die geschädigten Apothecien sogar nur 30 % Vitalität anzeigen. Die ungeschädigten Thalli und somit vom Cortex bedeckten Bionten von *X. elegans* büßen etwa 40 % Vitalität ein und erreichen einen Wert von 50 % während die ungeschädigten Apothecien sogar nur 20 % Vitalitätsabfall aufweisen und bei dem Wert von 70 % verbleiben. Dies zeigt deutlich eine größere Resistenz von *X. elegans* gegenüber Vakuumeinfluss an. Der Unterschied in der Vitalität des Flechtengewebes von den Apothecien bei *X. elegans* gegenüber den Thalli lässt sich durch die aufgelockerte Struktur des Thallusgeflechts im Vergleich zu den Fruchtkörpern erklären, so dass dem Vakuum größere Angriffsflächen zur Verfügung stehen, um mehr Schäden an den Zellen durch die Austrocknung zu ermöglichen. Dies wird auch verdeutlicht, indem man die Werte der geschädigten Apothecien

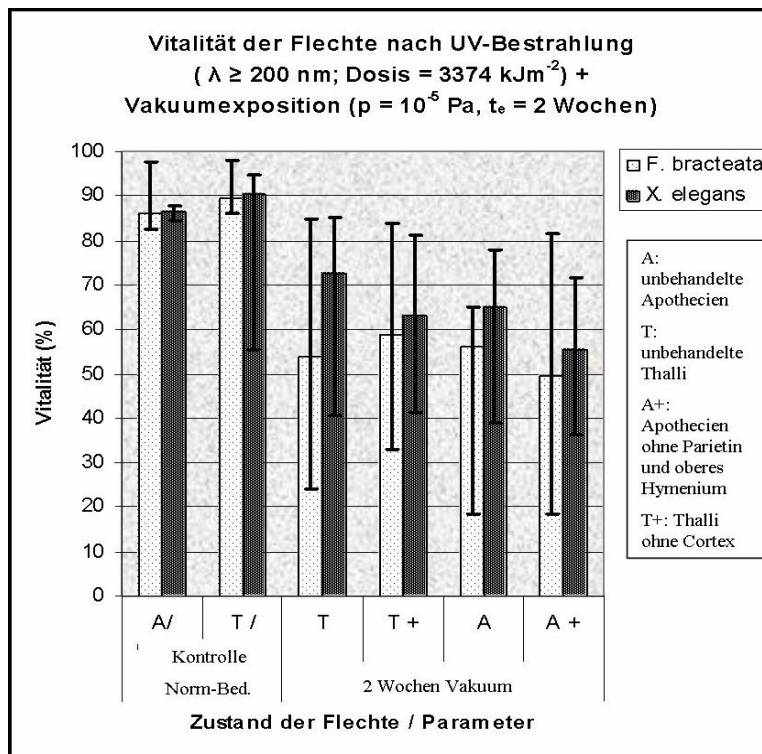
III. Ergebnisse

berücksichtigt, wo die ursprüngliche Struktur aufgelöst worden ist und mehr Angriffsfläche zwischen den Paraphysen und Asci besteht. Dadurch büßen die Fruchtkörper mehr als 50 % Vitalität ein.

4.1.3.2. Vitalität der Flechtenthalli nach UV-Strahlung und Vakuumeinfluss

Die Vitalität der Flechtenthalli nach zweiwöchiger Vakuum- und UV-Exposition besitzt bei den untersuchten Proben beider Flechten einen viel höheren Wert als bei den Versuchen mit reinem Vakuum unter Ausschluss von Licht. Der Wert von *F. bracteata* liegt bei Thalli und

Abb. 26:



Apothecien mit Cortex bzw. Epinekralschicht sowie oberes Hymenium sowie bei Proben ohne die Abdeckschichten mit unwesentlichen kleinen Unterschieden bei 50 %. Die Proben von *X. elegans* schwanken durchschnittlich zwischen 60 und 70 %. Dabei besitzen die artifiziiell geschädigten Thalli und Fruchtkörper eine 10 % niedrigere Vitalität als ungeschädigte Proben. Da die Struktur bezüglich der Flechtenproben von *F. bracteata* keine nennenswerten Unterschiede zu der Struktur der in dem Vakuumversuch verwendeten Proben aufzeigt, überrascht zunächst die Tatsache, dass diese Flechte gegen den Einfluss von zwei mutmaßlich schädigenden Parametern besser gewappnet ist, als bei Exposition gegenüber nur eines Parameters. Bei näherer Betrachtung und Vergleich jedes einzelnen Bildes der

Reflektionsbildanalyse, konnte jedoch festgestellt werden, dass der Anteil reflektierender Gallerte in den Proben des hier durchgeführten Versuchs viel größer war und wahrscheinlich damit ein besserer Schutz für die Zellen im Thallus sowie in den Apothecien gegeben war. Ob auch zusätzlich ein Reparaturmechanismus durch die UV-Strahlung induziert worden ist, welcher beim Einlegen der Probe in Wasser vor der Fluoreszenzanalyse angeschaltet worden sein könnte, konnte in dieser Arbeit aus zeitlichen und finanziellen Gründen nicht geklärt werden, kann jedoch für zukünftige Projekte ein Ansatzpunkt für weiteres Forschen sein.

X. elegans weist keine zusätzlichen Schäden durch UV-Bestrahlung zuzüglich der Vakuum-Exposition auf. Die Werte liegen, wie bereits erwähnt, ebenfalls vergleichbar der Vakuumexposition ohne Strahleneinfluss zwischen 60 und 70 %. Hiermit bestätigt sich ein weiteres Mal die höhere Resistenz der Hochgebirgsflechte *X. elegans* gegenüber Vakuum und UV-Strahlung.

4.2. Vitalität des Mycobionten von *F. bracteata* und *X. elegans* mit Hilfe von SYTOX-green und FUN I

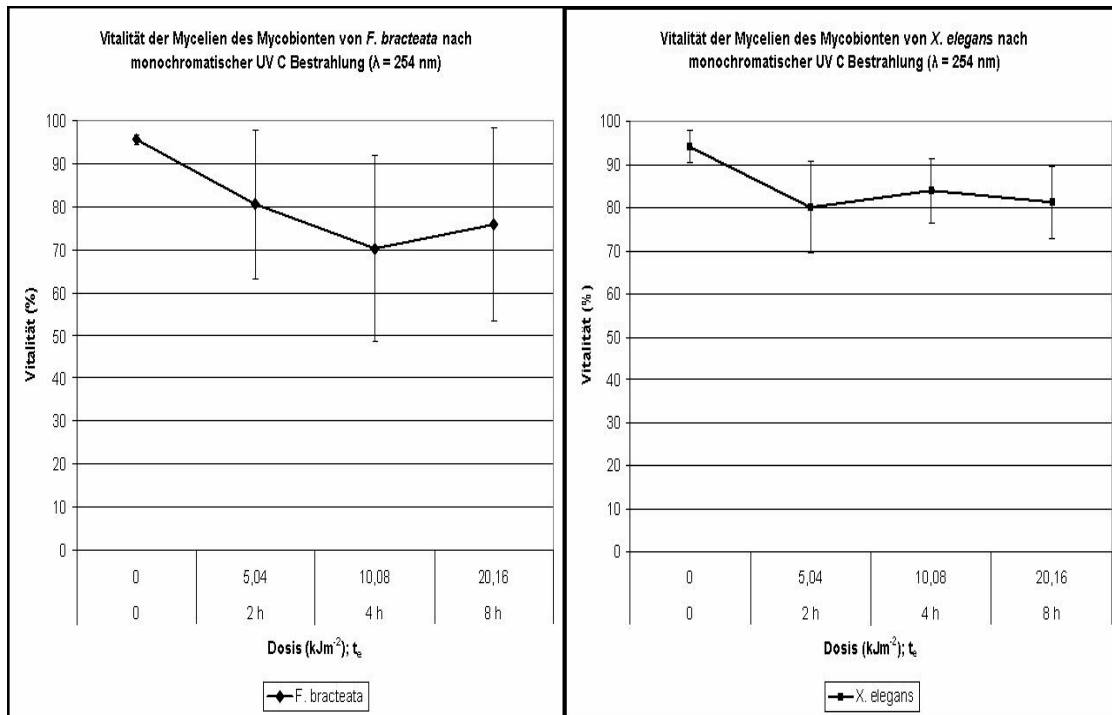
Um die Rolle der Bionten in der Flechtensymbiose hinsichtlich der Resistenz bzw. der Beibehaltung der Vitalität nach Einwirkung starker UV-Strahlung und Vakuumeinfluss klären zu können, wurden die Bionten – Photobionten und Mycobionten – isoliert den Parametern ausgesetzt und in der selben Weise wie das vollständige symbiotische Flechtensystem analysiert. Die im folgenden präsentierten Ergebnisse zeigen den Grad der Vitalität des jeweiligen Mycobionten von *F. bracteata* und *X. elegans*.

4.2.1. Vitalität des Mycels nach UV-Strahlung definierter Wellenlänge

Die Vitalität der Mycelien des Mycobionten beider Flechten wird durch die monochromatische UV-Strahlung nur unwesentlich bis leicht beeinflusst (Abb. 27).

Die Kontrollwerte des Mycels liegen bei 90 bis 95 % Vitalität. Diese Werte weisen keine 100%ige Vitalität auf, da bei Pilzen wie bei Flechten im Pseudogewebe abgestorbene Bereiche unter Normalbedingungen nachweisbar sind und im Mittel 5 bis 10 % des Thallus oder des Mycels betragen. Nach Bestrahlung bis zu 8 Stunden stagniert die Vitalität mit mehr oder weniger Fluktuationen bei einem Wert von 80 %, wobei man anhand der Standartab-

Abb. 27:

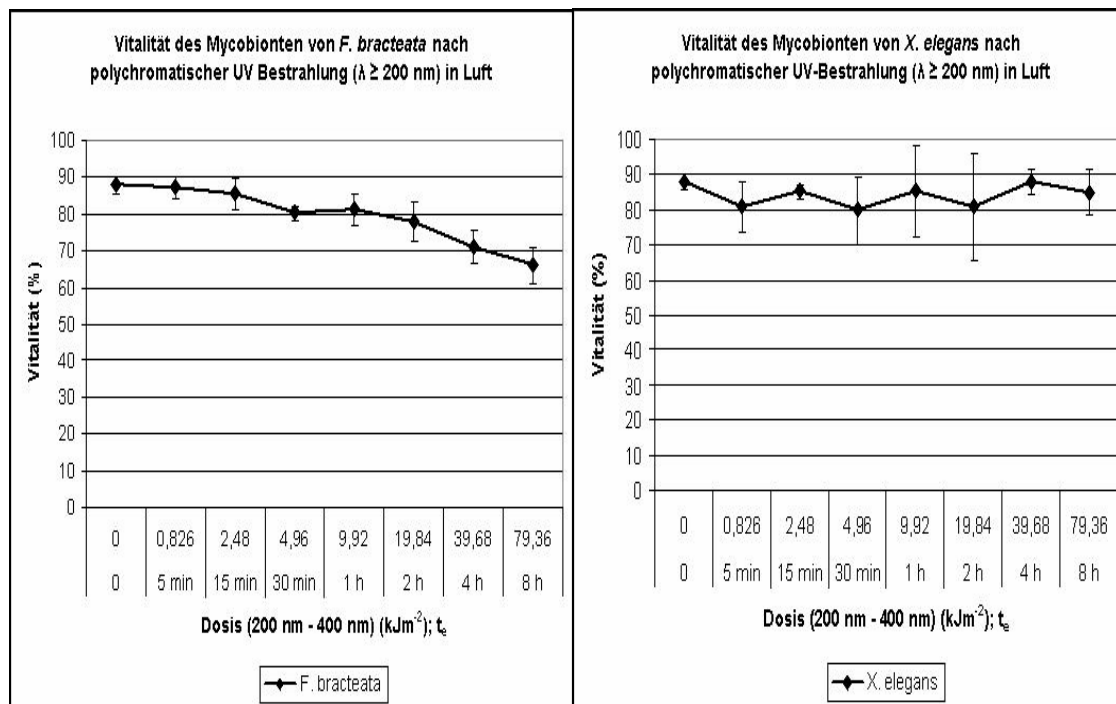


weichungen erkennen kann, dass kein signifikanter Abfall der Vitalität beider Flechtenpilze nachzuweisen ist und keine tatsächlichen Unterschiede zwischen dem Resistenzpotential des Mycobionten von *F. bracteata* und des Mycobionten von *X. elegans* gegenüber dem Einfluss von monochromatischem UV-Licht bestehen.

4.2.2. Vitalität des Mycels nach Exposition zu polychromatischer UV-Strahlung (UV A, B, C)

In 4.2.1. konnte bereits festgestellt werden, dass monochromatische UV-Strahlung keinen nennenswerten Einfluss auf die Vitalität der Mycobionten beider untersuchten Flechten hat. Als Folge dieses Ergebnisses wurden beide Mycobionten unter dem Einfluss polychromatischen UV-Lichts getestet (Abb. 28). Auch in diesem Fall gab es nur geringfügige Veränderungen in der Vitalität beider Flechten. Während die Werte des Mycobionten von *X. elegans* sich trotz harter UV-Einstrahlung unverändert mit geringfügigen Fluktuationen bei 80 bis 90% bewegten, so war doch eine stärkere Abnahme in der Vitalität des Mycobionten von *F. bracteata* von näherungsweise 25 % zu verzeichnen. Die These, dass die Hochgebirgs-

Abb. 28:



flechte offensichtlich ein anderes Anpassungsmuster und somit einen stärkeren Resistenzmechanismus aufweist, scheint sich abermals zu bestätigen. Dabei scheint dem Mycobionten eine besondere Rolle bei der Beibehaltung der Vitalität zuzukommen. Zumindest kann aufgrund der eingesetzten Fluoreszenzmarker auf die Beibehaltung wichtiger Stoffwechselprozesse sowie die Verhinderung einer UV-induzierten Apoptose geschlossen werden, die sich wahrscheinlich in der Flechtensymbiose äußerst vorteilhaft für andere Bionten auswirken dürfte. Dies soll in Kapitel 4.3. durch die Auswertung der selben Tests an den Photobionten genauer geklärt werden.

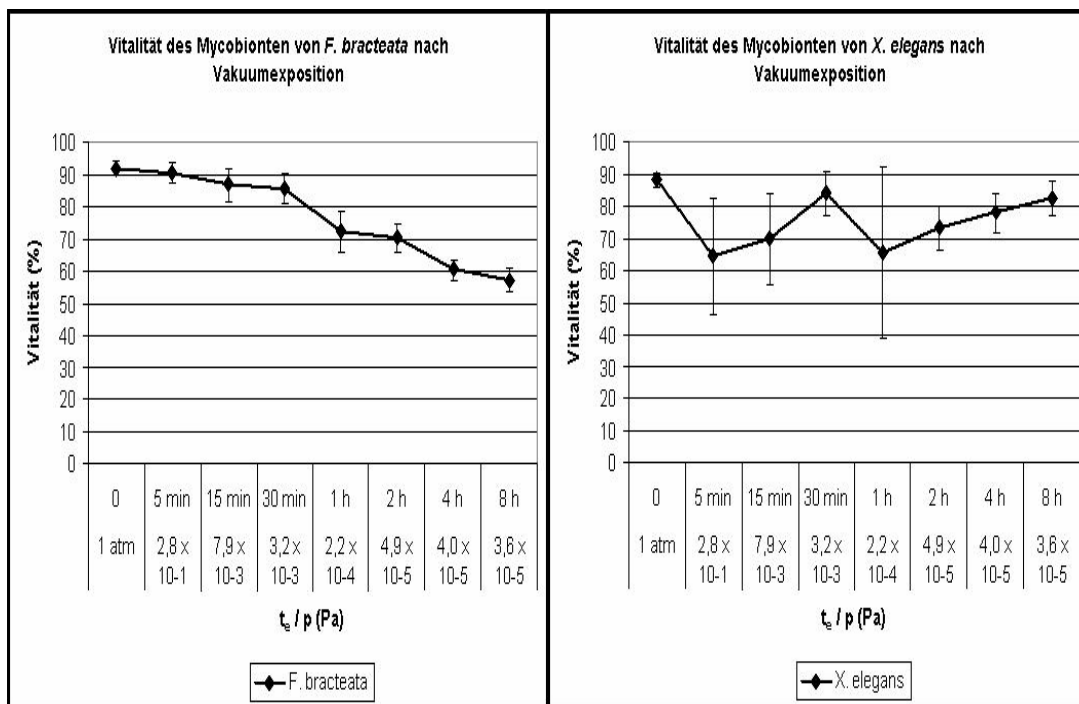
4.2.3. Vitalität des Mycels nach Vakuumeinfluss

Nachdem die Tests mit monochromatischem und polychromatischem UV-Licht Aussagen über das Resistenzpotential gegenüber verschiedene Formen der UV-Strahlung ermöglichten, steht noch die Beantwortung von zwei Fragen aus. Wie verhält sich die Lebensfähigkeit der Mycobionten nach Vakuumeinfluss und können sie möglicherweise simulierte Weltraumbedingungen, nämlich die Koppelung beider Parameter überstehen. Die erste Frage soll in diesem Kapitel zunächst beantwortet werden. Die Abb. 29 zeigt sehr deutlich einen stärkeren Effekt beim Mycobionten von *F. bracteata* als bei Einfluss von UV-Strahlung

III. Ergebnisse

(Vitalitätsabnahme von näherungsweise 32 %), während trotz stärkerer Fluktuationen von etwa 10 bis maximal 30 % der Mycobiont von *X. elegans* nach einem erreichten Enddruck von $3,6 \times 10^{-5}$ Pa an Lebensfähigkeit kaum einbüßt. Die Vitalitätswerte pendeln im Expositionszeitraum mit zunehmenden Vakuum um den Wert von 75 % und zeigen somit nur eine Einbuße von etwa 5 bis 10 %. Die starken Schwankungen beim Mycobionten von *X. elegans* kommen auch hier wieder aufgrund individueller Unterschiede der Struktur und des Gallertgehaltes im Mycel zustande, so dass vor Austrocknung schützende Elemente nicht bei jeder untersuchten Probe gleichmäßig vor negativen Einflüssen des Vakuums greifen können.

Abb. 29:

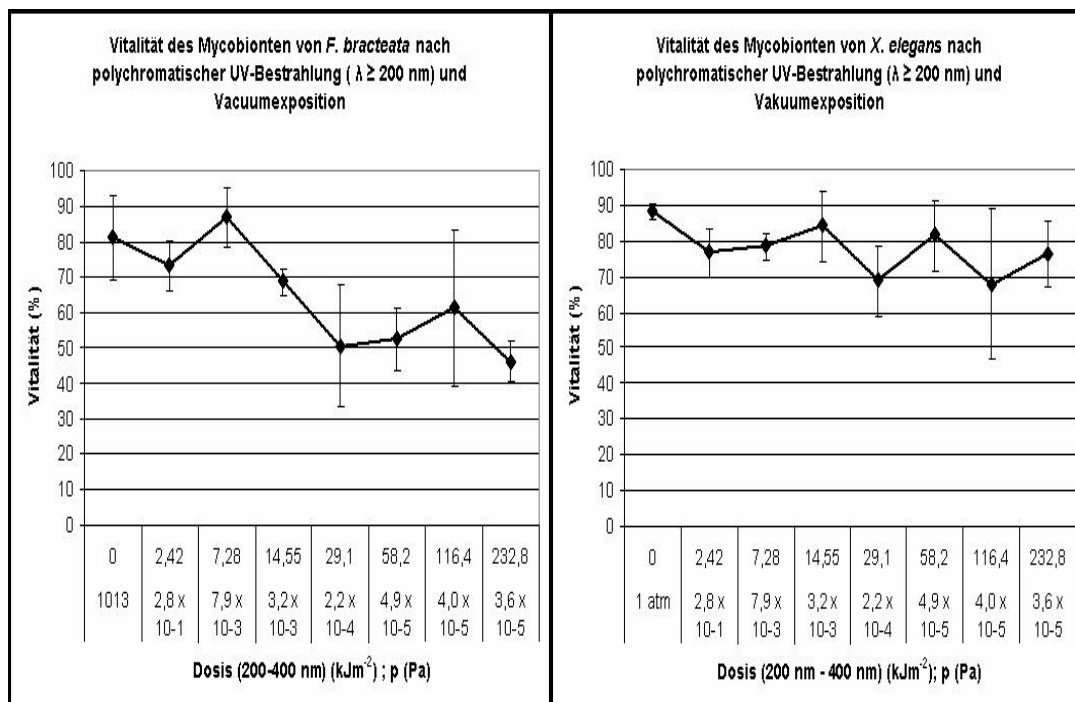


Der stärkere Effekt des Vakuums auf den Mycobionten von *F. bracteata* kann hier wahrscheinlich auf die feingliedrige Anatomie der Mycelien mit meist geringerer Dichte der Hyphenkomplexe und einem häufigeren Fehlen einer schützenden Gallertgrundmatrix begründet sein. Auffällig war zumindest bei Einsatz der verschiedenen Mycelien für die vorgesehenen Tests, dass die Mycobionten beider Flechten sich grundlegend in ihrer Wuchsform und letztendlichen Dichte und Anordnung ihres Hyphengeflechtes unterschieden. Während die Mycelien des Mycobionten von *X. elegans* meist knäulförmig abgerundet und sehr kompakt erscheinen, bieten die Mycelien des Mycobionten von *F. bracteata* meist auf dem Nährsubstrat einen aufgelockerten Rasen mit bedeutend größerer Angriffsfläche für Strahlung sowie für Vakuum.

4.2.4. Vitalität des Mycels nach Exposition zu polychromatischer UV-Strahlung (UV A, B, C) unter Vakuumeinfluss

Die noch offene Fragestellung über das Beibehalten der Lebensfähigkeit der Mycobionten unter simulierten Weltraumparametern, was insbesondere den irdischen Orbit- bzw. Marsbedingungen sehr nahe kommt, soll hier abschließend geklärt werden. Die hier simulierten Weltraumbedingungen kommen nur näherungsweise an die tatsächlichen Bedingungen des Alls heran, da abgesehen vom Einfluss des Vakuums und des gesamten UV-Spektralbereiches auch die ionisierende Strahlung, Röntgen-, Radio-, Infrarot-, radioaktive und Galaktische Strahlung eine Rolle in der Beeinflussung der Lebensfähigkeit von Organismen spielen können. Dies ist aber zumindest ein Anfang, den Mycobionten genauso wie die Photobionten und die Flechtensymbiose auf die Überlebensfähigkeit unter Weltraum-UV und unter Vakuumbedingungen zu testen. Nach der Auswertung ergibt sich folgendes Bild in Abb. 30:

Abb. 30



Der Mycobiont der Hochgebirgsflechte *X. elegans* büßt nach 8 Stunden unter Weltraumbedingungen nur geringfügig an Vitalität ein. Während der Kontrollwert bei 89 % lag, erkennt man über die verschieden eingesetzten Zeiträume, und somit ansteigenden

III. Ergebnisse

Dosiswerte der UV-Strahlung sowie dem zunehmenden Vakuum, keinen nennenswerten Vitalitätsabfall. Nach 8 Stunden mit einer Enddosis von $232,8 \text{ kJm}^{-2}$ und einem Vakuumdruck von $3,6 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ erreicht die Vitalität immer noch einen Wert von etwa 78 %. Im Gegensatz dazu nimmt die Vitalität des Mycobionten von *F. bracteata* um 35 bis 40 % ab, denn während der Kontrollwert bei 80 % lag, erreichte die Vitalität bei der Enddosis von $323,8 \text{ kJm}^{-2}$ und einem Vakuumdruck von $3,6 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ einen Endwert von nur noch 45 %. Es können mit diesem Weltraumtest abermals die Unterschiede im Resistenzpotential der Mycobionten beider Flechten bestätigt werden. Zudem verstärkt sich der Unterschied zwischen dem Mycobionten von *F. bracteata* und dem Mycobionten von *X. elegans* nach den simulierten Weltraumversuchen. Die Vitalität des Mycobionten von *X. elegans* ist bei der maximal erreichten Dosis und dem maximal erreichten Druck fast doppelt so hoch als die von *F. bracteata*.

4.3. Vitalität des Photobionten von *Fulgensia bracteata* und *Xanthoria elegans* mit den Live/Dead-Fluoreszenzfarbstoffen SYTOX-green und FUN I

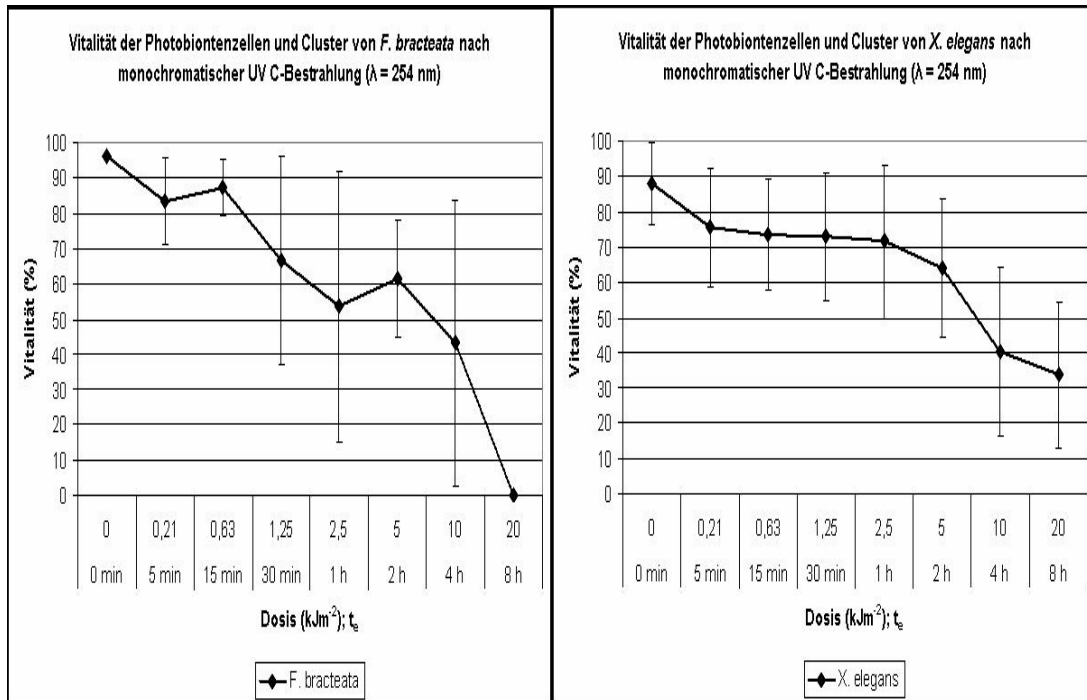
Um die Rolle der Photobionten in der Flechtensymbiose hinsichtlich der Resistenz bzw. der Beibehaltung der Vitalität nach Einwirkung starker UV-Strahlung und Vakuumeinfluss klären zu können, wurden die Bionten ebenfalls wie die Mycobionten isoliert den Parametern ausgesetzt und in der selben Weise wie das vollständige symbiotische Flechtensystem analysiert. Die im Folgenden präsentierten Ergebnisse zeigen den Grad der Vitalität des jeweiligen Photobionten von *F. bracteata* und *X. elegans*.

4.3.1. Vitalität der Photobionten nach UV-Strahlung definierter Wellenlänge

Die Vitalität der Photobionten nach Einwirkung monochromatischer UV-Strahlung ist in hohem Grade von ihrem Wachstumsverhalten bzw. der Koloniebildung abhängig (Abb. 31). Da die verwendeten Kulturen der Gattung *Trebouxia* aus der Flechte *F. bracteata* keine einheitliche Monolayerschicht auf den für die Strahlungsversuche verwendeten Filtern ausbildete und an einigen Stellen größere Cluster bildete, war somit die Variationsbreite der Vitalität, die sich in den stark vom Mittelwert abweichenden Standardabweichungen ausdrückt, erklärbar. Im gesonderten Kapitel 11 wird auf diesen Aspekt der Schutzfunktion äußerer Zellschichten nochmals genauer eingegangen. Es muss ergänzend noch erwähnt werden, dass beim Photobionten von *X. elegans* (ebenfalls aus der Gattung *Trebouxia*) auch

sporadisch Clusterbildung auftrat, jedoch sich im Vergleich zur Koloniebildung der Photobiontzellen von *F. bracteata* in Grenzen hielt. Wie im Diagramm Abb. 31 erkennbar ist, nimmt die Vitalität der Photobiontzellen von *F. bracteata* sehr stark ab und erreicht

Abb. 31:



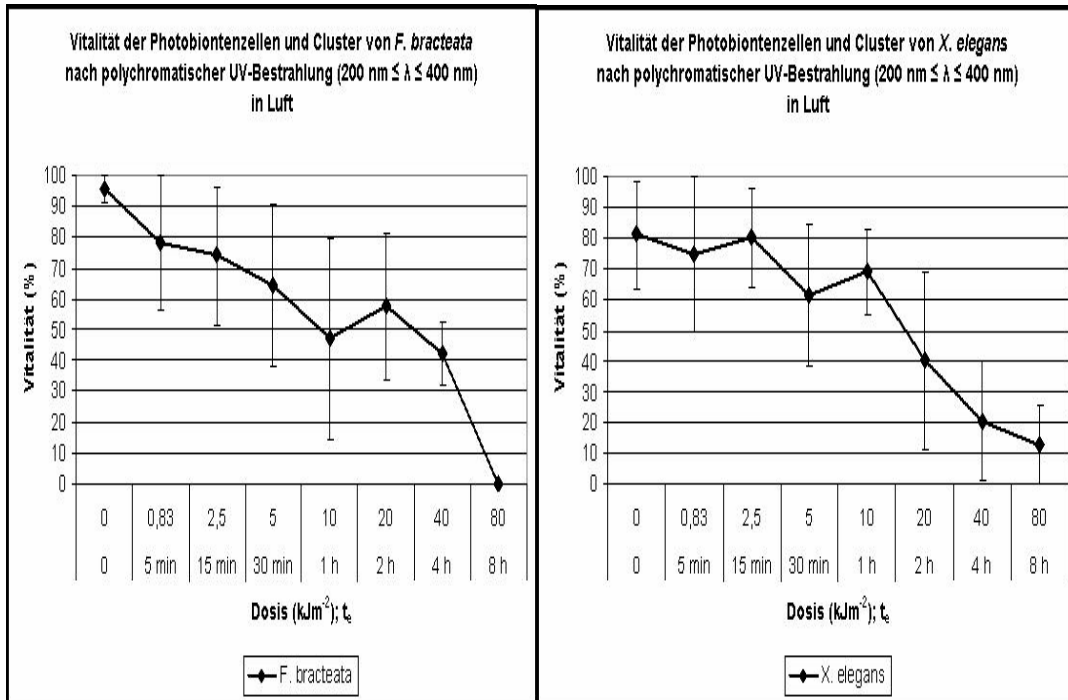
nach einer Exposition von 8 Stunden mit einer Enddosis von 20 kJm⁻² sogar den Nullwert. Hierbei muss hinzugefügt werden, dass selbst die Cluster der Photobionten keine ausreichende Schutzfunktion mehr darstellen konnte. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Cluster der verwendeten 8 Proben des Photobionten von *X. elegans* bei der in dieser Versuchsreihe erreichten Maximaldosis extrem aufgelockert waren und wenig Bindematrix der Gallerte aufwiesen. Während also die vom Kontrollwert aus feststellbare Vitalitätsabnahme der Photobionten von *F. bracteata* näherungsweise 100 % beträgt, weisen die Photobionten von *X. elegans* – ausgehend vom Kontrollwert - eine Vitalitätsabnahme von näherungsweise 71,2 % auf. Folglich überleben im Mittel trotz der verminderten Clusterbildung immer noch annähernd 30 % der Photobionten von *X. elegans* die Bedingungen monochromatischer UV C-Strahlung. Der Photobiont von *X. elegans* scheint zumindest in dem Wellenbereich von 254 nm resistenter gegenüber den Photobionten von *F. bracteata* zu sein.

III. Ergebnisse

4.3.2. Vitalität des Photobionten nach polychromatischer UV-Einstrahlung (UV A, B, C; $200 \text{ nm} \leq \lambda \leq 400 \text{ nm}$)

Polychromatische UV-Strahlung erreicht höhere UV-Dosen bei gleicher Expositionszeit wie sie ebenfalls bei den Versuchen mit monochromatischem Licht verwendet werden. Um so überraschender erscheint das Ergebnis (Abb. 32). Bedeutend mehr Zellen der Photobionten beider Flechten können bei adäquaten Dosen, wie sie in 4.3.1. dokumentiert sind, überleben. Zudem erreicht bei den Tests mit polychromatischer UV-Strahlung und einer Expositionszeit von 2 Stunden sowie einer Enddosis von 20 kJm^{-2} die Vitalitätsrate der Photobionten von *F. bracteata* keineswegs den Nullwert, wie es bei Tests mit monochromatischer UV-Strahlung der Fall war. Diese Tatsache kann einerseits durch die häufigere Anwesenheit von dichten Clustern in den eingesetzten Proben erklärt werden, was aber nicht ausschließlich darauf zurückzuführen ist, denn der Unterschied der Vitalitätsrate beträgt immerhin etwas über 50 %.

Abb. 32



Andererseits kann die hohe Überlebensfähigkeit bei den Photobionten von *F. bracteata* auch durch die Natur des eingesetzten polychromatischen Lichts und damit der physikalischen Überlagerung der verschiedenen Wellenlängen bedingt sein und somit andere Prozesse auslösen, die es den Zellen ermöglicht, der so genannten extremen Strahlung zu widerstehen.

Auch die Photobionten von *X. elegans* erreichen nach der Bestrahlung mit polychromatischem UV-Licht einen 10%ig höheren Wert (etwa 40 %) der Vitalität als nach Bestrahlung mit monochromatischem Licht (Grad der Vitalität lag hier bei 30 %). Dabei war die Anwesenheit der Cluster in beiden Proben gleich häufig. Die Vermutung liegt nahe, dass möglicherweise andere Wellenlängen der UV-Strahlung einen UV induzierten Reparaturmechanismus einschalten, der auf genetischer Ebene festgelegt ist. Leider konnte aus Zeitgründen in dieser Arbeit dieser Möglichkeit nicht nachgegangen werden, kann aber gute Ansatzpunkte für zukünftige Forschung auf diesem Gebiet bieten. Insgesamt betrachtet kann aber auf eine ähnliche Degradation der Vitalitätsmusters beider Flechten geschlossen werden, wie es schon bei den Versuchen mit monochromatischem Licht beobachtet wurde. Während die Kontrollwerte der Photobionten von *F. bracteata* bei ca. 95 % Vitalität liegen, erreichen die Werte nach einer Expositonszeit von 8 Stunden und einer Enddosis von 80kJm^{-2} den Nullpunkt. Die Vitalitätsabnahme beträgt somit 100 %. Die Vitalitätsabnahme bei den Photobionten von *X. elegans* jedoch erfolgt gradueller, das heißt ohne allzu große Schwankungen. Dies ist sicherlich auf die gleichmäßige Verteilung bzw. geringe Clusterhäufigkeit auf den bestrahlten Filtern zurückzuführen. Auch hier überleben etwa 12 % der Photobionten die stärkste Dosis von 80kJm^{-2} , was unter Betrachtung des Ausgangswertes der Kontrolle von etwa 80 % einem Vitalitätsabfall von 90,4 % gleichkommt. Damit sind die Photobionten von *X. elegans* ähnlich wie der Mycobiont resistenter als die Photobionten von *F. bracteata*, die nur aufgrund struktureller Besonderheiten, nämlich der Clusterbildung adäquate Dosen überleben können.

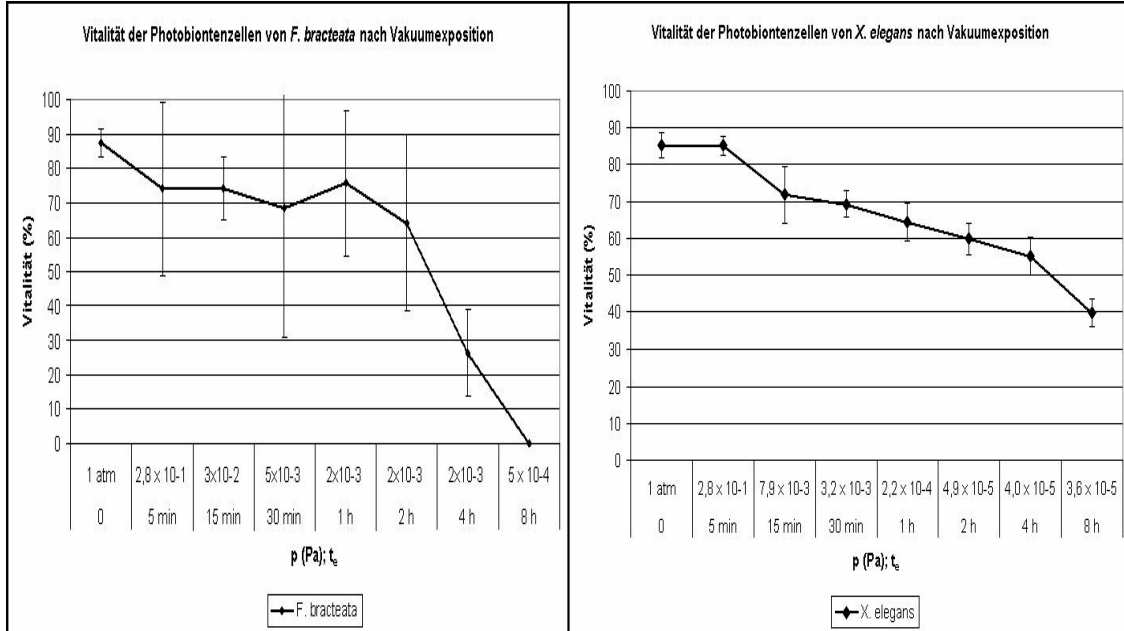
4.3.3. Vitalität der Photobionten nach Vakuumeinfluss

Bevor Tests mit Vakuum-UV durchgeführt wurden, wurden die Photobionten beider Flechten zunächst auf das Resistenzpotential bzw. den Vitalitätsgrad unter Vakuumbedingungen getestet. Es stellte sich heraus, dass maximale Niedrigdrücke von 5×10^{-4} Pa bereits eine letale Dosis für die Photobionten und Photobionten-Cluster von *F. bracteata* darstellten (Abb. 33). Die Vitalität von *X. elegans* erreichte jedoch bei einem niedrigeren Vakuumdruck von $3,6 \times 10^{-5}$ Pa einen Wert von 40 %, was im Verhältnis zur Kontrolle einer Vitalitätsabnahme von näherungsweise 50 % entspricht. Die Photobionten von *X. elegans* können somit im Verhältnis zu den Photobionten von *F. bracteata* als mindestens doppelt so resistent gegenüber der durch Vakuum bewirkten Austrocknung charakterisiert werden. Die Frage nach dem Grund für diese Eigenschaft bleibt zunächst noch unbeantwortet, da die

III. Ergebnisse

Erklärungen in diesem Fall weder die Clusterbildung noch eine mögliche stärker ausgeprägte Gallertmatrix bei den Photobionten von *X. elegans* sein kann. Weitere Ergebnisse bezüglich

Abb. 33:



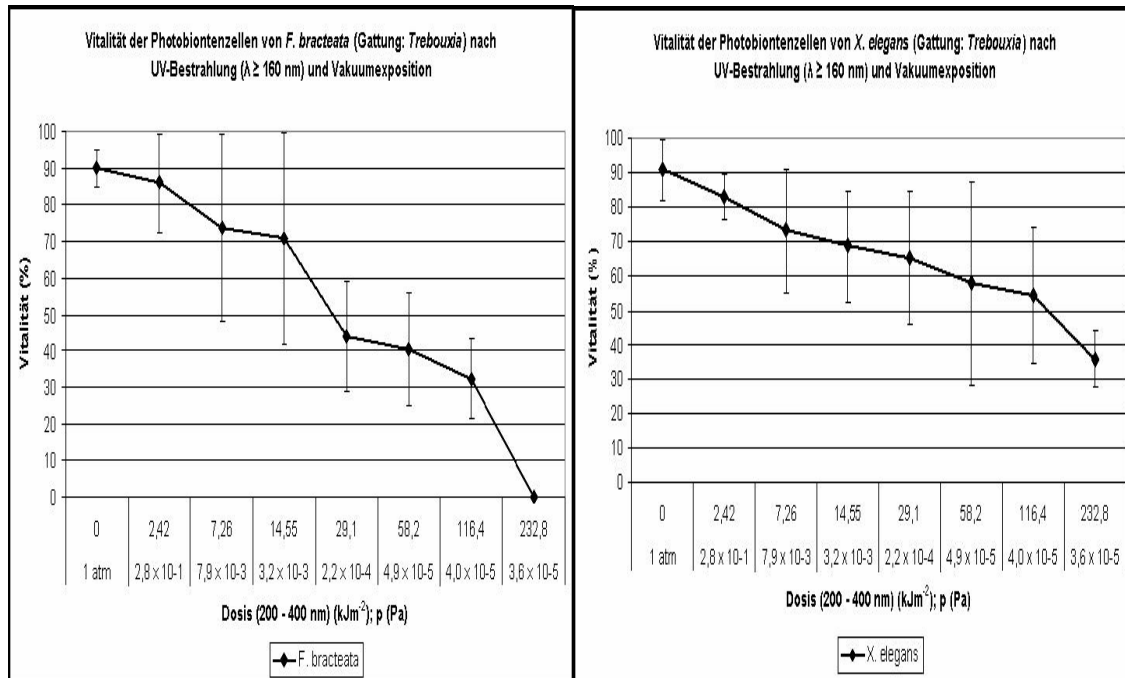
eines weiteren Kriteriums der Lebensfähigkeit der Photobionten, nämlich die Auswertung der Daten über die Wachstumsfähigkeit wird jedoch zeigen, dass nach Vakuumexposition die Photobionten beider Flechten nicht mehr wachstumsfähig sind (Kapitel 7). Sehr wahrscheinlich ist, dass das Vakuum keinen so großen Einfluss auf die primären physiologischen Prozesse und auf Induktion einer Apoptose hat, so dass die Farbstoffe in den nach den Experimenten in Wasser überführten Photobionten normale Zellaktivität signalisieren. Festzuhalten sei hier jedoch, dass die Photobionten beider Flechten mit zunehmendem Niedrigdruck eine Vitalitätsabnahme aufweisen, wobei die Abnahme bei *X. elegans* verzögert einsetzt.

4.3.4. Vitalität der Photobionten nach Exposition zu polychromatischer UV-Strahlung und Vakuumeinfluss

Bevor die Beschreibung der Ergebnisse erfolgt, bedarf es noch eines erläuternden Zusatzes. Die bei dieser Versuchsreihe eingesetzten Photobionten-Kulturen enthielten zufällig mehr Algen-Cluster bei beiden Flechten – jedoch besonders bei der Flechte von *F. bracteata*, so dass bereits vor der experimentellen Durchführung davon ausgegangen werden konnte, dass

die Resistenz der Photobionten der gotländischen Flechte zumindest bezüglich des eingesetzten Vakuumdruckes größer sein dürfte. Was sich letztendlich wirklich bestätigte, denn bei einem Niedrigdruck von etwa 10^{-4} Pa erreichte die Vitalität der Photobionten in dieser Weltraumsimulation noch nicht den Nullwert, wie es bei den reinen Vakuumversuchen im Kapitel 4.3.3. entsprechend der Fall gewesen war (Abb. 34).

Abb. 34:



Der Nullwert der Vitalität wird erst bei einer 8stündigen Exposition mit einem Vakuum-Enddruck von $3,6 \times 10^{-5}$ Pa und einer Enddosis der UV-Strahlung von $232,8 \text{ kJm}^{-2}$ erreicht. Jedoch durch früheres Abfallen der Kurve bei den Versuchen der Weltraumsimulation im Vergleich zu den Vakuumversuchen zeigt sich deutlich eine geringere Resistenz der Photobionten von *F. bracteata* trotz häufigerer Clusterfrequenz auf den Filtern.

Der Abfall der Vitalität von *X. elegans* ähnelt sehr stark im Verlauf dem Abfall in den Vakuumversuchen, wobei 5 % zusätzlicher Vitalitätsverlust zu erkennen ist (Abfall von 40 % Vitalität bei Vakuumexposition auf etwa 35 % Vitalität bei Exposition gegenüber den Weltraumparametern). Aufgrund der Standardabweichung bis über die 40 %-Marke ist dieser Abfall jedoch nicht signifikant und die Resistenz der Photobionten von *X. elegans* gegenüber den simulierten Weltraumbedingungen ist fast deckungsgleich mit der Vakuumresistenz. Vergleicht man jedoch diese Ergebnisse mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit polychromatischer UV-Strahlung ohne Vakuum, so erscheint auf dem ersten Blick der

III. Ergebnisse

Einfluss von polychromatischer UV-Strahlung schädigender zu sein als die Kopplung beider Parameter von UV-Strahlung und Vakuum. Dieses Paradoxon kann aber leicht geklärt werden, denn bei der Durchsicht der CLSM-Bilder konnte man erkennen, dass die Algen-Cluster der UV-Strahlungsversuche lockerer strukturiert und mit geringerer Quantität an Bindematrix der Gallerte ausgestattet waren, wohingegen bei den simulierten Weltraumversuchen die verwendeten Cluster kompakter strukturiert waren. Dieser hier angesprochene Aspekt der Struktur von Clustern muss somit für die Klärung der Resistenzfaktoren nicht unberücksichtigt bleiben.

Vergleicht man die beiden unter simulierten Weltraumbedingungen getesteten Photobionten der Flechten miteinander, so fällt zum wiederholten Male auf, dass der Photobiont von *X. elegans* eine bedeutend höhere Resistenz aufweist, als der Photobiont von *F. bracteata*. Bei gleicher Enddosis von $232,8 \text{ kJm}^{-2}$ und einem Endvakuumdruck von $3,6 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ überleben immer noch etwa 35 % der Photobiontenzellen der Hochgebirgsflechte wohingegen die Photobiontenzellen von *F. bracteata* vollständig abgestorben sind. Dies drückt sich auch in einer steiler abfallenden Kurve der Vitalität des Photobionten von *F. bracteata* im Verhältnis zu der Vitalitätskurve des Photobionten von *X. elegans* aus. Der Vitalitätsabfall über die gesamte Expositionszeitspanne von 8 Stunden beträgt bei den Photobionten von *F. bracteata* 100 % und bei den Photobionten von *X. elegans* etwa 61,11 %.

4.4. Vitalität der Ascosporen

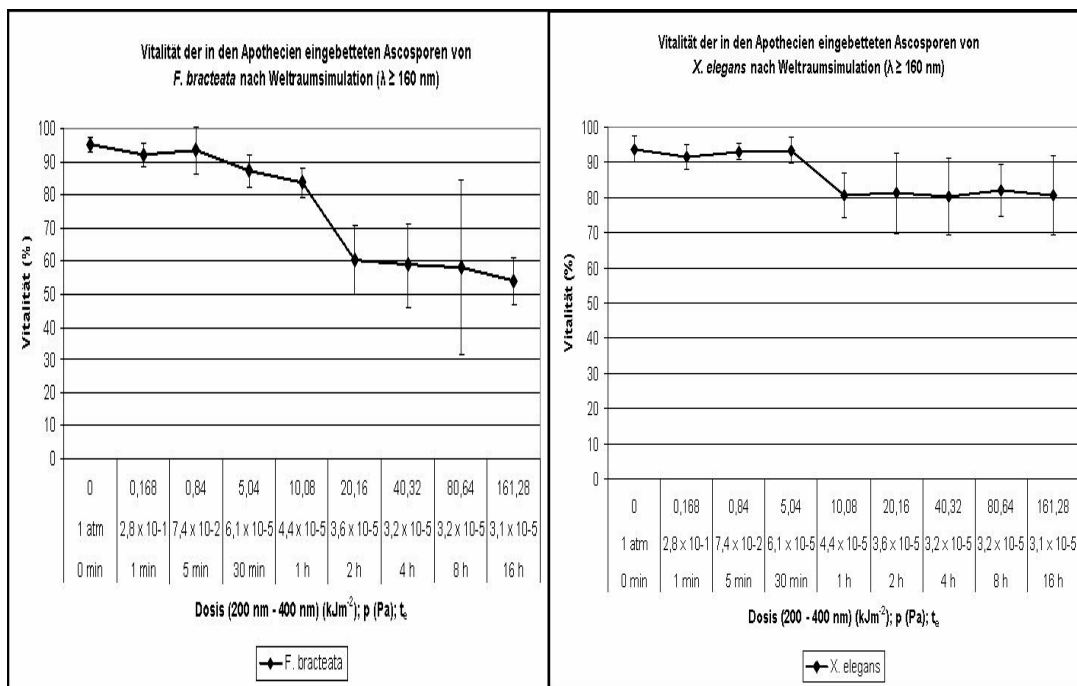
Die Ausbildung von Ascosporen ist eine entscheidende Grundvoraussetzung für die Reproduktionsfähigkeit des Flechtenpilzes. Für eine erfolgreiche Reproduktion müssen möglichst viele Ascosporen vital und keimungsfähig sowie das daraus resultierende Mikromycel wachstumsfähig sein. In diesem Kapitel wird zunächst die Vitalität der Ascosporen von *F. bracteata* beschrieben. Bei den Vitalitätstests an isolierten Ascosporen von *X. elegans* nach UV-, Vakuum- und Weltraumexposition reichte die nötige Menge an ausgestreuten Sporen (mindestens 1000 Ascosporen) für eine statistische Auswertung nicht aus. Da der Zeitpunkt des offensichtlich Saison- sowie eventuell Standort bedingten Streuverhaltens nicht bekannt war, konnte das entsprechende Material nicht gezielt zu einem bestimmten Zeitpunkt gesammelt werden. Somit kann in diesem Kapitel nur mit Hilfe weniger CLSM-Bilder eine Tendenz zu der Frage, ob die Ascosporen von *X. elegans* nach den getesteten Parametern vital oder nicht vital sind, aufgezeigt werden. Zudem muss auf die

Versuche bezüglich des Keimungsverhaltens der Ascosporen beider Flechten hingewiesen werden, wo noch genügend Sporenmaterial zur Verfügung stand.

4.4.1. Vitalität der im Apothecium geschützten Ascosporen von *F. bracteata* und *X. elegans* nach Simulation der Weltraumparameter

Ähnliche Kurvenverläufe in den Diagrammen, wie bei der Auswertung der Flechten und ihrer Bionten ergeben sich für die Vitalität der von den Apothecien umhüllten Ascosporen (Abb. 35). Auffällig ist die Ähnlichkeit der Resistenz der Sporen mit der Resistenz des ausgebildeten Mycels oder des Flechtengewebes beider Flechten unter den selben Simulationsbedingungen.

Abb. 35:



Auch der Grad der Vitalität der Sporen beider Flechten unterscheidet sich ähnlich wie bei den vorangegangenen Versuchen mit den Bionten. Während bei *F. bracteata* die Vitalität der Ascosporen vom Kontrollwert bis zur Maximaldosis von $161,28 \text{ kJm}^{-2}$ und einem Enddruck des Vakuums von $3,1 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ nach 16 Stunden Expositionszeit um etwa 41 % absinkt, so sinkt die Vitalität der Ascosporen von *X. elegans* wesentlich geringer ab, nämlich um etwa 12 %. Diese Unterschiede können in diesem Fall nicht eindeutig auf die innere Struktur oder den Gehalt der Gallertmatrix erklärt werden, da die Fruchtkörper beider Flechten ähnlich kompakt

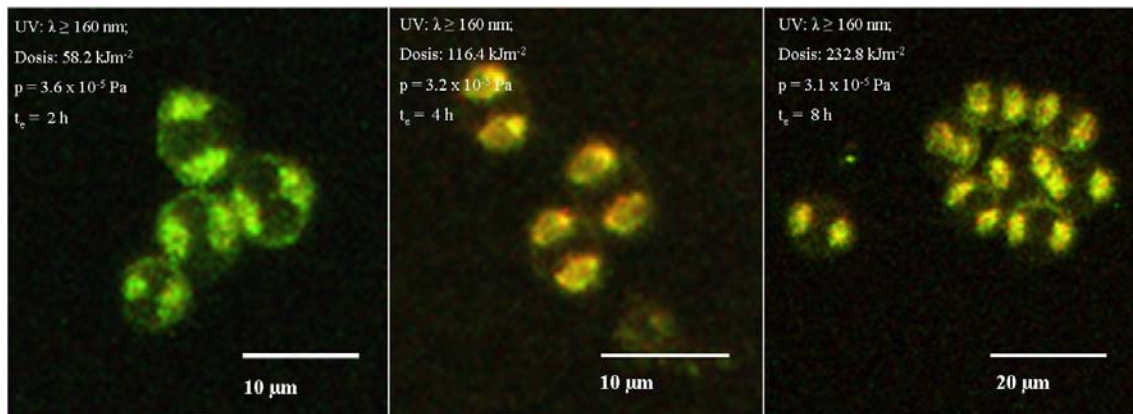
III. Ergebnisse

aufgebaut sind. Jedoch fiel bei der Analyse der CLSM-Bilder aufgrund der Autofluoreszenz der sekundären Inhaltsstoffe die unterschiedliche Konsistenz des auf der Oberfläche der Apothecien abgesonderten UV-absorbierenden und leicht rötlichviolett bis gelb fluoreszierenden Parietins auf. Fruchtkörper von *X. elegans* besitzen bedeutend dichtere und mehrlagig angeordnete, dickere Kristallstrukturen auf der Oberfläche des Hymeniums als es bei den Fruchtkörpern der Flechte *F. bracteata* der Fall war (siehe Kapitel 11). Möglicherweise sind somit die Sporen von *X. elegans* effizienter vor den extremen Umweltbedingungen – insbesondere der harten UV-Strahlung - während der Simulationstests geschützt als in Apothecien von *F. bracteata*.

4.4.2. Vitalität der isolierten Ascosporen von *F. bracteata* und *X. elegans*

Wie bereits erwähnt, konnten aufgrund geringer Sporenausbeute die Versuche mit Ascosporen von *X. elegans* nicht wie bei der Flechte *F. bracteata* ausgewertet werden. An dieser Stelle wurden somit nur wenige Bilder der CLSM bzgl. des Markersignals von FUN I als tendenzielles Ergebnis gewertet (Abb. 36). Man erkennt, dass bis zur Maximaldosis von $232,8 \text{ kJm}^{-2}$ und dem niedrigsten Druck von $3,2 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ die dipolaren hyalinen Sporen von *X. elegans* überleben können. In Abb. 36 erkennt man durchweg grün bis rot-grün gefärbte

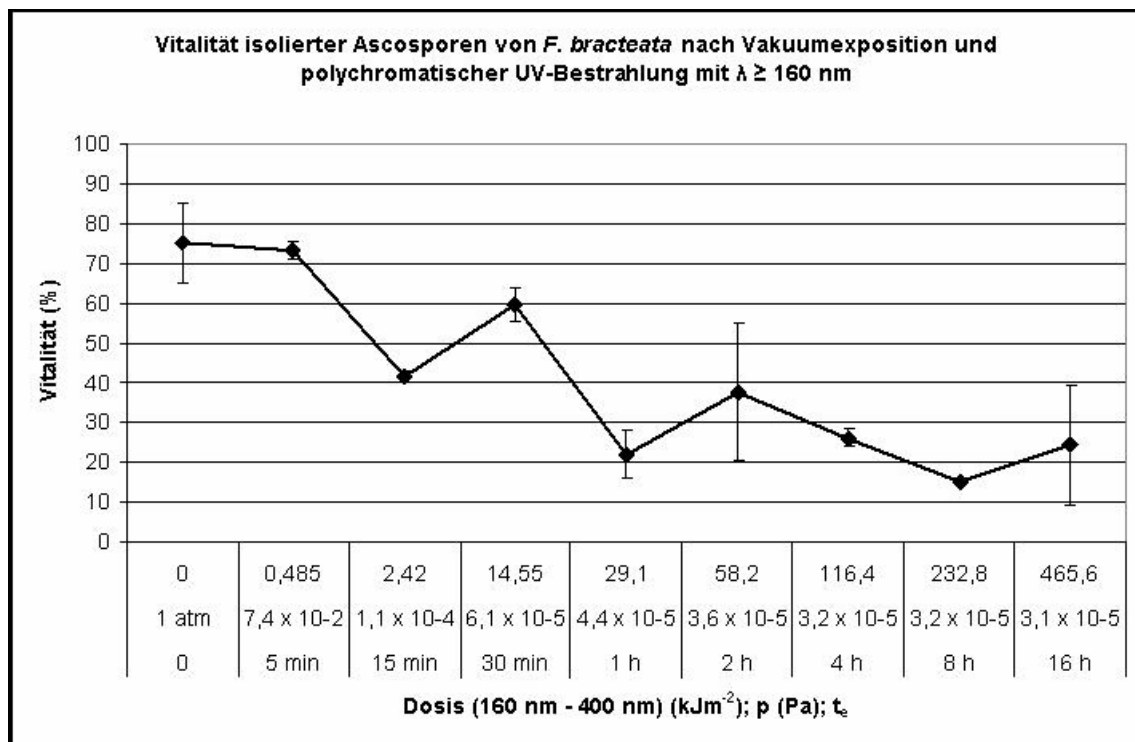
Abb. 36: Vitale Ascosporen der Flechte *X. elegans*, gefärbt mit FUN I. Unabhängig von der Expositionszeit (t_e) und somit der Strahlendosis oder dem geringen Vakuumdruck (p) erscheinen die Sporen vital. Die Färbung im zweiten und dritten Bild unterscheidet sich vom ersten Bild aufgrund des Farbumschlags von grün nach rot. Dies ist ein Zeichen physiologischer Aktivität in den Zellen. Rot markierte Stoffe lagern sich in den Vakuolen an.



dipolare Ascosporen der Flechte *X. elegans*. Folglich sind die getesteten Weltraumsimulationen auf die Vitalität der Ascosporen von *X. elegans* in nur sehr geringem

Maße schädigend. Eindeutige Ergebnisse erhielt man jedoch bei der Untersuchung der bestrahlten und unter Niedrigdruck versetzten Ascosporen von *F. bracteata* (Abb. 37).

Nach der Auszählung und Auswertung ergab sich folgendes Bild: die Ascosporen sind weniger resistent als die Mycelien des Mycobionten, da nach einer maximalen Expositionszeit von 8 Stunden mit einer Enddosis von $232,8 \text{ kJm}^{-2}$ und einem Vakuumdruck von $3,2 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ etwa 15 % der Sporen vital sind, wohingegen die Mycelien selten eine Vitalität unter 40 % aufwiesen. Die Vitalitätsabnahme der Ascosporen beträgt über die gesamte Versuchsreihe



vom Kontrollwert bis zur Maximaldosis von $465,5 \text{ kJm}^{-2}$ und einem Niedrigdruck von $3,1 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ 68,5 %. Dieser stärker schädigende Effekt der Weltraumparameter könnte wahrscheinlich auf das Fehlen des sonst die Sporen umgebenden Hymeniums und den nicht vorhandenen, inkrustierten sekundären Flechteninhaltsstoffen auf der Sporenoberfläche zurückzuführen sein.

5. Keimungsfähigkeit der Ascosporen nach UV- und Vakuum-Exposition

Die Keimungsfähigkeit der Ascosporen beider untersuchter Flechten kann als weiterer Aspekt für die Beibehaltung wichtiger Lebensfunktionen unter Weltraumparametern gelten. Die Fähigkeit des Flechtenpilzes, sich zu reproduzieren und somit seine Wachstumsfähigkeit nach

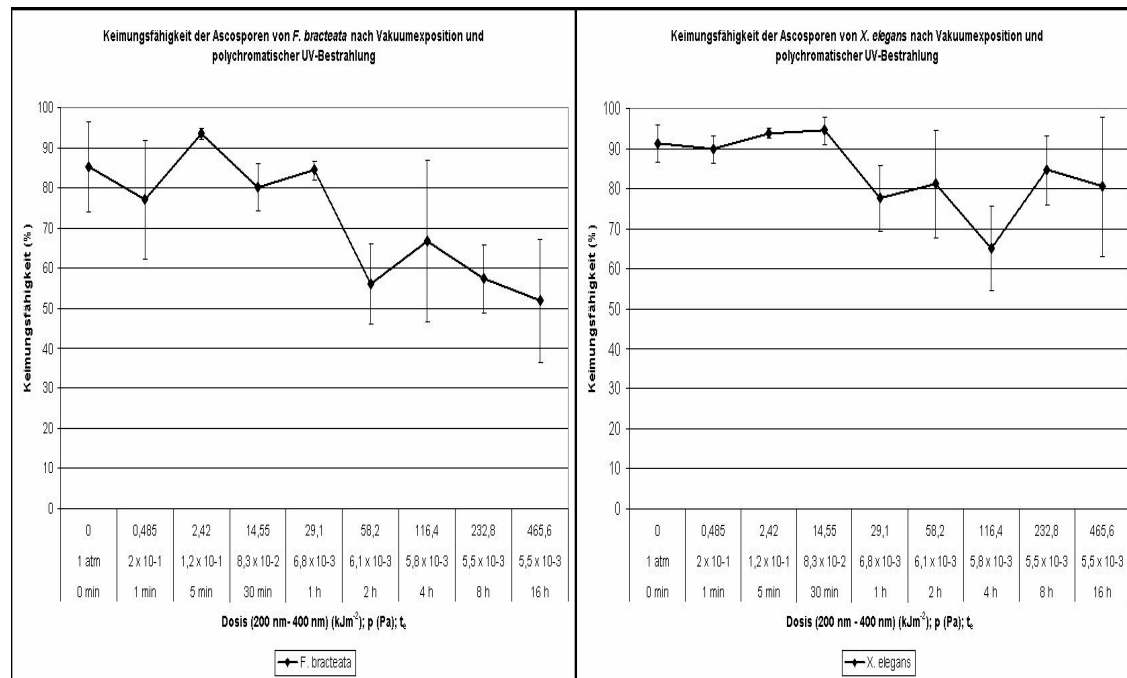
III. Ergebnisse

den Weltraumtests aufrecht zu erhalten, würde einerseits sein Resistenzpotential unabhängig von der Vitalität klären und die Bedeutung für die Symbiose sehr deutlich veranschaulichen, könnte aber andererseits auch wichtige Fragen der Astrobiologie, wie die Frage nach der Möglichkeit und somit der Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen interplanetaren Austauschs von Leben (Panspermie) beantworten.

5.1. Keimungsfähigkeit der durch den Fruchtkörper geschützten Ascosporen von *F. bracteata* und *X. elegans*

Die Ascosporen von *F. bracteata* büßen etwa 40 % an Keimungsfähigkeit ein (Abb. 38). Während der Kontrollwert bei etwa 87 % Vitalität liegt, so nimmt die Vitalität mit zunehmender UV-Dosis und Vakuumdruck ab und erreicht bei einer Expositionszeit von

Abb. 38:



maximal 16 Stunden mit einer Enddosis von 465,6 kJm⁻² und einem Vakuumdruck von 5,5 x 10⁻³ Pa einen Wert von etwa 52 %. Die starken Schwankungen im Kurvenverlauf, die auch in den Expositionszeiten von 1 min bis einer Stunde Werte oberhalb des Kontrollwertes aufzeigten oder gar den selben Wert annehmen, können auf die natürlichen Schwankungen im Reifezustand der Sporen in den untersuchten Fruchtkörpern zurückzuführen sein, was sich

auch in den teils breit ausgedehnten Standardabweichungen –sogar des Kontrollwertes ablesen lässt.

Bei der Präparation wurde darauf geachtet, dass die getesteten Apothecien möglichst annähernd dasselbe Entwicklungsstadium hatten, um allzu große Unterschiede vermeiden zu können. Aufgrund der immer noch auftretenden Schwankungen und der hoch ausfallenden Standardabweichungen, kann hier nur von einer Tendenz der Keimungsfähigkeit gesprochen werden. Die Hauptaussage, die in dieser Versuchsreihe mit *F. bracteata* bezüglich des mäßigen Vitalitätsabfalls getroffen werden kann, ist, dass die den Parametern ausgesetzten Apothecien die in ihnen befindlichen Ascosporen in dem Maße schützen, dass im Mittel über 50 % der Ascosporen während der gesamten Expositionszeit unter Einfluss der Weltraumparameter nicht ihre Keimungsfähigkeit eingebüßt haben. Anders verhält es sich bei den Sporen von *X. elegans*. Hier ist kein realer Abfall der Kurve bezüglich der Keimungsfähigkeit erkennbar, da eine Regressionskurve durch die reellen Werte des Diagramms in Abb. 38 unter Berücksichtigung der Standardabweichungen bei einem Wert von etwa 80 % Keimungsfähigkeit nahezu parallel zur x-Achse verlaufen würde und unabhängig von der angewandten Dosis kein schädigender bzw. eindämmender Einfluss der eingesetzten Parameter erkennbar wird. Das bedeutet aber gleichfalls wieder die Bestätigung für eine stärkere Resistenz der Hochgebirgsflechte *X. elegans* (Kap. 4.4.1.) und dass im Vergleich zu *F. bracteata* ein stärkeres Potential der Fruchtkörper für den Schutz der hier eingebetteten Ascosporen gegeben ist. Die Vermutung liegt, wie bereits in Kap. 4.4.1. geäußert, nahe, dass die Flechteninhaltsstoffe von *X. elegans* auf dem Hymenium als UV-absorbierende Substanzen aufgrund dichter, mehrlagiger Anordnung effizienter in ihrem Schutz sind als die dünne inkrustierte Schicht des Parietins auf dem oberen Hymenium von *F. bracteata*.

5.2. Keimungsfähigkeit der isolierten, ungeschützten Ascosporen von *F. bracteata* und *X. elegans*

Die Anzahl der auszuwertenden Weltraumtests in dieser Versuchsreihe hielt sich in Grenzen und war aufgrund von geringer Anzahl ausgestreuter Sporen und Kontaminationsschwierigkeiten derart eingeschränkt, dass nur ansatzweise Aussagen getroffen werden können. Die Keimungsfähigkeit war bei beiden Flechten nach den simulierten Weltraumtests vorhanden. Jedoch ging das Entwicklungsstadium des Mycel bei der Auskeimung von Ascosporen der Flechte *F. bracteata* über die Ausbildung eines Keimschlauches nicht weiter

III. Ergebnisse

hinaus und der Keimschlauch sowie meist selten entstandene erste Verzweigungen degenerierten sehr schnell. Bei *X. elegans* konnte man ähnliche Entwicklungen feststellen, aber es kam in seltenen Fällen gleichfalls zu weiter entwickelten verzweigten Mycelien mit einem Maximaldurchmesser von 0,5 mm / Monat, die aber ihr Wachstum auch sehr schnell einstellten. Ob diese Ergebnisse jedoch das wirkliche Resistenzpotential wiedergeben, konnte aufgrund der geringen Sporenmenge und auch aus zeitlichen Gründen bzgl. der Simulationsapparat-Belegung oder Reparaturen nicht ermittelt werden. Vorsichtig ausgedrückt, besitzen die ungeschützten Ascosporen nach der Simulation immer noch die Fähigkeit für eine erfolgreiche Keimung, sind jedoch für eine Mycelbildung nur bedingt bis gar nicht fähig. Offensichtlich ergibt sich ohne den schützenden Fruchtkörper ein höheres Schadenspotential durch UV-Strahlung und Vakuum, welches in die Entwicklung von hyalinen Ascosporen zu einem Pilzgeflecht eingreift.

6. Keimungsfähigkeit der Ascosporen von *F. bracteata* und *X. elegans* oder ersatzweise *X. parietina* nach Weltraumsimulation und Einsatz verschiedener Medien

In der hier vorgestellten Versuchsreihe wurde primär auf die Keimungsfähigkeit und Wachstumsfähigkeit des Mycobionten der untersuchten Flechten auf den verschiedenen Nährmedien bzw. Mischsubstraten fokussiert. Hierzu dienten Ascosporen aus unbestrahlten sowie bestrahlten oder unter Vakuumdruck versetzte Apothecien. Die Fragestellung nach der Bedeutung der Symbiose unter extremen Bedingungen wurde hier mit den astrobiologischen Fragestellungen verknüpft. Würde ein Mars-Substrat den selben Effekt auf das Wachstum wie bei Verwendung eines Erdextrakts haben, und somit einen katalytischen bzw. fördernden Einfluss auf die Keimungsfähigkeit und das Wachstum des Mycobionten anzeigen? Die positive Einwirkung des Erdextraktes stellte sich bereits in vorangegangenen Untersuchungen im Vergleich zu anderen Substrattests in meiner Arbeit heraus (Kap. 6.1./ siehe Kontrollwerte in Abb. 39). Um die erweiterte Frage bzgl. der Reaktion auf Mars-Substrat beantworten zu können, werden in den folgenden Kapiteln die Ergebnisse von verschiedenen Substrattests nach Exposition der verschiedenen Parameter vorgestellt. Es wurden Mischsubstrate aus Agar mit oder ohne Zusätze verwendet, da das Wachstum mit Verwendung reinen Erd- oder Marssubstrats nur sehr langsam abläuft und sehr schwer zu beobachten ist. Das bedeutet, dass die hier verwendeten Agar-Substrate idealisiert sind und für ein beschleunigtes Wachstum leicht katalysierende Wirkung haben können. Das kann jedoch aufgrund der Verwendung des Agars in allen Substraten die Beantwortung der eigentlichen Fragestellung nach den

Unterschieden im Wachstum nicht beeinflussen. Eine weitere Frage kann in diesem Zusammenhang gestellt werden, nämlich warum die Simulation von UV-Strahlung und Vakuum-UV nicht gleichzeitig während des Verweilens der Ascosporen auf dem Substrat erfolgte. Dies hatte ausschließlich technische Gründe. Einerseits gibt es auf dem Mars keine Agar-Substrate und zumindest die Bestrahlung der Proben sowie die Verwendung von Vakuumdruck sollten sich so nah wie nur möglich an marsähnliche Bedingungen annähern. Bei Einsatz von UV-Strahlung auf das Agarnährmedium würden aufgrund des höheren Wassergehaltes sehr viel mehr Sauerstoffradikale aufgrund der Wasserspaltung durch UV entstehen, als es auf dem Mars der Fall wäre. Diese Sauerstoffradikale würden aufgrund ihrer hohen Reaktivität eventuell direkt schädigend auf das Wachstum einwirken. Dies würde aber nicht die Radikalbildung auf der Oberfläche des Mars' widerspiegeln, die aufgrund geringen Wassergehalts nicht dasselbe Ausmaß der Sauerstoffradikalbildung aufweisen würde. Primär ist das generelle Wachstumspotential des Mycobionten im Kontakt zu dem angebotenen Marssubstrat von Interesse, so dass durch die hier vorliegende Arbeit die Beantwortung der Frage über die Verträglichkeit des Mycobionten gegenüber dem eingesetzten Marsmaterial möglich ist. Ein weiteres technisches Problem neben der best möglichen Simulation wasserarmer Marsbedingungen stellt das Agar-Substrat an sich dar. Ascosporen auf Agar-Substrat können nicht in die Weltraumsimulationskammer gestellt werden, da die Vakuumpumpe erstens nicht den nötigen Marsdruck aufgrund des hohen Wasserdrucks erreichen würde und zweitens gegebenenfalls den Agar absaugen könnte und damit Schaden erleiden würde. Somit mussten Kompromisse geschlossen werden.

6.1. Keimungsfähigkeit der Ascosporen von *F. bracteata* und *X. parietina* auf verschiedenen Nährmedien nach monochromatischer UV-Bestrahlung ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

Aufgrund der bereits erwähnten geringen Sporenausbeute von *X. elegans* wurde ersatzweise eine eng verwandte, kosmopolitisch vorkommende Flechte aus der Ordnung der *Telochistaceae* verwendet und das noch verbleibende Marsmaterial sowie das noch verbleibende Probenmaterial von *X. elegans* für ausgewählte Weltraumsimulationsversuche aufbewahrt (siehe Kap. 6.2). Es handelt sich in der nun im folgenden beschriebenen Versuchsreihe um Substrattests mit Ersatzproben von *Xanthoria parietina* aus Gotland. An dieser Stelle soll noch einmal explizit darauf hingewiesen werden, dass eine Vergleichbarkeit mit der nah verwandten Art *X. elegans* jedoch nicht gegeben ist. Es können keine Rückschlüsse auf das Verhalten der Hochgebirgsflechte *X. elegans* gezogen werden und die

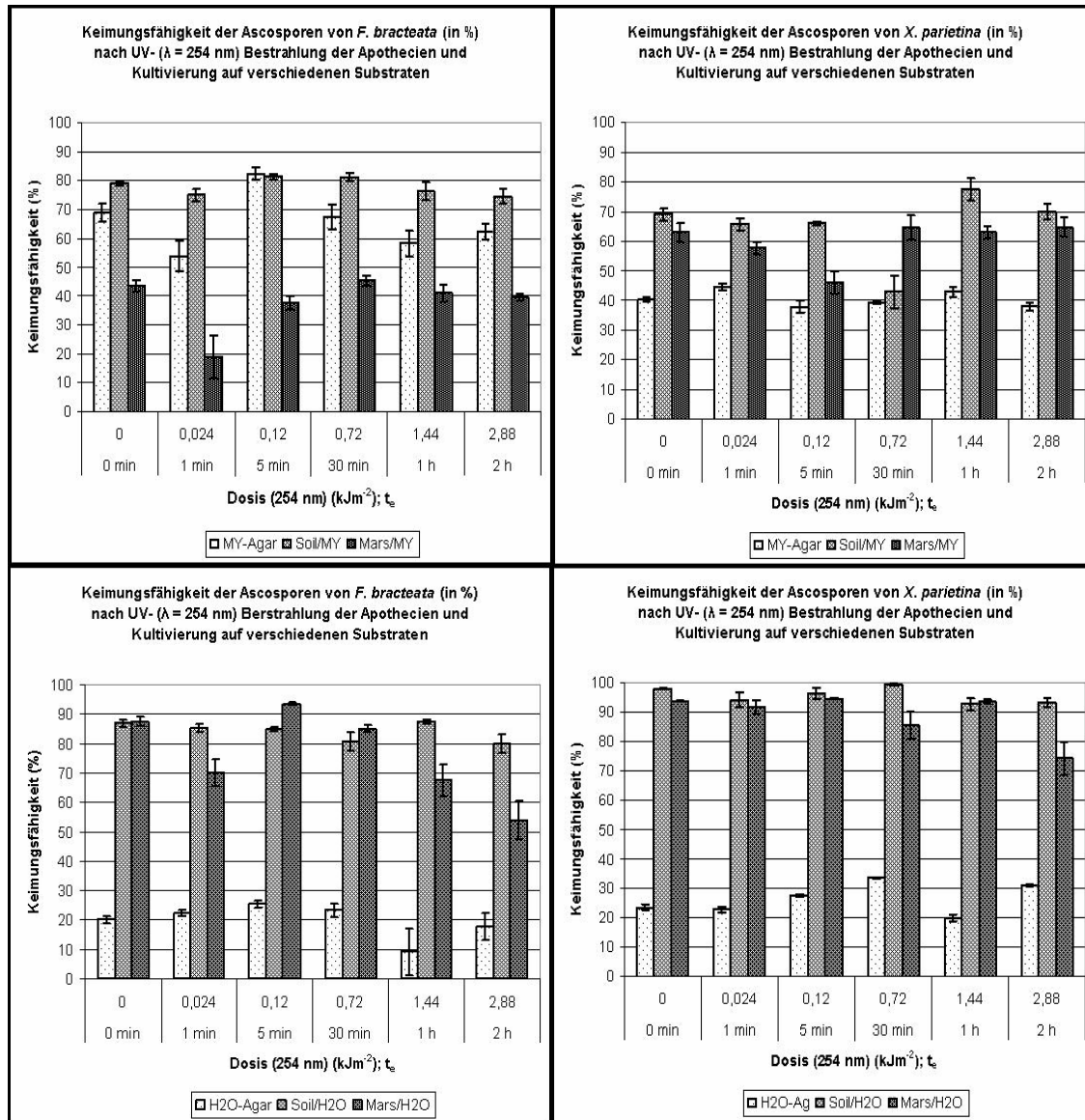
III. Ergebnisse

hier präsentierten Ergebnisse sollen nur eine Grundtendenz der Substratverträglichkeit innerhalb der Ordnung der *Teloschistaceae* aufzeigen und als Zusatzversuch betrachtet werden, der mögliche Unterschiede auf Gattungsebene (Gattung *Xanthoria* im Vergleich zur Gattung *Fulgensia*) herausheben kann.

Bei Analyse der Keimfähigkeit der Ascosporen beider Flechten nach den beschriebenen Versuchen, konnte man unterschiedliche Wachstumstendenzen erkennen (Abb. 39). Während im Durchschnitt zumeist nur 20 % der Ascosporen beider Flechten auf dem Wasser-Agar auskeimten und anschließendes Wachstum zeigten, nahm die Anzahl der keimenden Ascosporen auf den Mischsubstraten um ein zwei- bis vierfaches zu. Das MY-Agar-Medium führte bei *F. bracteata* im Mittel zu einer 60 %igen und bei *X. parietina* zu einer 40 %igen Keimungsfähigkeit der Ascosporen. Besonders aufschlussreich waren die Tests mit den MY-Mischsubstraten gegenüber den Wasseragar-Mischsubstraten. Während die Ascosporen auf MY-Medien mit Erd- oder Marsextraktzusatz zu 40 bis 80 % keimungsfähig waren, konnten die Ascosporen ihre Keimungsfähigkeit bei den mit Erd- oder Marsextraktzusätzen versetzten Wasser-Agar-Substraten auf 80 bis 95 % optimieren. Offensichtlich hemmte ein Überangebot an Nährsubstrat, wie es bei den MY-Substraten der Fall ist, das optimale Auskeimen und Auswachsen der Hyphen, während die Stoffe aus den Erd- bzw. Marsextrakten ohne MY-Zusatz sich förderlich auf die Keimung und das Wachstum auswirkten. Dabei ist zudem auf den Wasseragar-Mischsubstraten kein bis nur geringer Unterschied zwischen dem Keimungspotential der Ascosporen beider Flechten sowie zwischen den Wasser-Erd- bzw. Wasser-Marsextrakten erkennbar gewesen. Offensichtlich kann ein Marsextrakt ein Erdextrakt ersetzen und keinerlei Hemmung oder Schäden für Keimung und Wachstum des Mycobionten hervorrufen. *X. parietina* zeigt sogar bei Erd- sowie Marsextrakt tendenziell ein etwa 10 %iges besseres Wachstum als *F. bracteata*.

Jedoch bleibt die Frage, wie es sich bei den Sporen der sich bisher als sehr resistent erwiesenen Hochgebirgsflechte *X. elegans* verhält. Dies soll im anschließenden Kapitel unter der Durchführung weniger Weltraumsimulationsversuche geklärt werden.

Abb. 39: Keimungsfähigkeit der Ascosporen von *F. bracteata* und *X. elegans*



Festzuhalten wäre bei den hier durchgeführten Untersuchungen, dass die hier angewendete UV C (254 nm)-Strahlung ein Zehnfaches der Strahlung beträgt, wie sie bei Versuchen mit *Bacillus subtilis* (Horneck 1993) verwendet wurde und welche dabei eine zweifache Inaktivierung des Wachstumspotentials des Bazillus ermöglichte. Die in den Fruchtkörpern eingebetteten Ascosporen sind somit um einiges resistenter als die als Weltraum-tauglich qualifizierten und hier erwähnten Prokaryota.

III. Ergebnisse

6.2. Keimungsfähigkeit der Ascosporen von *F. bracteata* und *X. elegans* auf JSC-Marsanalogon-Medium nach Weltraumsimulation (UV und Vakuum)

Die Keimungsfähigkeit der Ascosporen von *F. bracteata* unterscheidet sich aufgrund der extremen Parameter grundsätzlich von der Keimungsfähigkeit der Ascosporen von *X. elegans* und bestätigt gleichfalls die Ergebnisse, die in Kapitel 5.1. vorgestellt wurden (Abb.40). Für die Keimungsfähigkeit der Sporen beider Flechten sind keinerlei Unterschiede zwischen den einzelnen Parametern oder der Kombination der Parameter erkennbar. Ob Vakuum, ob polychromatische UV-Strahlung oder die Kombination von beiden Parametern: die Keimungsfähigkeit der Ascosporen bleibt konstant bei einem Wert von 50 % (*F. bracteata*) oder 80 % (*X. elegans*). Dabei hat die Keimungsfähigkeit der Ascosporen von *F. bracteata* unter den getesteten Parametern gegenüber dem Kontrollwert um etwa 40 % abgenommen, während sich die Keimungsfähigkeit der Ascosporen von *X. elegans* unter den gleichen Bedingungen nur um etwa 12 % verringert hat. Die Verwendung des JSC-Mars1-Analogon-Substrats scheint gleichfalls keinen Einfluss auf die Keimungsfähigkeit zu haben und erlaubt wiederum Rückschlüsse auf das weite Anpassungs- bzw. Resistenzpotential dieser Hochgebirgsflechte.

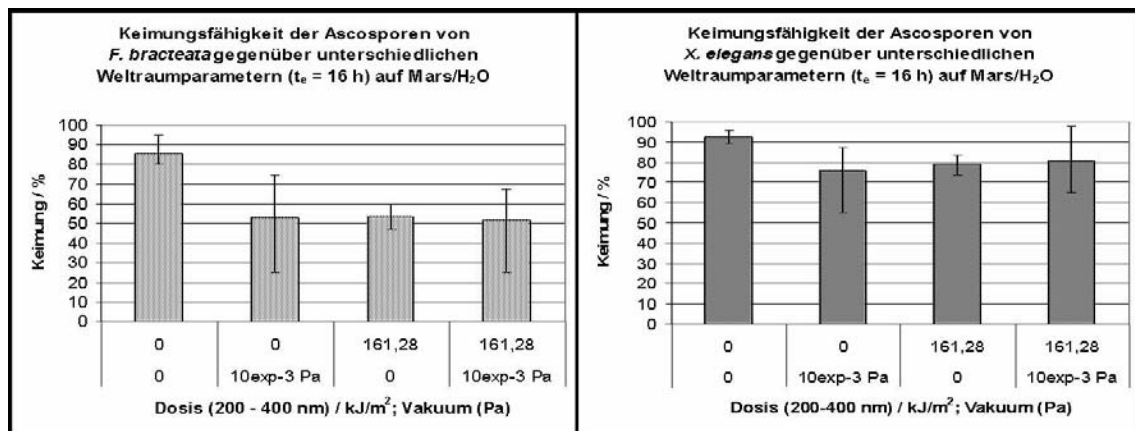


Abb. 40: Keimungsfähigkeit der Ascosporen nach Weltrauparameter-Exposition auf JSC-Mars1.

7. Wachstum der Mycelien des Mycobionten von *F. bracteata* und *X. elegans*

In den nun folgenden Versuchsreihen soll das Wachstumspotential der ausgebildeten Mycelien des Mycobionten untersucht werden. Die Aufgabe ist es, mögliche Unterschiede gegenüber dem Wachstumsverhalten der Photobionten als auch gegenüber dem Keimungsverhalten der Ascosporen herauszustellen. Es soll geklärt werden, ob ausgebildete

Flechtenpilze der untersuchten Flechten ein anderes Resistenzpotential als die hyalinen, unstrukturierten, ein bis zweizelligen Ascosporen besitzen.

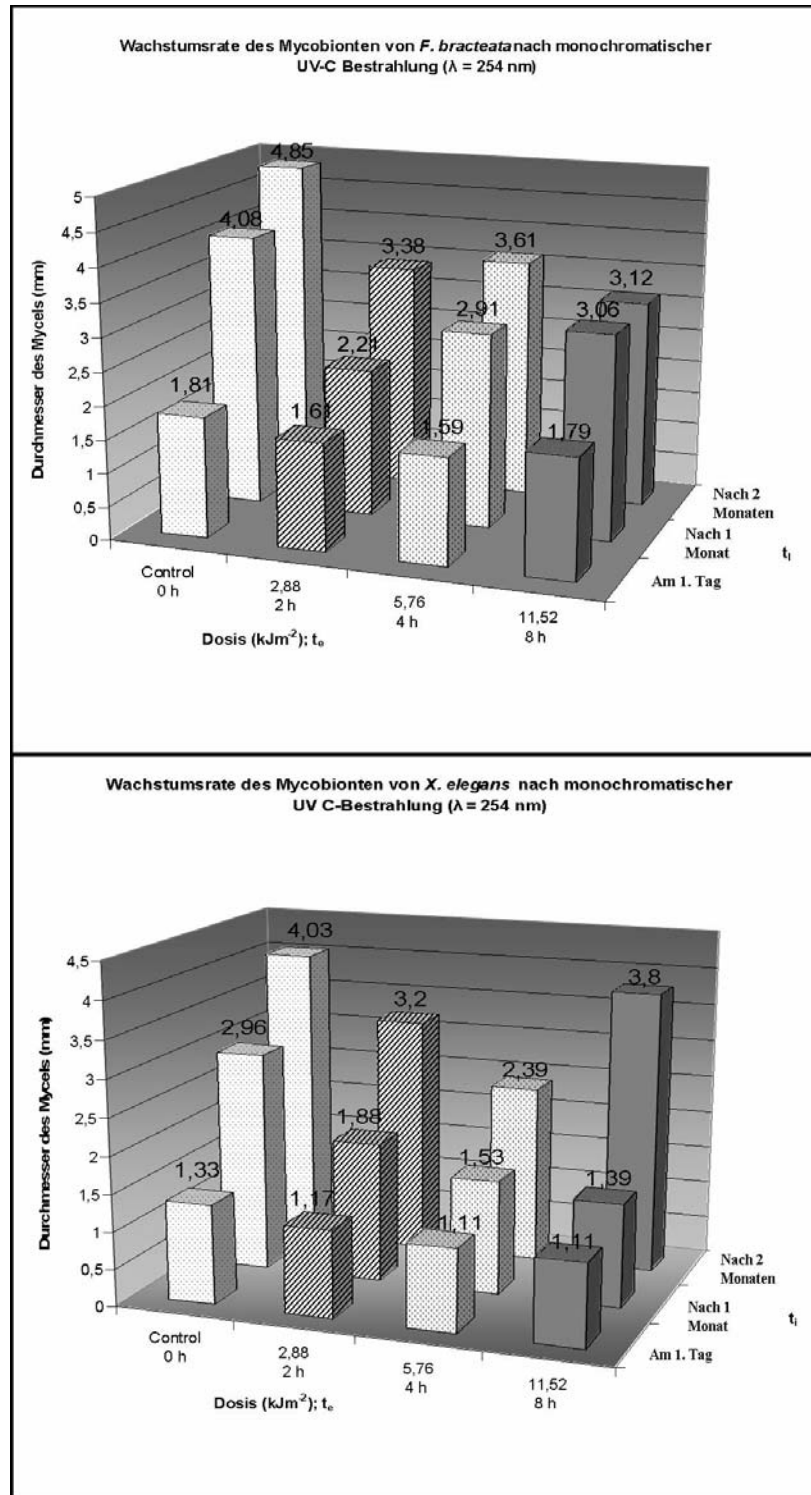
7.1. Wachstum der Mycelien nach monochromatischer UV-C Exposition ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

Das Wachstum der Mycelien der untersuchten Mycobionten von *F. bracteata* und *X. elegans* unterscheidet sich nach monochromatischer UV C Bestrahlung nur leicht voneinander und bestätigt somit auch die Ergebnisse der Vitalitätstests (Abb. 41). Während die Mycobionten beider Flechten im Kontrollversuch ohne UV-Bestrahlung jeweils nach 2 Monaten Inkubationszeit im Durchmesser um fast ein vierfaches zunehmen, so ist das Wachstum des Mycobionten von *X. elegans* nach Bestrahlung nur bedingt eingeschränkt. Nach 2 und 4 Stunden Exposition mit einer gemessenen Dosis von 2.88 bis 5.76 kJm^{-2} und anschließender Kultivierung erreichte es nach zwei Monaten Inkubationszeit noch das zwei bis dreifache des Ausgangsdurchmessers. Ein zusätzlicher achtstündiger Versuch mit einer erreichten Enddosis von 11.52 kJm^{-2} scheint sogar trotz höherer UV-Dosis wieder annähernd das Vierfache des Mycels, wie es zu Beginn der Kultivierung vorgelegen hatte, zu erreichen. Diese Unterschiede konnten auch in den Vitalitätstests (Kap.4.2.3.) bereits festgestellt werden. Stichproben ergaben bei Untersuchungen am CLSM wiederum die unterschiedliche anatomische Struktur der Mycelien und die unterschiedliche Verteilung sowie den unterschiedlichen Gehalt an Gallerte als Grund für das diskontinuierliche Wachstumsverhalten. Dabei sind die äußerlich gleich erscheinenden Mycelien, die in dieser Versuchsreihe verwendet wurden, in ihrem inneren Aufbau grundverschieden. Es überrascht nicht, dass gerade von den 8 verwendeten Pilzproben pro Bestrahlungsgang gerade bei der höchsten UV Dosis die resistentesten Mycelien dicht strukturiert erscheinen, was zur Beobachtung eines von der UV-Strahlung unbeeinflussten Wachstums führen mag. Aufgrund eines dicht gewachsenen Hyphengeflechts und einer gut ausgebildeten Gallerte könnten sie den möglichen negativen Folgen der Strahlung widerstehen und somit annähernd dasselbe stete Wachstum wie die Kontrollversuche erkennen lassen. Die feingliedrigeren Mycelien der Flechte *F. bracteata* mit weniger Gallertmatrix und aufgelockerter Struktur sind offensichtlich etwas mehr von der monochromatischen Strahlung in ihrem Wachstum eingeschränkt, denn nach einer Strahlendosis von 2.88 und 5.76 kJm^{-2} verdoppeln diese nur noch ihre Größe und sogar nach einer Dosis von 11.52 kJm^{-2} verzögert sich die Massenzunahme des Mycels um einen Wachstumsfaktor von 1,7. Man kann in diesem Fall von einem leichten Wachstumsrückgang sprechen. Ähnlichkeiten ergaben auch die

III. Ergebnisse

Vitalitätsuntersuchungen am Mycobionten von *F. bracteata*, so dass durch Strahlung geschädigte Zellen im Mycel offensichtlich auch für das verminderte Wachstum des gesamten Mycels verantwortlich sind.

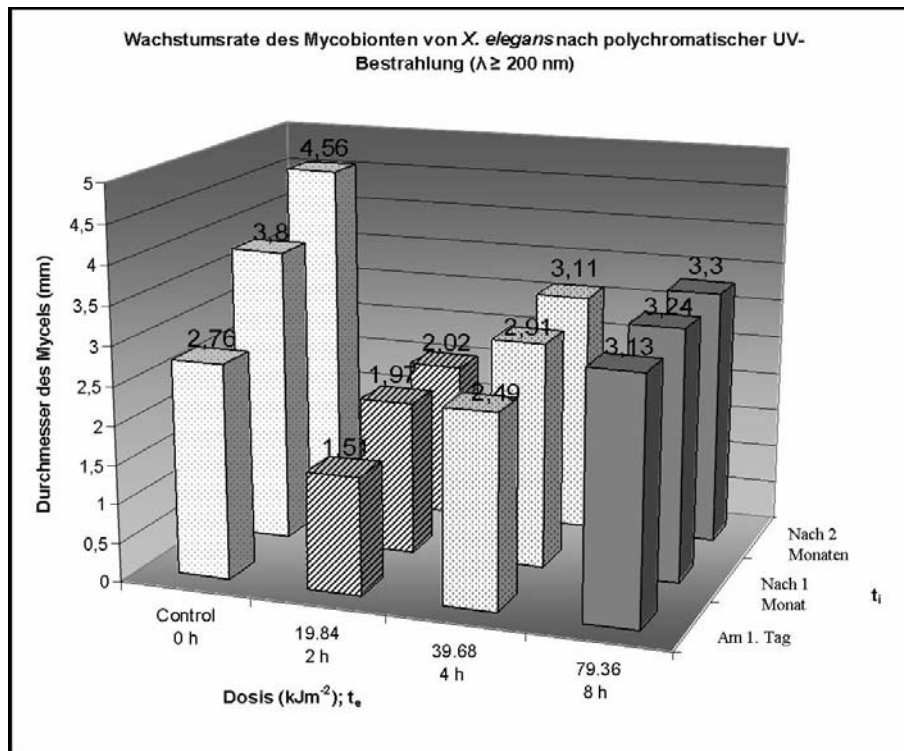
Abb.: 41:



7.2. Wachstum der Mycelien nach polychromatischer UV (A, B, C) Exposition**($\lambda \geq 200$ nm)**

Das Wachstum der Mycelien wird nach Bestrahlung polychromatischer UV Bestrahlung viel stärker beeinflusst (Abb. 42). Während die Mycelien von *X. elegans* nach einer Dosis von 19.84 und 39.68 kJm⁻² nach zwei Monaten Kultivierung nur noch um 1mm in ihrem Durchmesser wachsen (Kontrolle: fast 2 mm) und nach einer maximalen Expositionszeit von 8 Stunden und damit einer Enddosis von 79.36 kJm⁻² nur noch um etwa 0.2 mm wachsen konnten, wird das Hyphenwachstum der Mycelien des Mycobionten von *F. bracteata* bereits bei den niedrigsten Dosen von 19.94 kJm⁻² eingestellt (siehe hierzu Zusammenfassung gleichgearteter Ergebnisse in Abb. 44) . Jedoch schrumpft das Mycel aufgrund möglicher durch Strahlung induzierter Degenerationsprozesse wie beispielsweise durch Apoptose nicht, was bedeutet, dass zumindest das bestrahlte Mycel noch lebensfähig ist, was durch die Ergebnisse der Vitalitätstests auch bestätigt werden kann (Kap.4.2.2.), da nur ein geringfügiger Abfall der Vitalitätskurve registriert wird. Für UV-Tests mit höheren Dosen wurden bewusst Mycelien mit größerem Durchmesser genommen, um einen vor UV-Strahlung schützenden Effekt von zusätzlichem Zellmaterial zu überprüfen. Die isoliert kultivierten Mycelien der Flechten weisen nämlich nur eine sehr geringfügige Produktion von UV-schützenden Sekundär-Metaboliten auf und eine schützende Gallerte kommt nur überwiegend in den Zentralbereichen des Mycels gehäuft vor. Somit konnte man den abschirmenden Effekt von äußeren meist wachstumspotenten Zellen für das Gesamtmycel untersuchen. Dabei konnte hier jedoch festgestellt werden, dass die Zellen sich gegenseitig nur geringfügig vor der offensichtlich wachstumshemmenden Strahlung schützen konnten und viel mehr eine geordnete Struktur sowie die Produktion von UV-absorbierenden sekundären Flechteninhaltsstoffen oder gar einer stark ausgeprägten Gallerte, wie es in der Flechtensymbiose der Fall ist, für einen effizienten UV-Schutz benötigen.

Abb. 42:



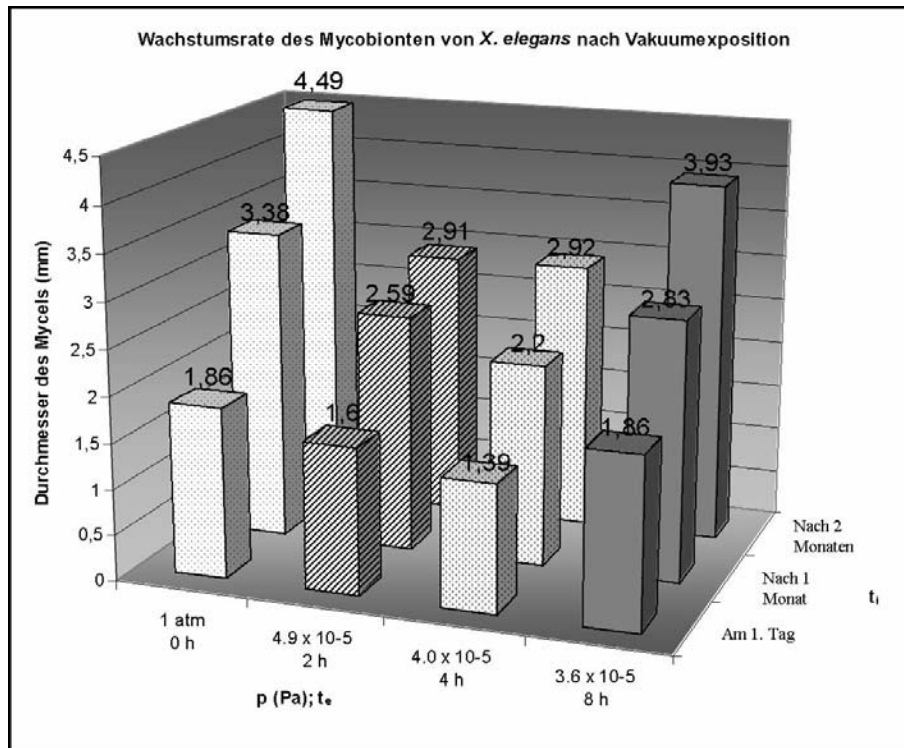
Die wohlstrukturierte Symbiose stellt somit auch einen effizienteren UV-Schutz dar, als es bei dem isolierten Mycobionten nachweisbar ist. Eine weitere Schlussfolgerung ist dabei auch die Notwendigkeit der symbiotischen Assoziation für die Optimierung der UV-Resistenz des Mycobionten beispielsweise durch in der Symbiose gegebener verstärkter Produktion von UV-absorbierenden Stoffen.

7.3. Wachstum der Mycelien nach Niedrigdruck-Exposition (Vakuum)

Die Mycelien des Mycobionten von *X. elegans* sind nach Vakuum-Exposition mit den verschiedenen Niedrigdrücken in ihrem Wachstum kaum gehemmt (Abb. 43). Während der Kontrollwert nach zweimonatiger Kultivierung fast eine Verdreifachung des Mycel-Durchmessers zeigt, so weicht der Wert für den Zuwachs bei den Vakuum-exponierten Mycelien nach zwei Monaten im Verhältnis kaum ab. Auch hier wird nach zweimonatiger Kultivierung – unabhängig von der eingesetzten Vakuum-Dosis - annähernd das Dreifache des Ausgangsmycels erreicht. Bei den Mycelien des Mycobionten von *F. bracteata* war kein Wachstum nach der Vakuum-Exposition feststellbar. Der Durchmesser der Mycelien blieb wie bei den UV-Tests konstant und auch hier war keine Degeneration des vorhandenen Zellmaterials festgestellt worden. Offensichtlich ist der Mycobiont von *F. bracteata* bei zu starker Trockenheit, wie sie durch Vakuum entsteht, und anschließendem Wiederaussetzen

auf Nährmedium nicht mehr in der Lage, neues Wachstum zu induzieren. Die Frage muss hier jedoch gestellt werden, ob die Regenerationszeit der Mycelien innerhalb von zwei Monaten der Kultivierung überhaupt abgeschlossen ist und nicht zu einem späteren Zeitpunkt die Mycelien wieder weiter wachsen können. Im nächsten Kapitel wird abermals deutlich, dass das Vakuum sowie die polychromatische UV-Strahlung der simulierten Weltraumbedingungen dieselben Auswirkungen auf den Mycobionten von *F. bracteata* haben. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle auf das Diagramm in Abb. 44 im nächsten Kapitel verwiesen, welches die Effekte von Vakuum und UV-Strahlung zusammenfasst.

Abb. 43:



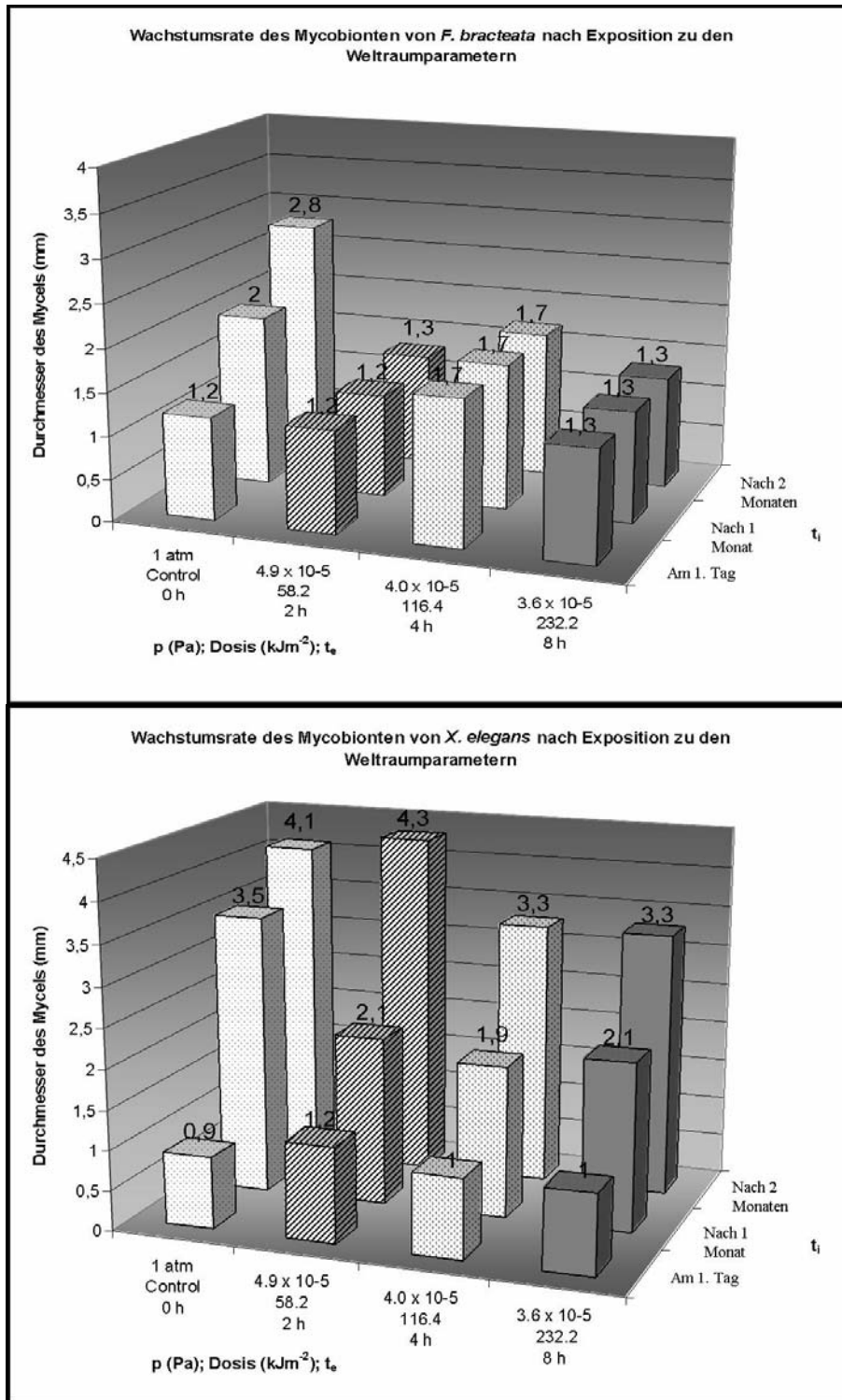
7.4. Wachstum der Mycelien nach Einsatz der Weltraumsimulation (UV und Vakuum)

Während das Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* in Kultur nach der Weltraumsimulation eingestellt wurde und nach zweimonatiger Kultivierung kein nennenswerter Zuwachs des Mycels zu beobachten war, so ergaben die Untersuchungen am Mycobionten von *X. elegans* verhältnismäßig wenig Veränderungen bezüglich ihres Wachstumsverhaltens (Abb. 44). Die Kontrollanalyse ergab nach zweimonatiger Kultivierung eine Vervierfachung des Myceldurchmessers ebenso wie Mycelien der Versuchsreihe nach

III. Ergebnisse

zweistündiger Exposition gegenüber der polychromatischen UV-Strahlung und den vakuumnahen Niederdrücken (Dosis: 58.2 kJm^{-2} , $p = 4.9 \times 10^{-5} \text{ Pa}$). Längere Expositionszeiten unter simulierten Weltraumbedingungen mit einer vier- bis achtstündigen Simulation und einer maximalen Enddosis von 232.2 kJm^{-2} und einem maximal erreichten Niederdruck von $3.6 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ zeigten offensichtlich ein gehemmtes Wachstum, da der Myceldurchmesser nur noch eine Verdreifachung seiner ursprünglichen Größe erreichte. Diese Ergebnisse spiegeln in etwa auch die Ergebnisse der Vitalitätstests wider (Kap. 4.2.4.), wo die Vitalität des Mycobionten von *F. bracteata* in etwa nur noch die Hälfte der Vitalitätswerte des Mycobionten von *X. elegans* nach maximal getesteter UV-Dosis und Vakuumdruck erreichte und ein leichter, kaum erkennbarer Vitalitätsabfall des Mycobionten von *X. elegans* zu beobachten war. Die in diesem Kapitel präsentierten Unterschiede im Wachstumsverhalten der Mycobionten beider Flechten nach der simulierten Weltraumexposition verdeutlichen wiederum das hohe Resistenzpotential des Mycobionten der Hochgebirgsflechte *X. elegans* im Vergleich zu dem Mycobionten der Flechte *F. bracteata* aus der baltischen See.

Abb. 44:



III. Ergebnisse

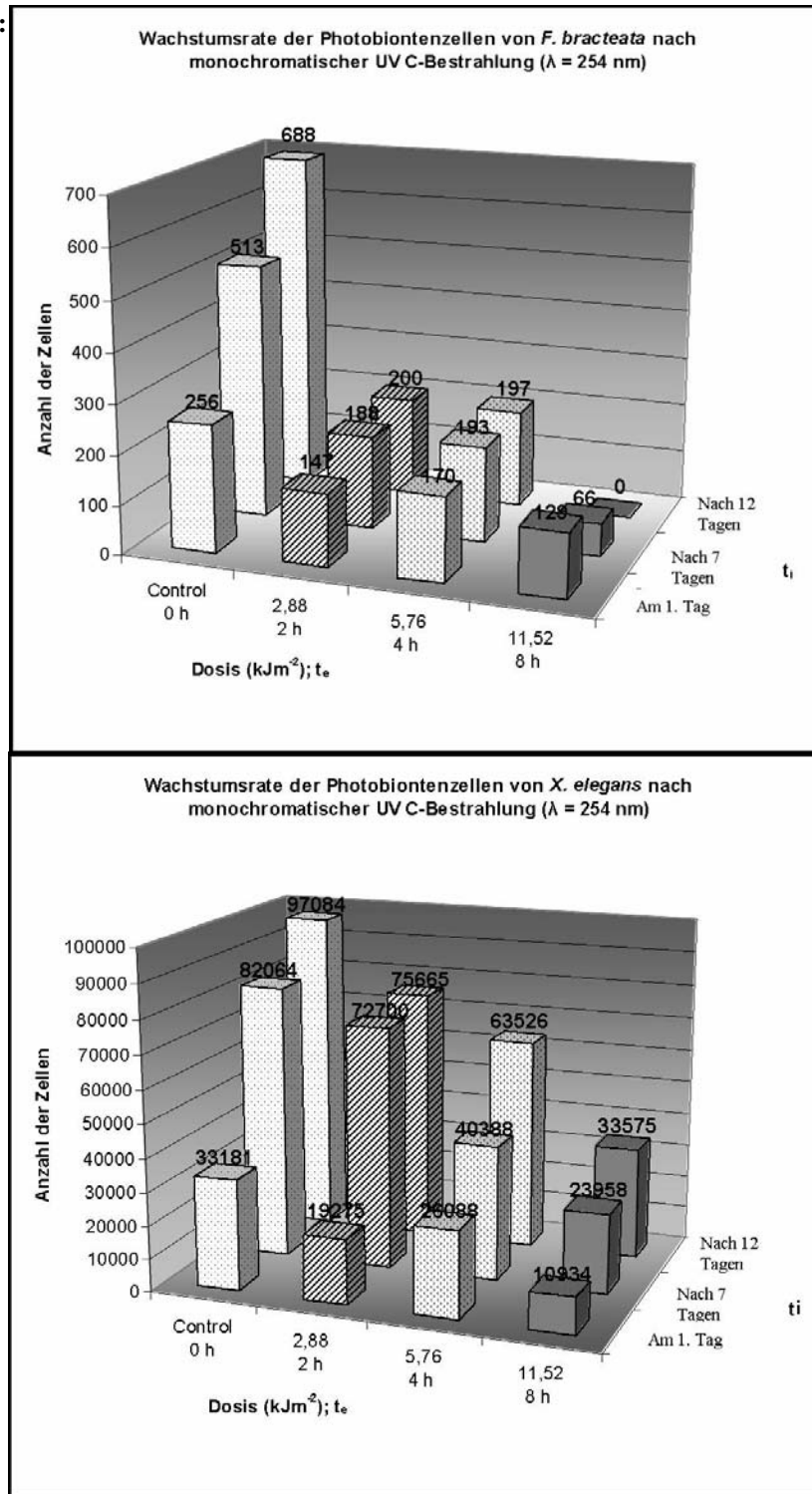
8. Wachstum der Photobionten von *F. bracteata* und *X. elegans*

Die nun folgenden Versuchsreihen erlauben Einblicke in das Wachstumspotential der Photobionten der beiden untersuchten Flechten. Um mögliche Unterschiede gegenüber dem Wachstumsverhalten der Mycobionten als auch gegenüber dem Keimungsverhalten der Ascosporen zu erkennen und die Bedeutung der verschiedenen Bionten in der Flechtensymbiose zu klären, sind diese Versuche essentiell.

8.1. Wachstum der Photobionten nach monochromatischer UV-C Strahlung

Die Kontrollwerte der Photobionten beider Flechten, die durch Kultivierung unter Normalbedingungen ermittelt wurden, zeigten bei beiden untersuchten Bionten annähernd eine Verdreifachung der ursprünglichen Zellmasse (Abb. 45). Die Bestrahlung mit monochromatischem UV-Licht führte jedoch in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis zu mäßiger bis sehr starker Verminderung des Wachstumspotentials beider Photobiontenarten. Während geringe Dosen monochromatischer UV-Strahlung von 2.88 bis 5.76 kJm⁻² bei den Photobionten von *F. bracteata* bereits nur noch eine etwa 36 %ige Massenzunahme zeigten, so fiel der Rückgang im Wachstum der Photobionten von *X. elegans* bei gleichen UV-Dosen weniger stark aus. Hier betrug die Massenzunahme bei einer Dosis von 2.88 kJm⁻² immer noch etwa mit 290 % das drei bis vierfache der Ausgangskultur und sank bei Erhöhung der Dosis auf 5.76 kJm⁻² nur auf das zweifache der Ausgangskultur mit annähernd 125 % Massenzunahme ab. Der etwas höhere Endwert der zweistündigen Tests gegenüber dem Kontrollwert trotz geringerer Ausgangszellmasse kann durch eine erhöhte Clusterfrequenz in den Kulturen der bei dem zweistündigen Versuch verwendeten Proben erklärt werden. Die maximal getestete Dosis von 11.52 kJm⁻² der monochromatischen UV-Strahlung führte sogar bei den Photobionten von *F. bracteata* zu einer negativen Wachstumsrate, so dass ein kontinuierlicher Zellrückgang zu erkennen war, der nach 12tägiger Kultivierung nur noch die 100%ige Degenerierung der ursprünglichen Zellmasse zeigte. Der hier beschriebene kontinuierliche Zellrückgang kann auf den geringen Gehalt an schützenden Zellclustern in der Ausgangskultur zurückgeführt werden. Die Photobionten von *X. elegans* mit ebenfalls wenigen Zellclustern wiesen jedoch bei gleicher Dosis immer noch eine Verdreifachung der Zellmasse auf und sind gegenüber den hier getesteten Dosen der monochromatischen UV C-Strahlung resistenter als die Photobionten von *F. bracteata*.

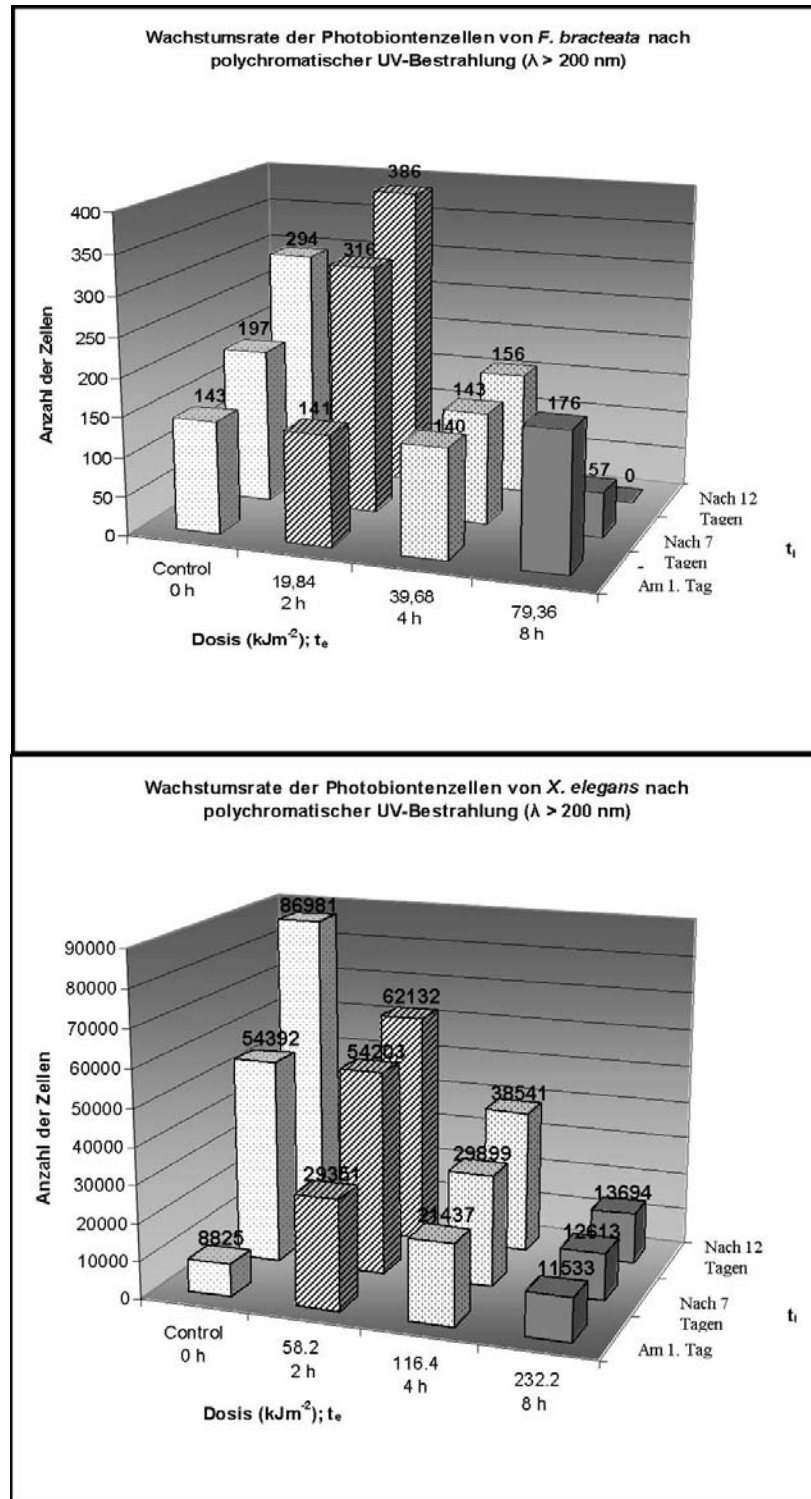
Abb. 45:



8.2. Wachstum der Photobionten nach polychromatischer UV-Strahlung (A, B, C)

Höhere Dosen polychromatischer UV Strahlung bei gleichen Expositionszeiten, wie sie bei den Tests mit monochromatischer UV Strahlung erfolgten, führten zu einem stärker eindämmenden Effekt beim Wachstum der Photobionten beider Flechten. Der Zellzuwachs nahm bei den Photobionten von *F. bracteata* nach einer Expositionszeit von 2 Stunden und einer Dosis von 19.84 kJm^{-2} bereits ab, während der Zellzuwachs der Photobionten von *X. elegans* unbeeinflusst blieb und aufgrund höherer Clusterfrequenz in den Ausgangskulturen sogar eine Zellzunahme über dem Kontrollwert zeigte. Das bedeutet, dass der Photobiont *Trebouxia* von *F. bracteata* hier immer noch einen 100%igen Zellzuwachs und somit eine Verdoppelung seiner Zellmasse nach 12 Tagen Kultivierung hatte, während der Photobiont von *X. elegans* sogar eine annähernde Verdreifachung mit 270 %igem Zellzuwachs vorweisen konnte. Höhere Dosen der polychromatischen UV-Strahlung (39.68 bis 79.36 kJm^{-2}) führten bei den Photobionten von *F. bracteata* zu einer noch stärkeren Hemmung des Wachstums (siehe Abb. 46) bis zu einer Beendigung oder gar einem negativem Wachstum. Das Wachstum der Photobionten von *X. elegans* wurde ebenfalls stark gehemmt, war aber immer noch nachweisbar. So erreichten die Kulturen bei einer Maximaldosis von 79.36 kJm^{-2} nach achtstündiger Bestrahlung und zwölfzügiger Kultivierung immer noch einen 19%igen Zuwachs ihrer Zellmasse. Abermals bestätigt sich das höhere Resistenzpotential der Photobionten von *X. elegans* gegenüber den Photobionten von *F. bracteata*. Jedoch erscheint der Photobiont von *X. elegans* im Vergleich zum Mycobionten derselben Flechte anfälliger gegenüber der eingesetzten polychromatischen UV-Strahlung.

Abb. 46:

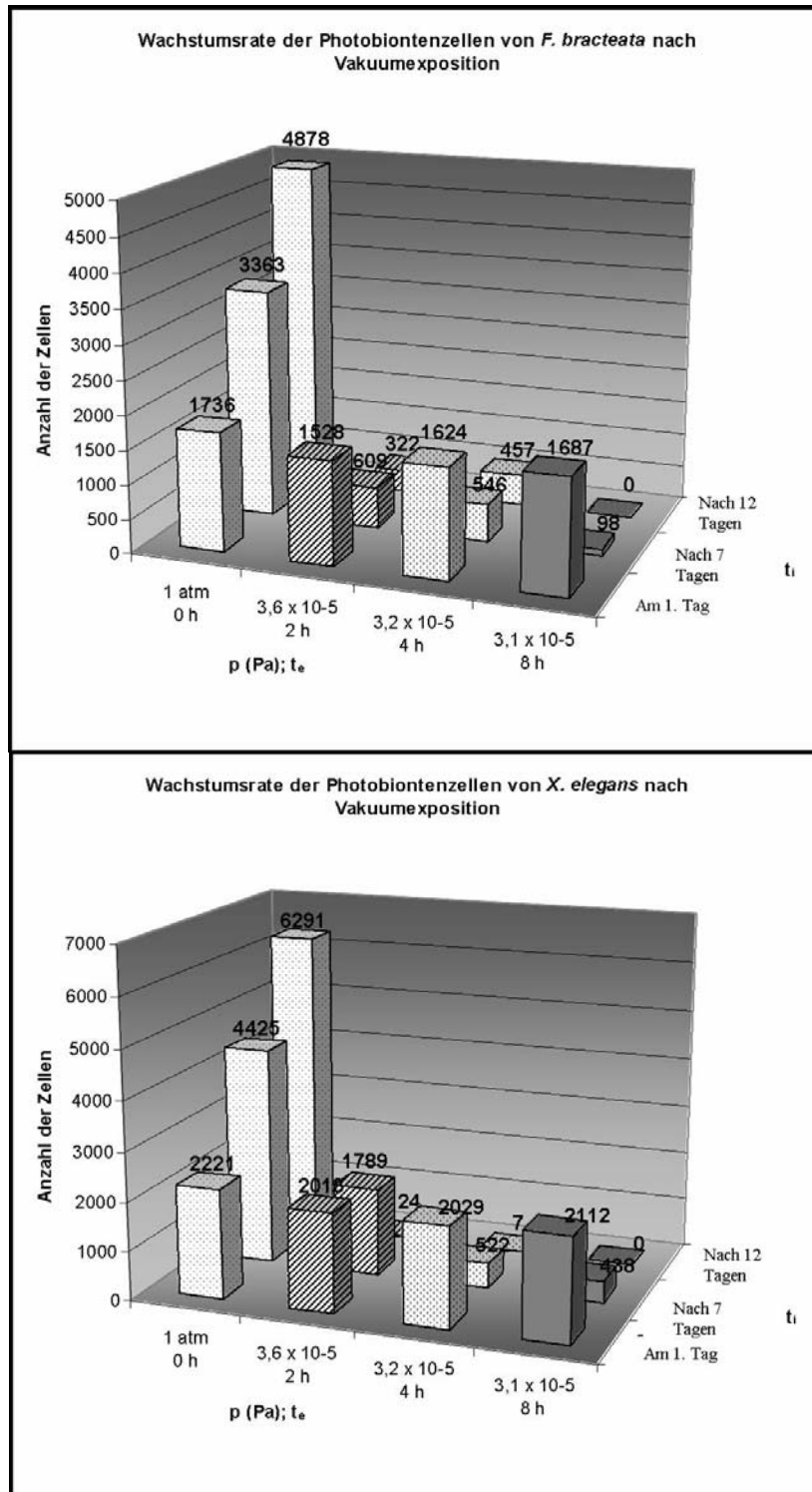


8.3. Wachstum der Photobionten nach Vakuumexposition

Der Trend der Hemmung des Wachstums der Photobionten beider Flechten setzt sich ebenfalls bei dem bei den Vakuumtests auftretenden Niedrigdrücken fort. Während die Kontrolle bei den Photobionten beider Flechten abermals die standardmäßige Verdreifachung der Zellmasse erfuhr, so nahm die Zellmasse bereits nach zweistündiger Vakuumexposition mit einem Niedrigdruck von 3.6×10^{-5} Pa aufgrund von Degenerationsprozessen sogar ab (Abb. 47). Die Abnahme steigerte sich sogar bis zur absoluten Degeneration aller Zellen, so dass der Nullwert bei einer achtstündigen Exposition mit einem Niedrigdruck von 3.1×10^{-5} Pa erreicht wurde. Die Zellmassenabnahme der Photobionten-Kulturen von *F. bracteata* nahm im Vergleich zu den Photobionten-Kulturen von *X. elegans* stärker ab. Während bei *X. elegans* nach zweistündiger Vakuumexposition und nach 7 Tagen Kultivierung immer noch mehr als die Hälfte der Zellen von der Ausgangskultur im Mikroskop sichtbar waren, so hatte die Zellmasse der Photobionten von *F. bracteata* um mehr als das Zweieinhalbfache abgenommen. Man konnte in dieser Versuchsreihe zudem sehr deutlich im Verhältnis zu den Versuchen mit den Flechtenthalli, Fruchtkörpern und Mycobionten die Veränderung der erzielten niedrigeren Drücke erkennen. Die Drücke waren bei den Versuchen mit den Photobionten um einiges niedriger als bei den Versuchsreihen mit den Mycobionten und Flechten. Das bedeutet, dass der Wasserentzug aus der Zellmasse effizienter bei den isolierten Photobionten erfolgte als die in Gallertmatrix eingebetteten Mycobionten und in den Flechtenthalli eingebundenen Bionten. Die Vermutung liegt somit nahe, dass der beim Abpumpen erzielte niedrigere Niedrigdruck einem geringeren Wasserdampfdruck durch Entweichen aus den Proben zu verdanken ist, wie es bei den Versuchen mit den Flechten und den Mycobionten zu beobachten war. Die Photobionten und ihre durch eine Grundmatrix gebildeten Cluster waren somit nicht fähig im gleichen Maße das lebensnotwendige Wasser zu binden, wie es in der Symbiose oder beim Pilz der Fall gewesen wäre. Die Zellabnahme spiegelt hier ebenfalls die Ergebnisse aus den Vitalitätstests wider, denn im Falle der Photobionten-Kulturen von *F. bracteata* zeigte diese Versuchsreihe auch eine Vitalitätsabnahme bis auf 0 % Vitalität an und eine geringere Vitalitätsabnahme erfolgte bei den Photobionten-Kulturen von *X. elegans*, die nur ein verzögertes Erreichen des Nullwertes anzeigte. Beide Methoden, nämlich die Fluoreszenzanalyse und die Vermehrungsfähigkeit der Bionten sind somit sich ergänzende Methoden für die Ermittlung der effizienten Vitalität. Stoffwechselaktivität, Apoptose und Wachstum sind in dieser Arbeit sich nicht

ausschließende Faktoren, sondern spiegeln sich in den hier angewendeten unterschiedlichen Methoden wider.

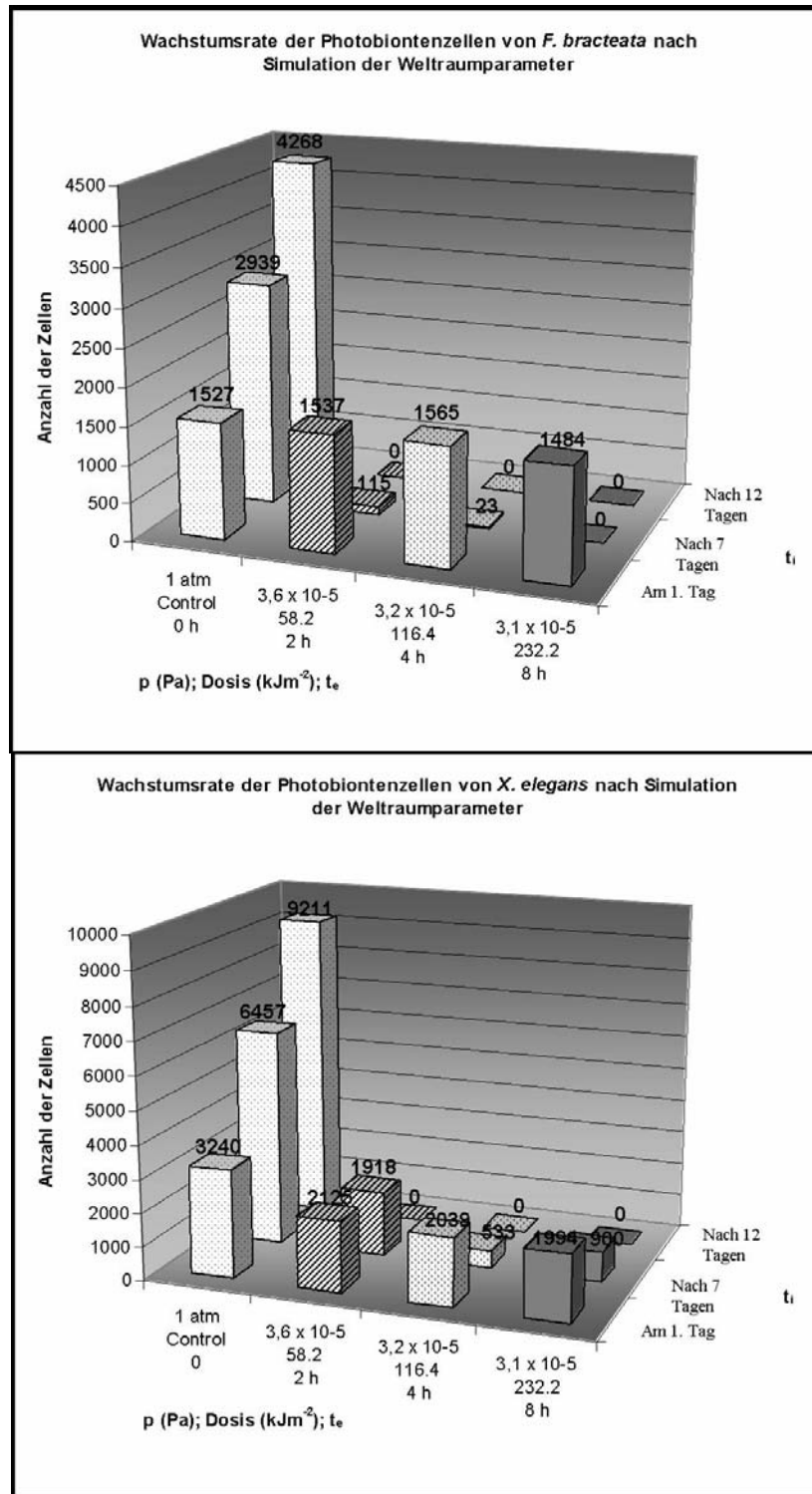
Abb. 47:



8.4. Wachstum der Photobionten nach Einsatz der Weltraumsimulation (UV und Vakuum)

Wie erwartet, ergab die Weltraumsimulation einen verstärkten negativen Effekt auf die Wachstumsfähigkeit der untersuchten Photobionten beider Flechten (Abb.48). Die Zellmasse der Photobionten der Flechte *F. bracteata* ist bereits bei zweistündiger Exposition unter Weltraumbedingungen mit einer UV-Dosis von 58.2 kJm^{-2} und einem Vakuumdruck von $3.6 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ sowie nach siebentägiger Kultivierung gegenüber den Ausgangswerten zu Beginn der Versuchsreihe um etwa ein zehnfaches reduziert. Nach 12 Tagen sind bereits alle Zellen degeneriert und kein Wachstum konnte den Negativtrend ausgleichen. So ist auch erklärbar, dass bei höheren UV-Dosen von 116.4 kJm^{-2} bis 232.2 kJm^{-2} und einem niedrigeren Vakuumdruck von $3.2 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ bis $3.1 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ sehr viel mehr Zellen geschädigt sind und die Nullwerte bereits bei einer Kultivierungszeit von 7 Tagen erreicht wurden. Die Photobionten von *X. elegans* sind abermals resistenter gegenüber den Bionten von *F. bracteata*, da eine verzögerte Degeneration beobachtbar ist. Im Falle stärkerer UV-Dosen (zwischen 116.4 kJm^{-2} und 232.2 kJm^{-2}) und einem niedrigeren Vakuumdruck ($3.2 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ bis $3.1 \times 10^{-5} \text{ Pa}$) erreicht die ursprünglich eingesetzte Zellanzahl erst nach zwölf-tägiger Kultivierung den Nullwert. Aber hier ist ebenfalls eine vollständige Degeneration der Zellen zu beobachten und zusammenfassend kann der Schluss gezogen werden, dass die isolierten Photobionten beider untersuchten Flechten hohe UV-Dosen und niedrige Vakuumdrücke, wie sie im Weltraum vorkommen, nicht überleben können. Diese Ergebnisse werden gleichfalls durch die Ergebnisse der Fluoreszenzanalysen am CLSM mit Hilfe der LIVE/DEAD-Farbstoffe bestätigt (Kap. 4.3.4.).

Abb. 48:



III. Ergebnisse

8.5. Molekulare Analyse zur Artbestimmung der Photobionten von *X. elegans*

Um zu klären, ob die Unterschiede in der Resistenz der Photobionten beider Flechten gegenüber den angewendeten Parametern aufgrund der Präsenz zwei verschiedener Photobiontenarten in beiden Flechten begründet ist, wurden durch die Analyse der ITS 1 und ITS 2 (Intertranscriptive Spacer) die rDNA Bereiche charakterisiert. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Bereiche besonders gut geeignet sind, um Verwandtschaftsverhältnisse von Grünalgen, besonders innerhalb der Gattung *Trebouxia*, aufzuklären (Friedl 1996, Schaper 2003a, b). Die ITS rDNA Bereiche sind ausreichend sensibel, um sowohl innerartliche als auch zwischenartliche Variationen aufzudecken, bei gleichzeitig ausreichender Konservierung bestimmter Genbereiche.

Alignment 1: Photobionten der Gattung *Trebouxia* Clade I, 2. Untergruppe (TS26FulBra = *Fulgensia bracteata* vom Standort Sundre; bekannt auch aus *Buellia elegans*; bestimmt nach Schaper 2003) im Vergleich zu Photobionten von *Xanthoria. elegans* (ContigXeDol). Maximal zwei Basen sind ausgetauscht.

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5         15         25         35         45         55
TS26FulBra TCATTGAATC TATCGTGCCC ACACCGCGAA ACTACTTATG CCCTTCTGGA ACAGGCAAAAC
ContigXeDol -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Clustal Co  *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      65         75         85         95         105        115
TS26FulBra TTTATTGTTT GCCCTTCAGT TGGCGAGGTC AGGGCTGGCC TCCTTTTGGT GTCAGTTGAC
ContigXeDol TTTATTGTTT GCCCTTCAGT TGGCGAGGTC AGGGCTGGCC TCCTTTTGGT GTCAGTTGAC
Clustal Co  *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      125        135        145        155        165        175
TS26FulBra TTGACTGGGC GGGTCCAATA CCAGCCGGAT TCACCTTGCC TTCTAGGCCT GGGGTTCTGC
ContigXeDol TTGACTGGGC GGGTCCAATA CCAGCCGGAT TCACCTTGCC TTCTAGGCCT GGGGTTCTGC
Clustal Co  *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      185        195        205        215        225        235
TS26FulBra CGGCTGTGAG GGGTGGCTGT TTAACTCACT TTAAGCAATC AATTCTGAAG GCAGATCTAT
ContigXeDol CGGCTGTGAG GGGTGGCTGT TTAACTCACT TTAAGCAATC AATTCTGAAG GCAGATCTAT
Clustal Co  *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      245        255        265        275        285        295
TS26FulBra AGGCTGGCTA TGCTGGCTGT AGTCTGATTA AATATAGACA ACTCTCAACA ACGGATATCT
ContigXeDol AGGCTGGCTA TGCTGGCTGT AGTCTGATTA AATATAGACA ACTCTCAACA ACGGATATCT
Clustal Co  *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      305        315        325        335        345        355
TS26FulBra TGGCTCCCGT AACGATGAAG AACGCAGCGA AATGCGATAC GTAGTGTGAA TTGCAGAATT
ContigXeDol TGGCTCCCGT AACGATGAAG AACGCAGCGA AATGCGATAC GTAGTGTGAA TTGCAGAATT
Clustal Co  *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      365        375        385        395        405        415
TS26FulBra CCGTGAACCA TCGAATCTTT GAACGCAAAAT TGCGCTCGAG GCCTCGGCCA AGAGCATGTC
ContigXeDol CCGTGAACCA TCGAATCTTT GAACGCAAAAT TGCGCTCGAG GCCTCGGCCA AGAGCATGTC
Clustal Co  *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      425        435        445        455        465        475
TS26FulBra TGCTCAGCG TGCGTACTA CCTCAACTA AGTTTCCTAT ACACATAGGG GATGCGGGTT
ContigXeDol TGCTCAGCG TGCGTACTA CCTCAACTA AGTTTCCTAT ACACATAGGG GATGCGGGTT
Clustal Co  *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      485        495        505        515        525        535
TS26FulBra GGATCTGGCC GTCCGGTTTG CCTTTTAGGT TGCCGGTCAG CTGAAATACA TTCACGCTCT
ContigXeDol GGATCTGGCC GTCCGGTTTG CCTTTTAGGT TGCCGGTCAG CTGAAATACA TTCACGCTCT
Clustal Co  *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      545        555        565        575        585        595
TS26FulBra GGGGGCTGCT TTCCTTCCGA GGAGAGGCGA GTTCCGATTG GGTAGGTGAC CTTTGGCCGGT
ContigXeDol GGGGGCTGCT TTCCTTCCGA GGAGAGGCGA GTTCCGATTG GGTAGGTGAC CTTTGGCCGGT
Clustal Co  *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      605        615        625        635        645        655
TS26FulBra TGCATGCCCTT CGTTGCCCGT TAAGCTTTCC AGTATGCGTT GTGCAGGACG CCTTTTGGCT
ContigXeDol TGCATGCCCTT CGTTGCCCGT TAAGCTTTCC AGTATGCGTT GTGCAGGACG CCTTTTGGCT
Clustal Co  *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|

      ....|.....| .....|
      665        675
TS26FulBra TTGCACCTGA GGTCA
ContigXeDol T-----|-----|

```

Die Charakterisierung des Photobionten von *F. bracteata* vom Standort Sundre auf Gotland erfolgte bereits durch Schaper (2003a, b). Die dort erzielten Daten werden mit den in der hier vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen bzgl. der Sequenzen des Photobionten von *X. elegans* gegenübergestellt. Die Gegenüberstellung der Sequenzen zeigte, dass es nur einen Austausch von zwei Basenpaaren gibt und es sich bei dem Photobionten sowohl von *F. bracteata* als auch von *X. elegans* um *Trebouxia spec.* Clade I, 2. Untergruppe handeln muss (siehe Alignment 1).

9. Ergebnisse der simulierten Asteroiden-Impact-Versuche (10 GPa bis 50 GPa)

Während die bisher vorgestellten Versuchsserien sich auf die Resistenzfähigkeiten des 3-Komponentensystems, nämlich der isolierten Bionten und der Flechtensymbiose, gegenüber der Strahlung und den Niedrigdrücken konzentrierten, so wird in der nun folgenden Versuchsreihe in einem astrobiologischen Exkurs die Überlebensfähigkeit der lichenisierten Bionten nach simulierten Hochdrücken und damit auftretenden hohen Temperaturen, wie sie bei Asteroideneinschlägen auftreten können, getestet. In dieser Fragestellung soll einerseits das Potential und somit die Fähigkeit der Symbiose am extremen Limit überleben zu können, geklärt werden, und andererseits die astrobiologische Fragestellung der Überlebensfähigkeit nach Asteroideneinschlägen und die Möglichkeiten einer anschließenden, erfolgreichen Panspermie erörtert werden. Diese Versuchsreihe stellt auch eine Erweiterung eines bereits im Jahre 2001 erfolgten Versuchs mit Prokaryota dar (Horneck et al. 2001a), da erstmals ein eukaryotischer Organismus und zudem ein eukaryotisches, symbiotisches System für diesen Test verwendet wird. Die folgenden Kapitel präsentieren die Ergebnisse der am Ernst Mach Institut der Fraunhofer Gesellschaft erfolgten Sprengversuche und geben erste Einblicke in die Möglichkeit der Katastrophenresistenz komplexerer Lebensformen.

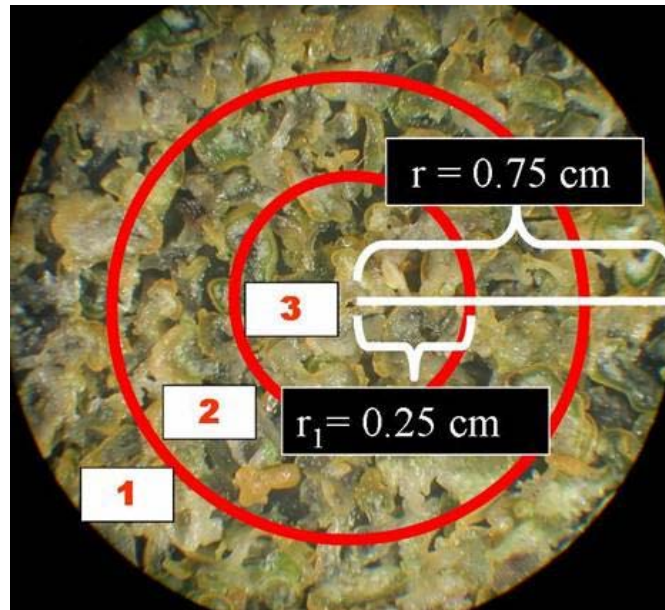
9.1. Ergebnisse der Strukturanalyse des gesamten Flechtengewebes

Die wie in Abb. 49 gezeigte grobe Einteilung der Gabbroplättchen in Teilringe, die durch eine Aufteilung des Gesamtradius mit $r = 0.75$ cm in jeweils kleine 0.25 cm, von 1 bis 3 durchnummerierte Untereinheiten entsteht, diente der Analyse möglicher Unterschiede der Struktur sowie der Vitalität der getesteten Flechtenproben. Die Stoßwelle könnte auf dem Weg durch den Gabbro verschiedene Effekte auf die Flechten vom Zentrum bis an den Rand

III. Ergebnisse

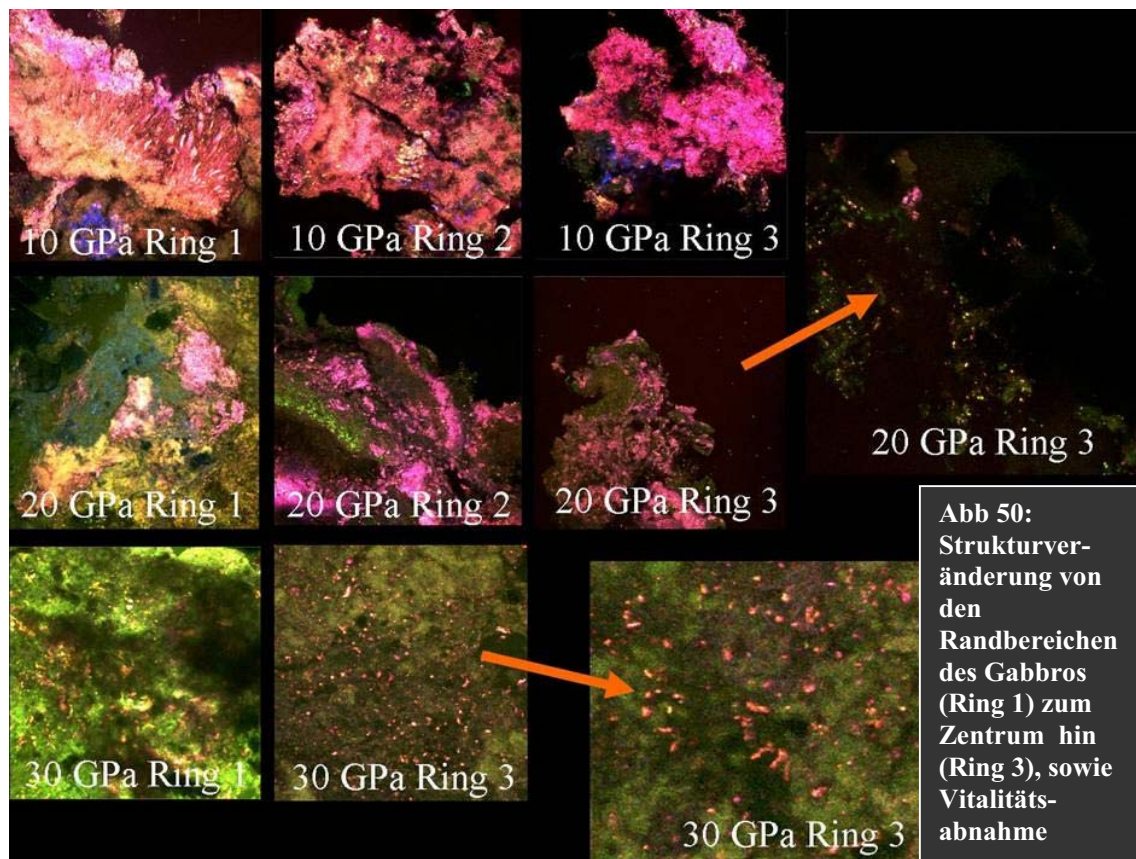
der Gabbroplättchen gehabt haben. Dies soll hier genauer untersucht werden und dabei die Veränderungen der anatomischen Struktur der Flechtenthalli geklärt werden.

Abb. 49:
Aufteilung der Gabbro-Plättchen in 3 Ringe, wo nach dem Stoßwellen-Experiment die Gesteins-splitter in den einzelnen Ringen von 1 bis 3 auf das Vorhandensein der Proben und den Grad der Vitalität analysiert werden.



Wie unschwer aus Abb. 50 erkennbar wird, bleibt die Thallus- bzw. Fruchtkörperstruktur nach einem Stoßwellendruck von 10 GPa bis 15 GPa in den Randbereichen der Gabbroplättchen überwiegend erhalten und wird zum Zentrum hin zunehmend unstrukturierter. Erklärungen könnten Bilder der Reflexionsbildanalyse geben. Hierbei wurde erkennbar, dass ein hoher Anteil an Gallerte in den Randbereichen auftrat. Vermutlich verhielt sich die Gallerte aller Flechtenproben während des Schockzustands wie ein Fluidum, das beim Aufprall der Fire-Plate auseinandergedrückt wurde und sich am Rand aufgrund des umgebenden Eisenmantels des Probencontainers aufstauen und ansammeln konnte. Die Struktur der dort liegenden Proben war somit wie in einem wattierten Medium eingepackt und konnte dadurch konserviert dem hohen Druck standhalten. Der ehemals geordnete Zellverband der zentral liegenden Flechtenproben war jedoch hiermit kurzzeitig von der Gallertmatrix befreit und damit anfälliger gegenüber der Schockwelle. Es zeigen sich in Ring 2 oft Risse in den Flechtenthalli und in Ring 3 sehr stark destrukturierte Thalli, bei denen die Aufteilung in Rinde, Algenschicht und Mark praktisch nicht mehr sichtbar wird. Wirkt ein höherer Druck von 20 GPa auf die Flechte ein, so setzt auch bereits eine Destrukturierung des Thallus in den äußeren Ringen des Gabbroplättchens ein. Unterschiede gibt es dabei in der Vitalität (siehe Kap. 9.2). Außerdem sind im Zentralbereich teilweise nur

noch vereinzelte Pilzhyphen oder Ascosporen zu erkennen. Bei einem Druck von 30 GPa findet man keine strukturellen Unterschiede zwischen den Teilringen. In allen Teilringen war



die ursprüngliche Zellordnung einer chaotischen Verteilung gewichen. Höchstens in der Art der Zellen waren wenige Unterschiede erkennbar. So fand man in den Randbereichen des Gabbros noch vereinzelt Algencluster zwischen wenigen Hyphen, während im Zentrum bereits nur noch sehr wenige Hyphen und Ascosporen chaotisch verteilt und unbeschädigt waren. Bei einem Druck von 40 GPa und 50 GPa war von der ursprünglichen Thallusstruktur der Flechtenproben in keinsten Weise etwas erhalten geblieben und nur wenige Asci gefüllt mit Sporen oder wenige verstreute Ascosporen waren noch sichtbar (Abb. 51 + 52).

9.2. Vitalitätstests mit Live/Dead-Kit FunI

Die Vitalitätstests ergaben bereits vor der prozentualen Erfassung visuelle Unterschiede in der Fluoreszenzverteilung. Während bei der Asteroideneinschlags-Simulation mit einem Druck von 10 GPa der größte Teil der Mycobionten- und Algenzellen positive Fluoreszenzsignale des Farbstoffs FUN I für lebende Zellen besaß, so nahm die Anzahl der Fluoreszenzsignale

III. Ergebnisse

bei zunehmenden Druck kontinuierlich ab, so dass bei 40 GPa und 50 GPa letztendlich nur noch wenige vitale Sporen erkennbar waren (Abb. 51 + 52). Interessanterweise konnte man

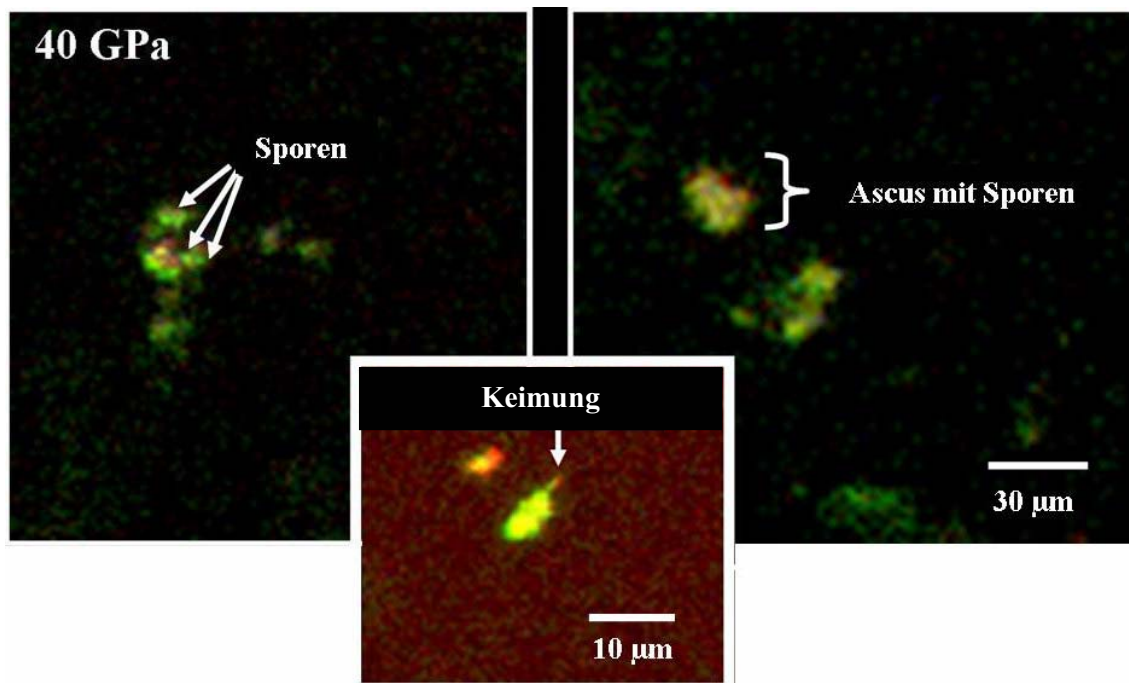


Abb. 51: Bei einem Druck von 40 bis 50 GPa überleben nur noch Sporen oder Sporencluster in Ascus-Anordnung. Vereinzelt sind auch Sporen fähig, im vom Flechtengewebe durch die Schockwelle bewirkten, ausgetretenen Wasser zu keimen.

bei einem Druck von 20 GPa ebenfalls Unterschiede in der Vitalitätsverteilung zwischen den Randbereichen und dem Zentrum des Gabbros erkennen. Der äußerste Ring zeigte bedeutend mehr grüne und rote Fluoreszenzsignale, die vitale Zellen markierten, als im Zentralbereich. Je mehr die Beobachtung mit dem CLSM den Zentralbereich fokussierte, umso weniger vitale Zellen waren detektierbar. Dieser zusätzliche Unterschied in der Vitalität war aber nur nach den Tests mit einem Druck von 20 GPa zu beobachten. Eine Randbeobachtung konnte auch nach den Asteroiden-Tests mit den höchsten Drücken gemacht werden. So trat bei den 40 GPa und 50 GPa-Simulationen aus den Flechtenproben das gesamte gebundene Wasser aus, was bei der Öffnung der Probenzylinder in der Werkstatt des DLR erkennbar wurde. Sporen, die in diesem Wasser während des Transports und zwei Tagen Lagerung bei Raumtemperatur gelegen hatten, schienen auszukeimen. Genauere Untersuchungen hinsichtlich der

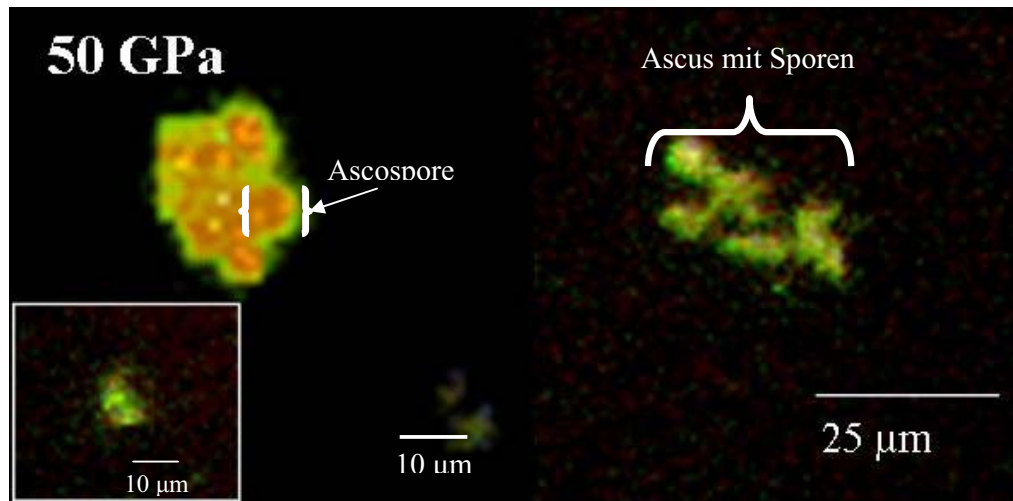


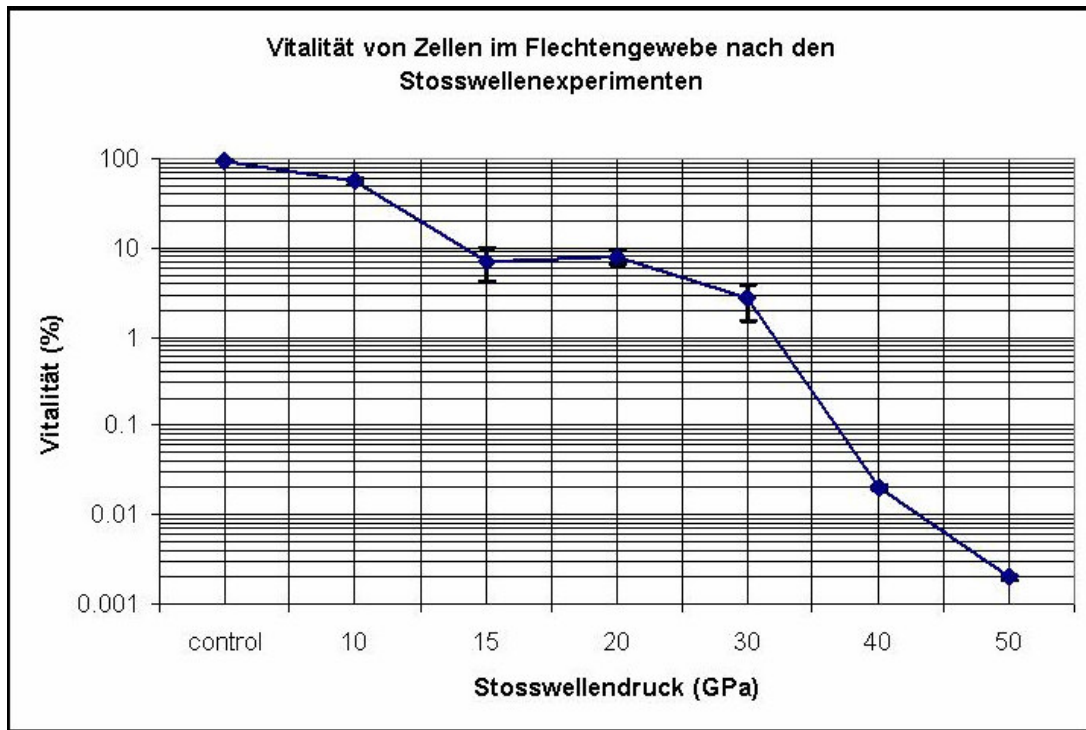
Abb. 52: Dipolare Ascosporen von *X. elegans* mit FUN I gefärbt. Einlagerung von Stoffwechselprodukten in den Vakuolen sind rot gefärbt (63 fache Vergrößerung, Auflösungsgrenze).

Keimungsfähigkeit der Sporen konnten jedoch aufgrund der limitierten finanziellen Mittel nicht gestartet werden, da dies zudem weitere teure Simulationssprengungen erfordert hätte.

9.2.1. Prozentualer Anteil des vitalen Flechtengewebes

Nach der Auswertung aller CLSM-Bilder der Gabbrooberfläche konnte man aufgrund der Fluoreszenzanalyse und des ermittelten Verhältnisses zwischen lebendem und totem Zellmaterial der Flechtenthalli und Fruchtkörper erkennen, dass sich der logarithmische Kurvenverlauf der Vitalität in Prozent in zwei sehr deutliche Phasen gliedert (Abb. 53). Der zwischen Kontrolle und 15 GPa erkennbare Sattel in der Kurve zeigt einen nur geringen Einfluss der experimentellen Bedingungen auf die Vitalität der Proben bei einem Druck von 10 GPa an, während ein steilerer Abfall der Kurve von 10 GPa nach 15 GPa von einem

Abb. 53

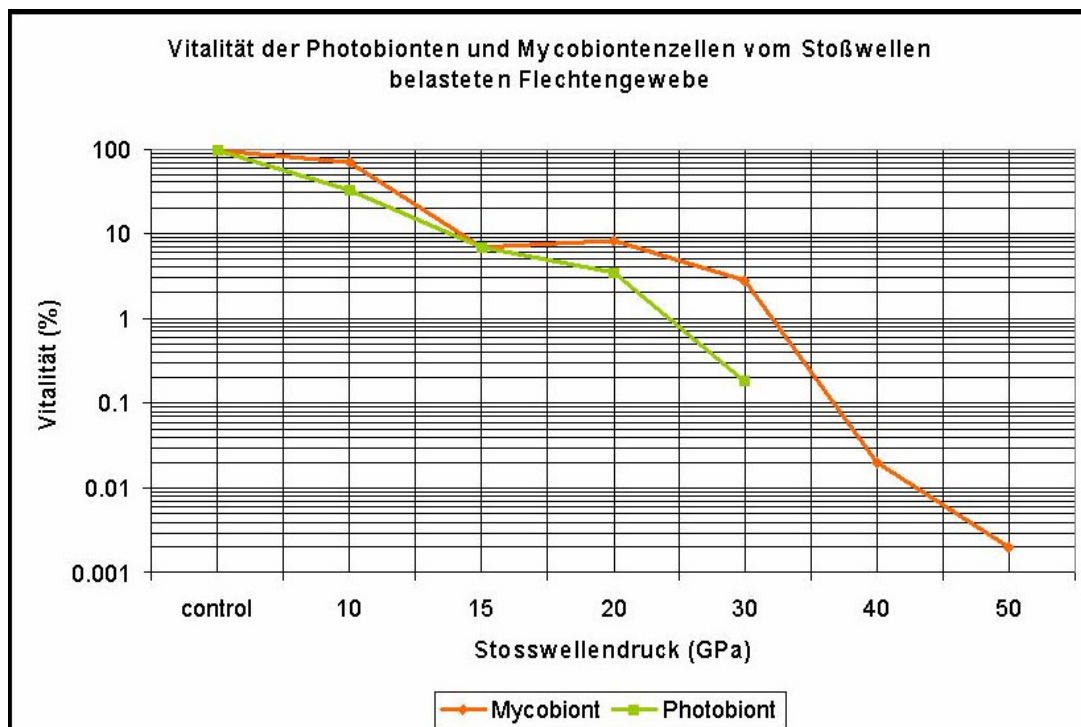


deutlich einschränkenden Effekt der höheren Drücke simulierter Asteroideneinschläge auf die Vitalität zeugt. Trotzdem sind immer noch annähernd 10 % der eingesetzten Zellmasse aller Flechtenproben vital. Dieser erste Sattel deckt sich zudem mit der beobachteten Desintegration der Struktur des Flechtengewebes nach einem ausgeübten Druck von 15 GPa. Nach 20 GPa erkennt man ebenfalls keinen Unterschied in der Struktur oder der Vitalität gegenüber den Versuchsergebnissen bei 15 GPa und die Werte sind annähernd gleich. So stagniert die Vitalitäts-Kurve um den Wert von 10 %. Jedoch fällt die Kurve bei einem höheren Druck von 30 GPa wieder auf den Wert von 2 % Vitalität etwas steiler ab, erzeugt somit einen zweiten Sattel zwischen 15 und 30 GPa und ist mit der noch erhaltenen Anzahl von überlebenden Hyphen zu interpretieren. Der starke Abfall der Vitalitäts-Kurve bei den hohen Drücken von 40 und 50 GPa wurde nicht zuletzt wegen der kurzzeitig erreichten hohen Temperaturen erwartet, aber es überraschte jedoch, dass der Nullwert nicht erreicht werden konnte. Es überlebten immer noch Sporen und sogar vollständige Sporenträger, die Asci (0,002 % der ursprünglichen Zellmasse des Mycobionten).

9.2.2. Prozentualer Anteil der vitalen Myco- und Photobionten

Bei genauerer Betrachtung durch Unterscheidung der Vitalität der beide in der Flechtensymbiose befindlichen Bionten ergab sich beim Mycobionten praktisch ein fast identischer Kurvenverlauf, bei dem die selben Phasen, wie in Kapitel 9.2.1. bereits aufgeführt, erkennbar wurden (Abb. 54). Dieser praktisch identische Kurvenverlauf lässt sich jedoch sehr leicht erklären, da zwischen 70 % und 80 % der Flechte aus Hyphen und Ascosporen und somit Zellen des Mycobionten bestehen. Der Kurvenverlauf der logarithmischen Funktion des prozentualen Anteils an Vitalität der Photobionten ergab jedoch annähernd einen fast linearen Abfall und wurde nach einem Druck von 40 GPa abgebrochen, da keine Photobionten diesen Druck sowie die damit kurzzeitig erzielten Temperaturen überlebt hatte und der Nullwert in einer logarithmischen Präsentation mathematisch nicht definiert ist. Die Photobionten sind die sensitiven Bionten in einer Flechte. Das Resistenzpotential ist auch hier sehr stark eingeschränkt. Ein hoher Druck schädigt die Photobionten, vergleichbar den Ergebnissen nach UV-Bestrahlung und Vakuumexposition. Sie können jedoch in der Symbiose noch bis zu einem Druck von 30 GPa zu annähernd 0.2 % überleben. Jedoch sind Schockwellenexperimente mit höheren Drücken und Temperaturen trotz symbiotischer Integration der Photobionten in das Hyphengeflecht des Mycobionten, und somit in den

Abb. 54



Flechtenthallus, für die Vitalität und die Überlebensfähigkeit der Photobionten so schädlich, dass keine photosynthetisch aktiven eukaryotischen Zellen diese extremen Bedingungen mehr überleben können.

In diesem Zusammenhang wären Schockwellenexperimente mit isolierten, nicht in Symbiose befindlichen Bionten sicherlich für die Resistenz der einzelnen Bionten von großem Interesse gewesen, konnten jedoch bedingt durch experimentelle und finanzielle Einschränkungen nicht ergänzend durchgeführt werden.

10. DNA-Photoprodukte nach Bestrahlung der Flechte *X. elegans* und ihrer isolierten Bionten

In dieser Versuchsreihe wurde der Frage nachgegangen, ob durch UV-Strahlung möglicherweise DNA-Schäden induziert wurden und in welchem Maße sie sich in der Symbiose als auch in den isolierten Bionten unterscheiden. Dies soll zur Klärung der Ursachen für die Unterschiede in der UV-Strahlenresistenz des untersuchten 3-Komponenten-Systems führen. Ergänzend zu den bereits bekannten UV-Absorbern, wie den sekundären Flechteninhaltsstoffen als auch der Zellanordnung und Struktur sowie der Präsenz eines schützenden Films wie der Gallertmatrix könnte dieses Analyseverfahren neue Perspektiven bezüglich der Präsenz eines anderen Schutzmechanismus auf molekularer Ebene eröffnen. Als Maß dienten Photoprodukte von Thymindimeren während die Detektion anderer DNA-Schäden aus experimentellen und zeitlichen Gründen bewusst ausgeblendet wurde. Hierzu wurde die HPLC-Tandem-Massenspektrometrie (Kapitel 3.5) verwendet. Diese Charakterisierung der DNA-Photoprodukte diene letztendlich dazu, eine Korrelation der Resistenz bzw. Sensitivität mit den induzierten DNA-Schäden zu ermöglichen. Dazu wurden Flechtenthalli der Flechte *X. elegans* sowie deren Mycobionten-Mycelien als auch Photobionten aus Kulturen der jeweiligen UV-Strahlung ausgesetzt, und die DNA direkt im Anschluss extrahiert und letztendlich bis zur Detektion der Photoprodukte wie in Kapitel 3.5 beschrieben, verfahren.

Nach Bestrahlung mit monochromatischem UV C konnte man feststellen, dass der Mycobiont keinerlei Cyclo-Thymindimere, (6-4) Thymindimere noch Sporen – Thymindimere produziert hatte und somit offensichtlich die DNA im Mycobionten sehr gut vor schädlichen Einflüssen durch UV geschützt ist (Tab. 2). Es bestätigt sich hiermit auch auf molekularer Ebene die starke Resistenz des Mycobionten gegenüber dem Photobionten und führt zur Vermutung,

dass effiziente Reparaturmechanismen auf DNA-Ebene vorhanden sein müssen, da die im Labor isoliert kultivierten Mycelien nur sehr selten und in äußerst geringem Maße UV-absorbierende Stoffe zu ihrem Schutz produzieren. Der Photobiont zeigt sogar in Abhängigkeit einer ansteigenden UV-Dosis eine deutliche Zunahme an DNA-Photoprodukten, wobei der Abfall der Kurve (Abb. 55) bei einer Dosis von 10,08 kJm⁻² aufgrund einer höheren Clusterfrequenz in der bestrahlten Kultur zurückzuführen ist, was man zudem auch unschwer an der höheren Endmasse an DNA in µg ablesen kann. Die Clusterbildung erlaubt somit, wie bereits bei Untersuchungen der CLSM-Bilder festgestellt,

Tab. 2

Photoschäden induziert durch monochromatische UV-Strahlung der Flechte <i>X. elegans</i> und ihrer Bionten								
Proben-Nr.	Probenart	Parameter			Photoprodukte			DNA
		λ (nm)	Dosis (kJm ⁻²)	t _e (h)	Cyclo- TT	(6-4) TT	Spore TT	Masse (µg)
1	P ^C	0	0	0	0	0	0	0,019
2	P	254	5,04	2	31,7	8,2	7,5	0,007
3	P		10,08	4	23,9	11,7	10,6	0,011
4	P		20,16	8	63,5	13,5	13,2	0,006
5	M ^C	0	0	0	0	0	0	0,007
6	M	254	5,04	2	0	0	0	0,018
7	M		10,08	4	0	0	0	0,012
8	M		20,16	8	0	0	0	0,013
9	Xe ^C	0	0	0	0	0	0	0,054
10	Xe	254	5,04	2	0	0,5	0	0,027
11	Xe		10,08	4	2,3	1,2	2,6	0,054
12	Xe		20,16	8	1,4	3,3	4,5	0,037
19	XeApo	0	0	0	0	0	0	0,017
20	XeApo	254	5,04	2	0	0	0	0,046
21	XeApo		10,08	4	0	0	0	0,016

C: Control; P: Photobiont; M: Mycobiont; Xe: Xanthoria elegans; Apo: Apothecium/Fruchtkörper

einen Schutz für die im Inneren der Cluster liegenden Zellen, was durch die oberflächige Verteilung der äußeren Zellen erreicht wird. Die Flechte weist nach Bestrahlung abermals Photoprodukte auf, wobei der Anstieg in der Konzentration der Photoprodukte sehr viel geringer ausfällt als bei den isolierten Photobionten. Setzt man sogar die Ergebnisse der Photobionten und der Flechte in Relation zueinander, so wird erkennbar, dass der Anstieg an Photoprodukten in den Flechten teilweise auf den Anstieg der im Thallus lichenisiert

III. Ergebnisse

vorliegenden Photobionten zurückzuführen ist. Weitere Ergebnisse über die relative Verteilung der Photoproduktarten in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis zeigen zudem grundlegende Unterschiede zwischen Photoprodukten, wie sie sich nach Bestrahlung in Photobionten bilden und solchen, die in einem Flechtenthallus entstehen. Lichenisierte Bionten können offensichtlich die Entstehung von vielen cyclo-Thymindimeren durch UV-Strahlung verhindern. Während bei den isolierten Photobionten beispielsweise der prozentuale Anteil von cyclo-Thymindimeren im Verhältnis zu allen detektierten Photoproduktarten unabhängig von welcher Strahlendosis immer etwa 60 bis 70 % beträgt, so nimmt der prozentuale Anteil an cyclo-Thymindimeren in der Flechte ab und erreicht nur noch Werte zwischen 20 und 40 %. Interessanterweise nimmt der Anteil an cyclo-Thymindimere in der Flechte auch bei zunehmender Bestrahlungszeit und somit höherer Dosis ab, während das Photoprodukt „Sporen TT“ sogar anteilmäßig zunimmt. Außerdem setzt die Photoproduktentstehung in der DNA der Flechte erst bei höheren UV-Dosen ein und produziert zunächst im Gegensatz zu den isolierten Photobionten (6-4) TT statt cyclo-TT und Sporen-TT.

Untersucht man zusätzlich die Apothecien auf DNA-Photoprodukte, so ist im Vergleich zu den Ergebnissen mit den Flechtenthalli keine Schädigung detektierbar und die dichte und stark gallerthaltige Struktur sowie die Hymenium bedeckende, mehrlagige Parietinschicht dieser Fruchtkörper erlaubt einen optimalen Schutz gegen UV-Schädigung, der beispielsweise die Ascosporen sowie die hier in den Randbereichen der Apothecien, unterhalb des Hymeniums eingelagerten Photobionten effizienter schützt, als es im Flechtenthallus der Fall wäre.

Zusammenfassend kann bei den Schäden der DNA der untersuchten Flechtenthalli von einer mäßigen bis sehr geringen Schädigung gesprochen werden. Während die DNA der isolierten Photobionten mit zunehmender UV-Dosis immer stärker geschädigt wird, ist die DNA des Mycobionten sowie der Fruchtkörper intakt und wird durch die UV-Strahlung nicht geschädigt.

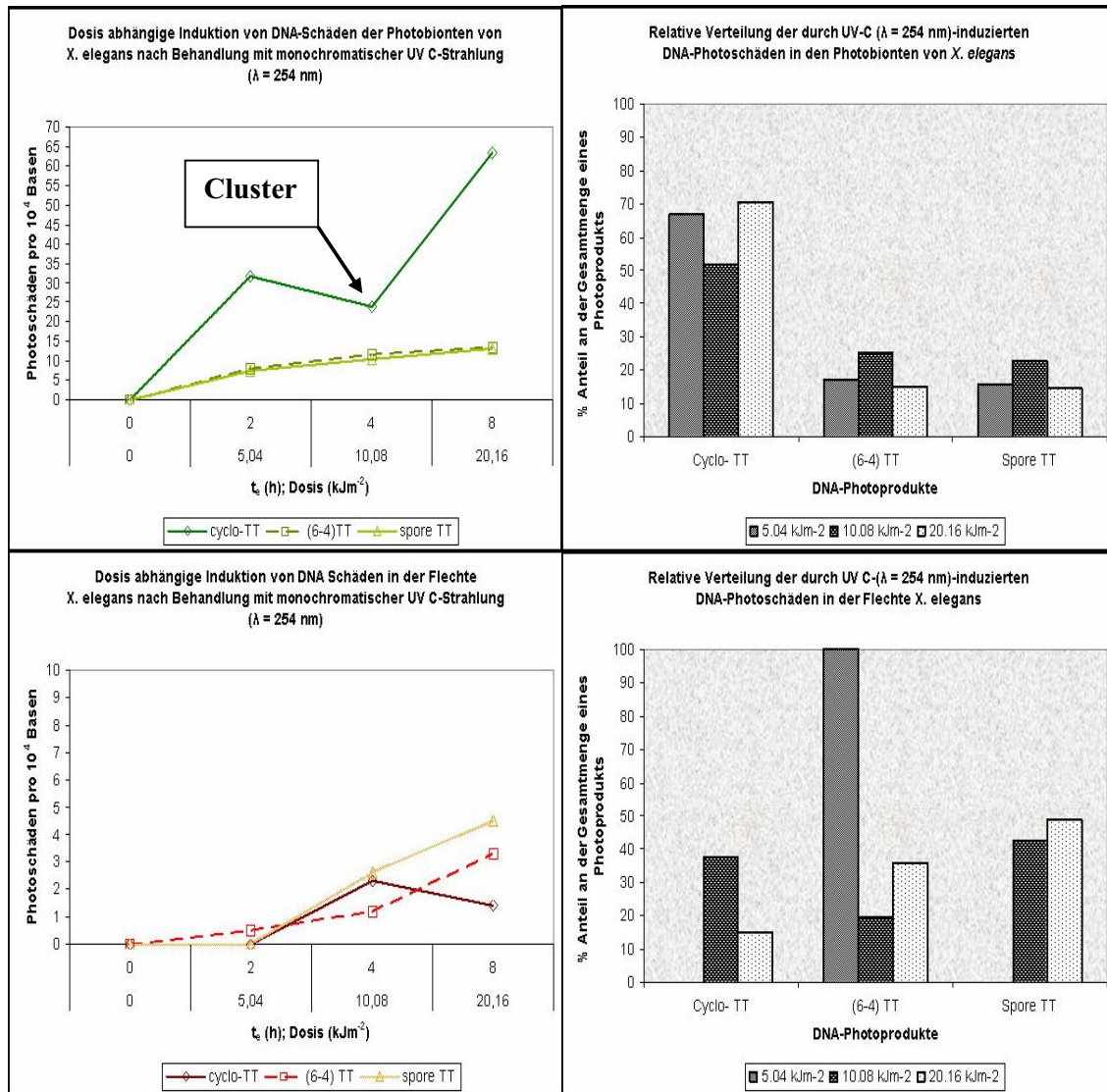


Abb. 55: Zunahme und Abnahme von Photoprodukten sowie die unterschiedliche Verteilung weisen auf unterschiedliche Sensitivität der Photobionten (Clusterschutz), aber auch des Flechtenthallus von *X. elegans* hin. Auch auf einen möglichen Reparaturmechanismus zur Beseitigung der (6-4)T-T-Dimere kann insbesondere aufgrund des Dimerrückgangs nach höheren UV-Dosen und längerer Exposition der Flechte geschlossen werden.

III. Ergebnisse

11. Zusatzergebnisse

Es ergaben sich neben den Analysen der Vitalität, der Wachstumsfähigkeit, der Hochdruckresistenz und den Photoproduktanalysen an der DNA eine Reihe weiterer Ergebnisse, die teilweise in den vorangehenden Kapiteln bereits genannt wurden und in dem nun folgenden Kapitel ausführlicher dargestellt werden sollen. Besonderheiten wie Gallertverteilung, Rindenschichtdicke, Strukturanalyse von Algenclustern und Mycobionten-Mycelien konnten mit Hilfe des CLSM beobachtet werden. Ergänzend wurde das UV-Absorptionsverhalten des Flechteninhaltsstoffes Parietin oder der verschiedenen Schichten in einer Flechte wie der Cortex oder das Hymenium mit Hilfe photometrischer Messungen untersucht.

11.1. Ergänzende Ergebnisse aus der Bildanalyse

Eine grundsätzliche Frage stellt sich bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse der Vitalitätstests. Es fällt auf, dass die Standardabweichungen vom Mittelwert mitunter ein breites Spektrum haben. Um diese großen Variabilitäten zu erklären, sollte man sich folgende Bildgalerien ansehen. In Abb. 56 a-b sieht man beispielsweise die Bedeutung einer gut ausdifferenzierten Rinde mit einer dichten Gallertschicht (GM) und einer abschließenden an der Oberfläche des Thallus liegenden mehrlagigen kristallinen Parietinschicht. Die obere Bildreihe zeigt Overlay-Bilder von Querschnitten durch den Flechtenthallus von *X. elegans*, welche nach UV-Bestrahlung bei einer Wellenlänge $\lambda \geq 200$ nm und einer Dosis von 4.96 kJm^{-2} mit dem LIVE/DEAD-Kit FUN I gefärbt worden sind. Die Abb. 56 a zeigt einen vollständigen Thallus mit Rinde, schwarz erscheinender Gallerte und einer autofluoreszierenden rötlichen Parietinschicht, so dass Mycobiont sowie Photobiont unter dieser Deckschicht vollständig vom Vitalmarker FUN I grün bis gelb oder gar rot gefärbt sind. Alle Bionten im Thallus sind also vollständig lebensfähig. In Abb. 56 b wurde der Thallus künstlich von einem Großteil der Rinde befreit. In diesem Fall erscheint der Mycobiont aufgrund der FUN I-Färbung noch vollständig intakt und ist von der UV-Strahlung nicht geschädigt worden, während der Photobiont eine stärkere Schädigung erfahren hat, da er in geringem Maße durch FUN I gefärbt worden ist. Zum Vergleich kann man in Abb. 56 c einen jungen Thallus mit noch nicht vollständig ausgebildeter Rinde sehen,

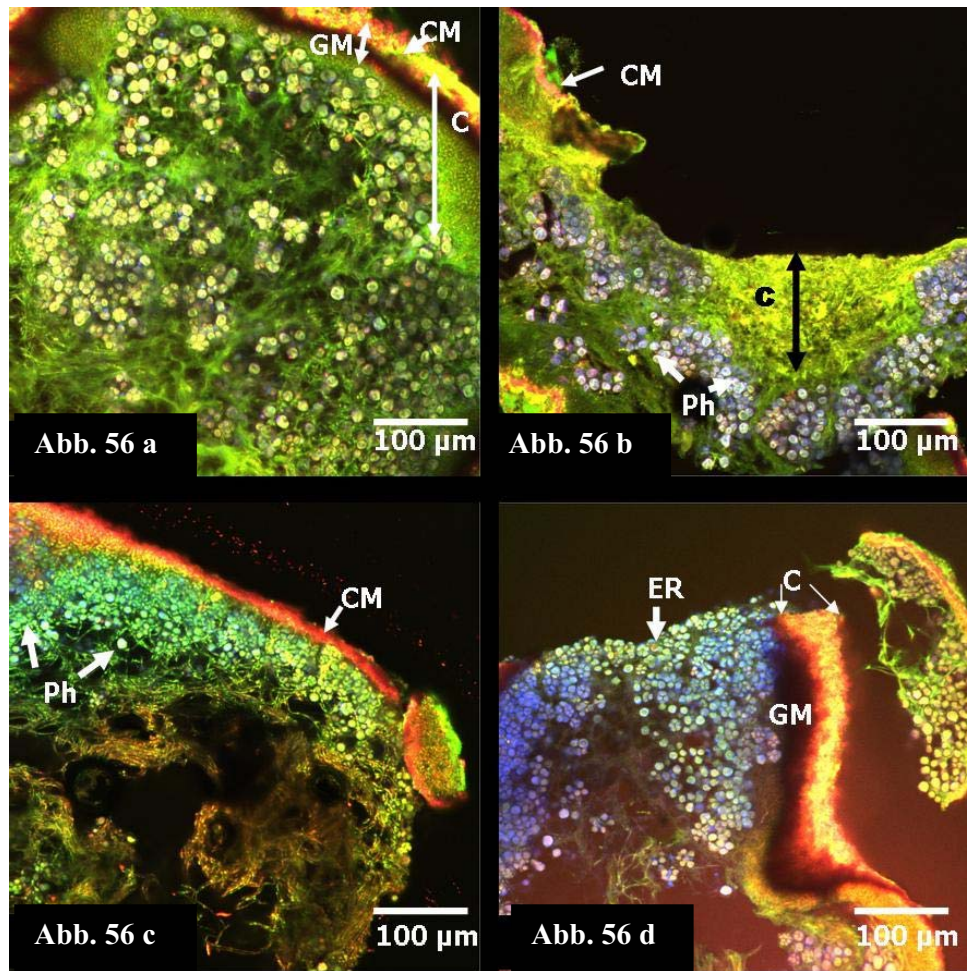


Abb. 56 a-b: CLSM-Overlay-Bilder von Thalli der Flechte *X. elegans*, versetzt mit dem Fluoreszenzfarbstoff FUN I nach UV-Bestrahlung ($\lambda \geq 200$ nm) mit einer Dosis von 4.96 kJm^{-2} . FUN I färbt vitale und metabolisch aktive Photobiontenzellen und Mycobiontenzellen grün. (a) Thallus mit Cortex (C), Gallert-Matrix-Schicht (GM) und kristallisierte sekundäre Flechteninhaltsstoffe (CM). Der Thallus erscheint vollständig vital. (b) Bestrahlter Thallus nach Entfernen der sekundären Inhaltsstoffschicht (CM) sowie des darunter liegenden Cortex (C). Die Photobionten sind nicht durch den Vitalitätsindikator FUN I gefärbt.

Abb. 56 c-d: CLSM-Overlay-Bilder der Thalli der Flechte *X. elegans*, versetzt mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTOX-green nach UV-Bestrahlung ($\lambda \geq 200$ nm) mit einer Dosis von 4.96 kJm^{-2} . SYTOX-green färbt degenerierte Bionten grün. (c) Ausschnitt aus einem intakten, jungen Thallus mit geringerer Konzentration an sekundären Flechteninhaltsstoffen (CM) und keiner ausdifferenzierten Cortex-Struktur (C) wird teilweise durch SYTOX-green gefärbt. Die Photobionten weisen eine türkise Farbe aufgrund des Overlay-Effektes von blau (vital) mit grün (tot). (d) Thallus, wo der Cortex (C), inklusive die kristalline sekundäre Flechteninhaltsstoffschicht (CM) und die Gallertschicht (GM) artifiziiell entfernt wurde. Die geschädigten Zellen der Photobionten sind grün gefärbt und zeigen den schädigenden Einfluss der UV-Strahlung (ER = effect of radiation) an. Vitale blau gefärbte Photobiontenzellen findet man in tieferen bzw. geschützten Schichten.

die ohne Gallertschicht ist und eine sehr dünne Parietinschicht auf der Oberfläche aufweist. In diesen beiden unteren Bildern wurde der Farbstoff SYTOX-green verwendet, welcher tote Zellen grün färbt. Man erkennt, dass unterhalb einer dünnen Rinde die Photobionten ebenfalls nicht ausreichend geschützt sind und grün gefärbt werden, so wie es in Abb. 56 d der Fall ist,

III. Ergebnisse

wenn der Thallus artifiziell von der Rinde befreit worden ist. Genau in dem Bereich der fehlenden Rinde werden tote Algen aufgrund der SYTOX-green-Färbung erkennbar. Diese Bandbreite von beispielsweise unterschiedlichen Strukturen in der Rinde, oder dem Vorhandensein einer dichten Gallertmatrix sowie der unterschiedlich ausgeprägten Parietinablagerung an der Oberfläche führen auch bei nicht artifiziell geschädigten Flechten zu einer großen Variabilität im Ergebnis und somit nicht selten bis zu 10 % Standardabweichungen in der Vitalität von zumeist 8 untersuchten Proben pro Versuchslauf.

11.2. UV-Absorption durch Parietin und Rinde

Photometrische Messungen im DLR an Dünnschnitten der Rindenschicht und des Hymeniums nach Entfernung der Parietinschicht sowie durch in Methanol gelöstes Parietin verdeutlichen die Effizienz in der UV-Absorption durch die Kombination von strukturell stark ausgebildete Rinden oder dichte Hymenien mit der Präsenz UV-absorbierender sekundärer Flechteninhaltsstoffe.

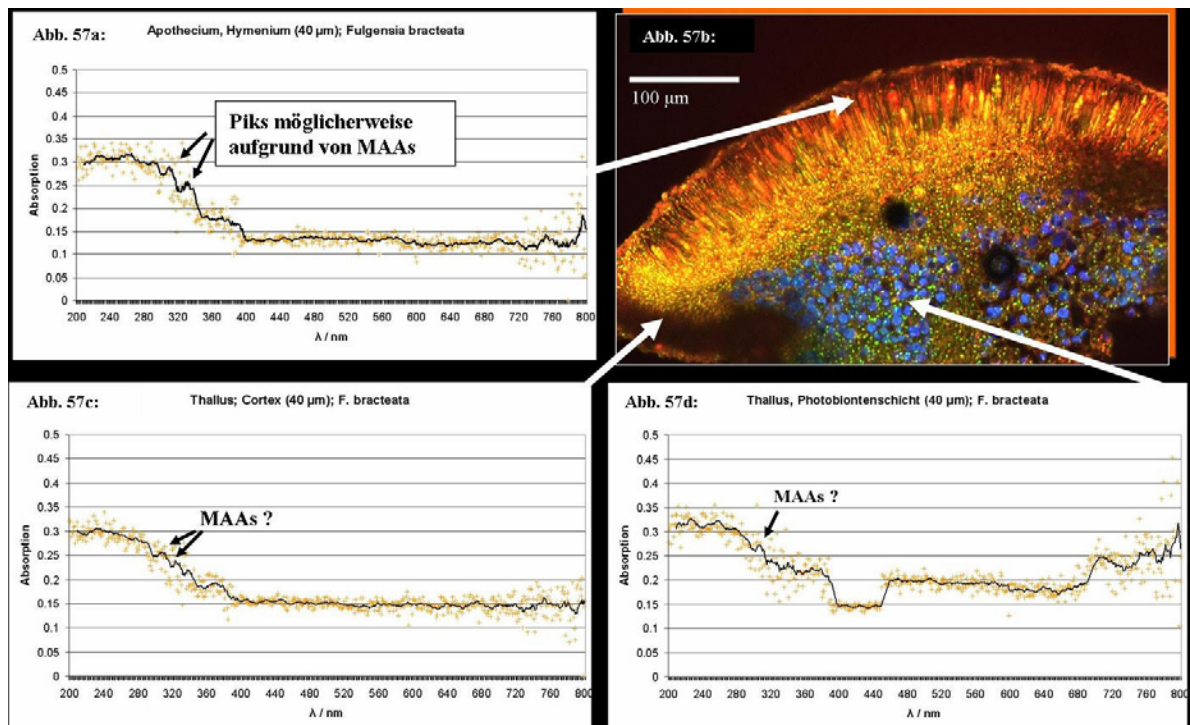
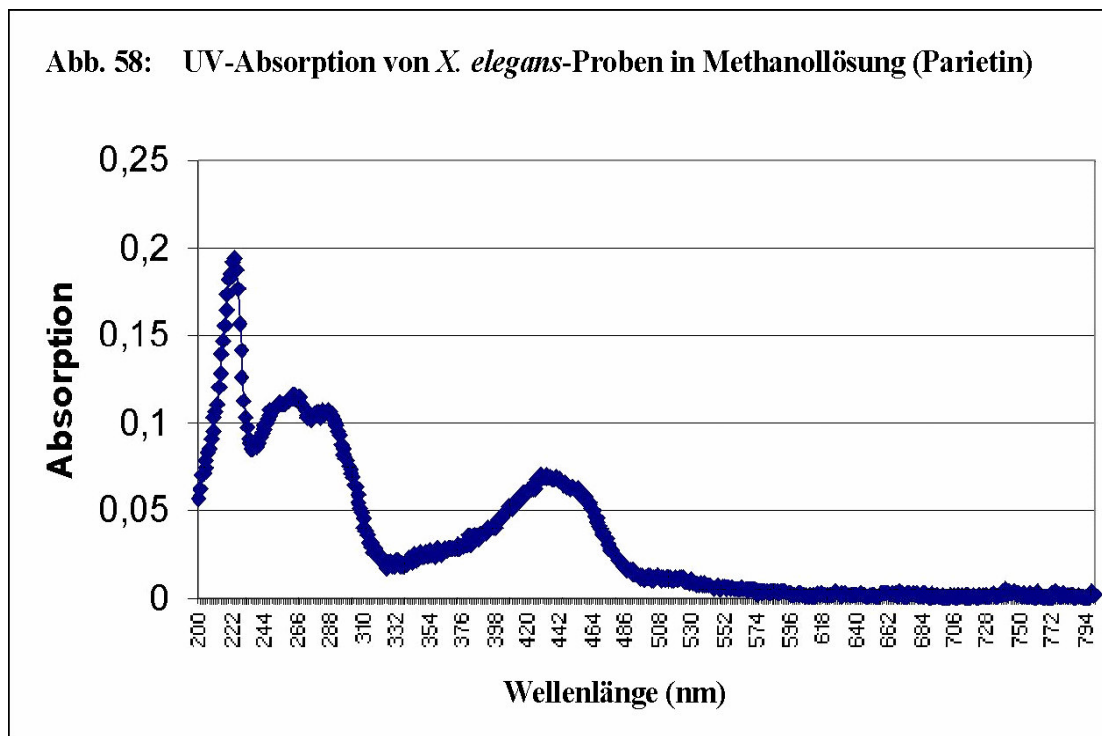


Abb. 57a-d: Photometermessungen über das UV-Absorptionsverhalten in der von Parietin befreiten Rindenschicht, des Hymeniums und in der Photobiontenschicht.

Abb. 57 a-d zeigt das Absorptionsmuster der jeweils 40 µm dicken Rinden, Hymenien und der Photobiontenschicht der Flechte *F. bracteata* nach Herauslösen des Parietins mit Hilfe des Methanols und nach mechanischer Entfernung der obersten Parietinkristallschicht mit Hilfe eines Mikrotommessers. Die Absorption wurde über ein Wellenspektrum von 200 bis 800 nm gemessen. Dabei wird eine hohe Absorption im UV-Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm beobachtet, die sogar immer wiederkehrende Absorptionspiks zwischen 280 und 300 nm aufweisen und ein Optimum der UV-Absorption im Bereich von 230 nm erreichen.



Wird das Parietin aus Flechtenthalli und Apothecien mit Hilfe von Methanol herausgelöst und diese methanolische Lösung des Parietins gemessen, so ergibt sich ein Absorptionsmuster, wie es in Abb. 57 erkennbar wird (hier das Beispiel für *X. elegans*). Dort werden im UV-Bereich zwischen 200 nm und 290 nm vier Piks bei etwa 222, 250, 265 und 300 nm registriert. Ein weiteres Absorptionsoptimum geringerer Ausprägung ist ebenfalls bei 430 nm feststellbar. Somit kann reines Parietin den größten Teil aller UV-Spektren von UV A bis UV C mit einer geringeren UV-Absorption im UV B effizient absorbieren und die oberflächlich abgesonderte Kristallschicht aus Parietin kann hiermit das darunterliegende Gewebe ergänzend zu der Absorptionsfähigkeit der Rinde und des Hymeniums vor eventuellen Schäden durch die intensive UV-Strahlung wirkungsvoll abschirmen, so dass sogar ein Schutz gegenüber harter Weltraum-UV-Strahlung gegeben ist. Ungeklärt ist noch, ob immer

III. Ergebnisse

wiederkehrende auffällige Piks zwischen 320 und 400 nm die Präsenz von UV-absorbierenden MAAs (Mycosporine like amino acids) anzeigen (siehe Abb. 57a-d).

11.3. Höhere Resistenz der Photobionten durch Clusterbildung

Selbst die stärkste UV-Dosis nach 8 Stunden Bestrahlung konnte oftmals das Wachstum von Photobionten nicht vollständig zum Erliegen bringen. Dies war aufgrund von einer zufälligen, spontanen Clusterbildung der Photobionten-Kulturen erklärbar (Abb. 59), die es erlaubte, die im Cluster zentral befindlichen Zellen aufgrund der Auflage äußerer Zellen und eine durch die Präsenz einer Gallerte erreichte dichte Anordnung vor der UV-Strahlung als auch vor Austrocknung zu schützen (siehe auch Abb. 60). Diese von der UV-Strahlung unbeeinflussten Zellen waren somit nach Degeneration der äußeren Zellen weiterhin wachstumsfähig.

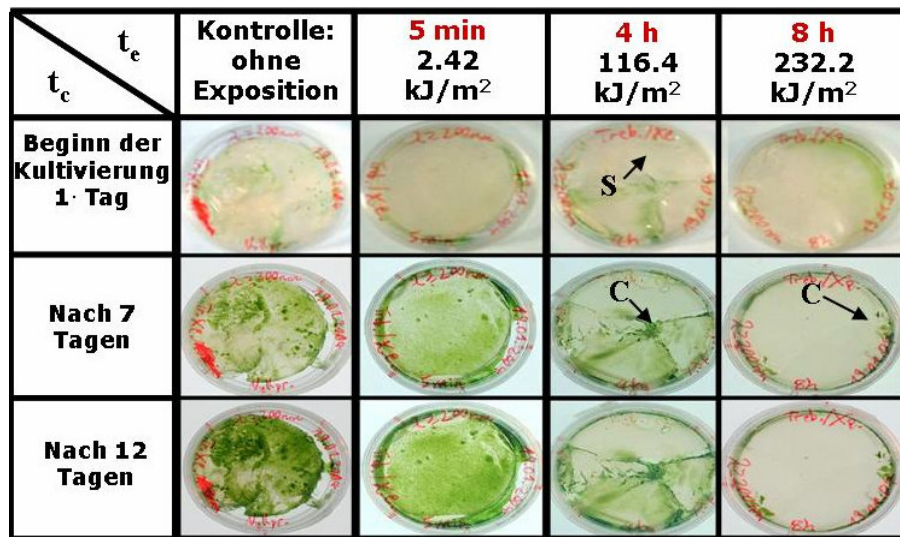


Abb. 59: Wachstumsverhalten der Photobionten von *X. elegans*. Die Einstellung des Wachstums der Single-Zellen (S) findet nach 8stündiger UV-Exposition (232.2 kJm⁻²) statt. Nur Cluster (C) besitzen noch ihre Wachstumsfähigkeit.

11.4. Höhere Resistenz der Mycobionten von Struktur und Gallerte unabhängig

Bei Durchsicht der CLSM-Bilder war oftmals erkennbar, dass zumeist unabhängig von der Beschaffenheit der Struktur der Mycobiont von *X. elegans* von seiner Vitalität nach UV-Strahlung sowie Vakuum kaum eingebüßt hatte. So waren feingliedrig locker strukturierte Mycelien mit weniger Gallertmatrix als auch dichte und kompakte Mycelien in gleicher Weise in hohem Maße vital (siehe Abb. 60 c-d). Es war jedoch unter der Stereolupe nach

Langzeitbestrahlungen von 8 bis 16 Stunden mit einer Dosis von 232.2 kJm^{-2} bis 465.6 kJm^{-2} eine Verfärbung der blass rosa bis weißen Mycelien zu einem dunklerem rosé zu beobachten. Dies könnte ein Hinweis auf eine UV-induzierte Parietinproduktion des Mycobionten sein, der eventuell eine Schutzfunktion gegen höhere UV-Dosen einnimmt. Außerdem kann unter Einbeziehung der Ergebnisse aus der DNA-Photoprodukt-Analyse und der geringen

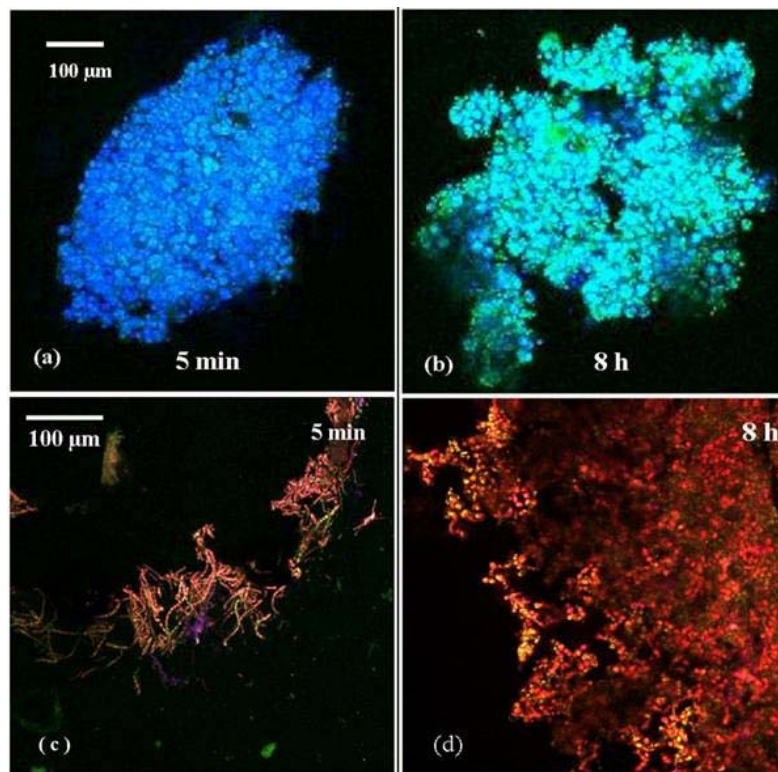


Abb. 60a – d. CLSM Overlay Bilder von Photobiontanzell-Clustern (a, b) und Mycelien des Mycobionten von *X. elegans* (c, d). Nach einer Expositionszeit von 5 min (2.42 kJ/m^2 ; $p = 2.8 \times 10^{-5} \text{ Pa}$) färbt der Fluoreszenzfarbstoff SYTOX-green nur 3 Zellen im dicht gepackten Photobionten-Cluster (a) grün während ein aufgelockertes Photobionten-Cluster (b) nach $t_e = 8 \text{ h}$ (232.2 kJ/m^2 ; $p = 3.6 \times 10^{-5} \text{ Pa}$) stärker gefärbt ist und die Mehrzahl der Zellen nicht vital ist. Aber beim Mycobionten ist die Anzahl der grün und gelb markierten toten Zellen sowohl bei lockerer Mycelstruktur als auch bei kompakter Struktur sehr gering. Jedoch kann eine Farbänderung der Hyphen von pink nach rot beobachtet werden. Eventuell ist dies auf UV-induzierte Parietinproduktion zurückzuführen.

III. Ergebnisse

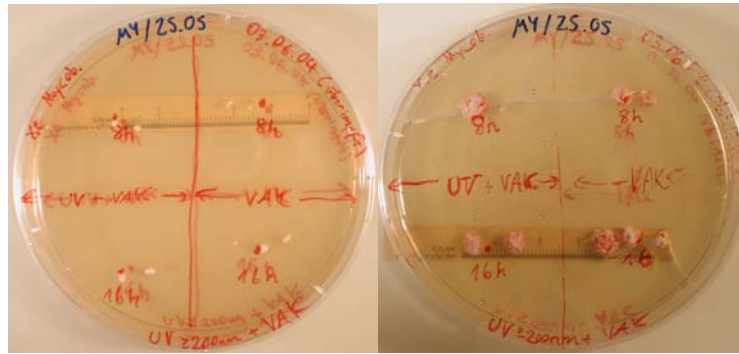


Abb. 61. Wachstum des Mycobionten von *X. elegans* auf Malz-Hefe-Medium nach Exposition zu den Weltraumparametern (UV 200 nm $\leq \lambda \leq$ 400 nm mit Dosen zwischen 232.2 kJ/m² ($t_e = 8$ h) und 465.6 kJ/m² ($t_e = 16$ h) und Vakuumdrücken, bis zu $p = 3.1 \times 10^{-5}$ Pa). Eine Hemmung des Wachstums ist nicht erkennbar. Zu Beginn der Kultivierung sind erkennbar weiße oder leicht rosé gefärbte Mycelien nach Bestrahlung ins dunkel rosa bis rot verfärbt.

Konzentration kristallinen Parietins in den Mycelien –auch nach UV-Bestrahlung– auf einen weiteren Schutz- oder Reparaturmechanismus auf molekularer Ebene geschlossen werden. Mycobionten der Flechte *F. bracteata* verfärbten sich jedoch unter denselben Bedingungen nicht, blieben vital und konnten anschließend jedoch nicht mehr wachsen. Dies wäre ein möglicher Hinweis auf grundlegende Schädigung von Wachstumsprozessen auf molekularer Ebene.

11.5. Unterschiede der Kristallabscheidungen auf den Apothecien zwischen beiden untersuchten Flechtenarten

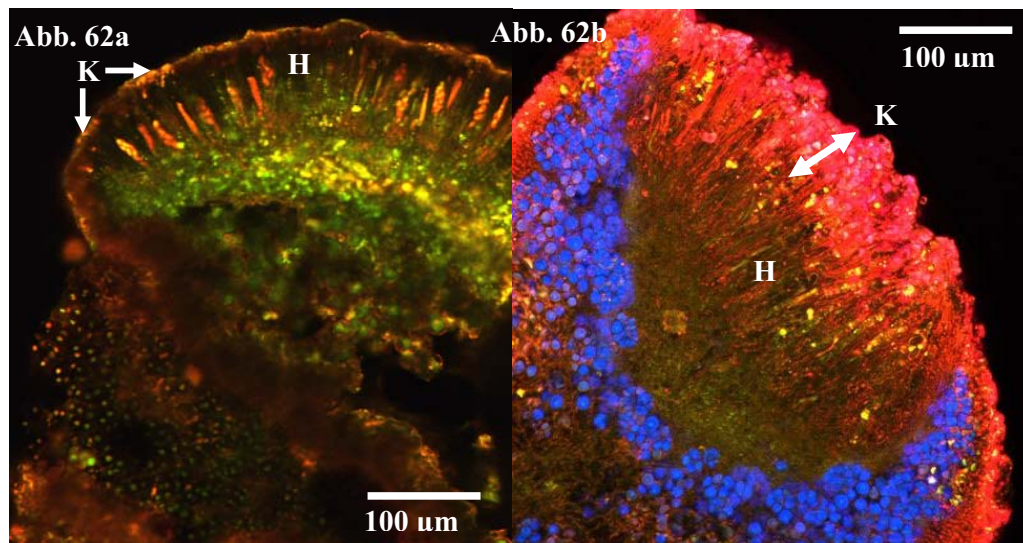
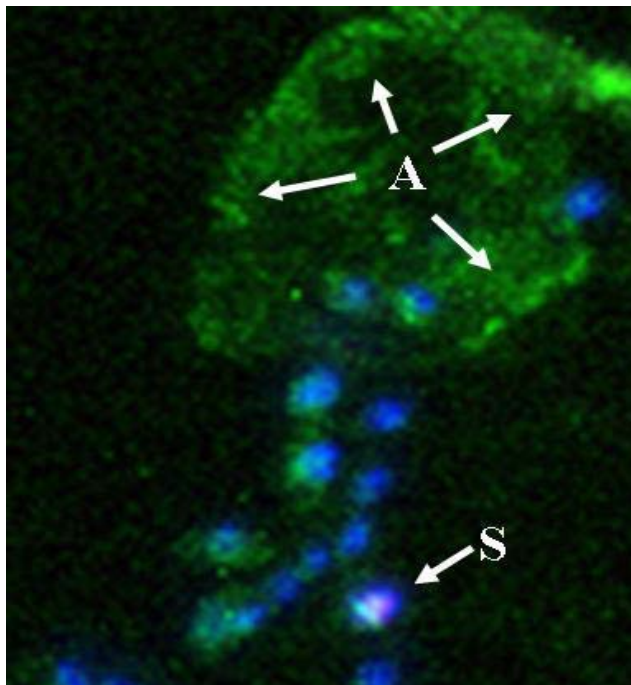


Abb.62 a: Fluoreszenzbildaufnahme eines Apotheciums von *F. bracteata* mit dünner Schicht an Kristallablagerungen (K) über dem Hymenium.
Abb. 62 b: Fluoreszenzbildaufnahme eines Apotheciums von *X. elegans*. Erkennbar wird die dichte und dicke Kristallschicht (K) über dem Hymenium (H).

Grundlegende Unterschiede sind auch in der Konzentration der Kristalle des sekundären Flechtenmetabolits Parietin auf den Fruchtkörpern (Apothecien) beider Flechten von *F. bracteata* und *X. elegans* optisch sichtbar geworden. Während sich bei *F. bracteata* zumeist eine sehr dünne Schicht (10µm) an Kristallen über einer dickeren Gallertmatrix befindet, so ist im Gegensatz dazu eine mehrlagige Kristallschicht über den Paraphysen und Asci des Apotheciums von *X. elegans* mit einer Dicke von meist bis zu 50 µm erkennbar (Abb. 62 b).

11.6. Die Bedeutung des Ascus als Schutz gegen extreme Umweltbedingungen



10 µm

Abb. 63: Quetschpräparat eines Ascus von *F. bracteata* nach Färbung mit SYTOX-green. (A) entleerter Ascus. (S) durch SYTOX-green gefärbte nicht vitale Spore.

Das Herausschleudern der Sporen im Cluster aus dem Apothecium ist oft bedingt durch das Herauskatapultieren vollständiger Asci. Oft sind Sporen nach der Sporulation von dieser Ascus-Hülle (Abb. 63) umgeben und können sogar wenige Kristalle des UV-absorbierenden Parietins auf der Außenwand aufgelagert haben. Bei den nachträglichen Versuchen mit Vakuum und Weltraum-UV waren die zumeist im Ascus befindlichen Sporen vital und zudem bis zu einem gewissen Grad keimungsfähig. Auch hier kann wieder die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Sporen additiv von den morphologisch-anatomischen

Besonderheiten des Fruchtkörpers (Apothecium), der umgebenden Gallertmatrix, der auf der Oberfläche des Apotheciums befindlichen Parietinschicht, sowie durch die Ascus- und eventuell Sporenwand vor möglichen negativen Einflüssen durch UV- und Vakuum geschützt werden.

IV. Diskussion

12. Vitalität und Resistenzmechanismen

Die Vitalität (lat. vita = Leben; vitalitas = Lebenskraft, -fähigkeit, Lebendigkeit) wird meist als physiologische Leistungsfähigkeit lebender Systeme charakterisiert (Schubert et al. 1993). Jedoch sind keine allgemeingültigen Kriterien bekannt, die eine vollständige Definition des Begriffes der Vitalität aufgrund der Vielseitigkeit und Komplexität des Lebens und seiner verschiedenen Systeme erlauben. Nach Schubert et al. (1993) können sich der Umfang der RNA- und Proteinbiosynthesefähigkeit oder die Höhe des Verhältnisses der synthetischen zu den abbauenden Prozessen als Maß der Vitalität verwenden lassen. Jedoch sind nach offizieller Lehrbuchmeinung (Strasburger et al. 1991) weitere Kriterien wie die Produktivität bzw. Reproduktion, Geselligkeit, regelmäßige oder unregelmäßige Verteilung (Dispersion), häufiges bis seltenes Auftreten in Teilflächen (Frequenz) für eine relative Vitalität einer Art ebenfalls entscheidend. Besonders letzteres weist bereits auf die Abhängigkeit der Vitalität von Umweltfaktoren und daraus resultierenden Häufigkeiten einer Art hin. Dieser Aspekt der Reproduktionsfähigkeit wird in der vorliegenden Arbeit bei der Erfassung der Mycel- oder Photobiontenzellfrequenz nach Exposition zu den extremen Parametern aufgegriffen, während der physiologische Aspekt mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoff-Analyse am CLSM im Hinblick auf Apoptoseinduktion und transmembranöser Transport von Stoffwechselprodukten in Vakuolen sowie im Zellplasma durch Verfärbungen sichtbar gemacht wird.

Auch der Grad der Konservierung der DNA ist von entscheidender Bedeutung, da durch Umweltfaktoren bewirkte Mutationen an der DNA in Abhängigkeit von der Häufigkeit ihres Auftretens diese auch wichtige Gene treffen könnten, die in der Proteinsynthese eingreifen und somit für die jeweiligen Lebensformen schädlich sein können und den Grad der Vitalität einschränken. In dieser Arbeit wurden somit drei wichtige Faktoren, die essentiell für die Vitalität und das Überleben der Art wichtig sind, nach Exposition zu den extremen Umweltparametern untersucht: die physiologische Aktivität mit Hilfe optischer Mittel, die Reproduktionsfähigkeit mit Hilfe von Kultivierungsmethoden und optischer Mittel sowie der Konservierungsgrad der DNA nach Exposition gegenüber extremen Umweltbedingungen. Da es sich aber in dieser Arbeit um ein komplexes System bei den hier verwendeten Symbioseorganismen handelt, wurde neben dem Gesamtsystem Flechte auch jeder Biont isoliert getestet.

Diese Drei-Stufen-Analyse an einem Drei-Komponenten-System führte zu weiterführenden Erkenntnissen über Vorteile einer Symbiose sowie andere Faktoren, die entscheidend sind für die Aufrechterhaltung der Lebensfunktion, der Resistenz und somit der Lebensfähigkeit. Dies wird in den nun folgenden Kapiteln ausführlich erläutert. Es ist zu betonen, dass biologische Effekte durch simulierte Weltraumparameter, wie sie in dieser Arbeit erforscht wurden, bisher nur bei Viren und Prokaryoten, wie Bakterien und Archaeen, getestet wurden (Horneck 1993, Horneck et al. 1994, 2001b, Mancinelli et al. 1998, Stetter 1996). Wenige vorangegangene Untersuchungen mit Flechten konzentrierten sich nur auf Studien bezüglich des UV-B Effekts auf die Photosynthese (Bachereau & Asta 1997, Kappen et al. 1998, Lud, D. 2001, Wynn-Williams et al. 2000). Ebenfalls sind nur wenige Studien über die Wirkung des UV-A auf Flechten und anderen Organismen bekannt (Teramura & Sullivan 1994, Buma et al. 1997, 2000, Rozema et al. 2001, Hughes et al. 2003). Bisher unberücksichtigt blieb der Einfluss anderer Parameter, wie UV C-Strahlung und starke Austrocknung mit Hilfe des Vakuums auf das gesamte System der Flechte sowie auf den Mycobionten und die damit zu untersuchende Bedeutung der Symbiose unter den extremen Bedingungen.

Diese Arbeit zeigt somit erstmalig differenziert den Effekt simulierter solarer Weltraum-UV-Strahlung und Vakuum auf die Vitalität eines symbiotischen Systems, wie hier auf die Flechten von *Fulgensia bracteata* und *Xanthoria elegans* sowie die jeweiligen Bionten.

12.1. Resistenzmechanismen

Zur Aufrechterhaltung aller wichtigen Lebensfunktionen während der Exposition gegenüber extremen Umweltbedingungen, das heißt Umweltfaktoren, die im natürlichen Habitat nur sehr selten bis gar nicht vorkommen, bedarf es eines gewissen Grades einer Präadaptation des Organismus auf genetischer Ebene. Das bedeutet, dass bestimmte genetisch bedingte Wuchsformen entwickelt oder Substanzen vom Organismus gebildet werden, die mit den plötzlich neu auftretenden Umweltbedingungen positiv interagieren, so dass die Lebensformen durch diese neuen Umweltparameter selten geschädigt werden. Aus einigen bereits vorhandenen Substanzen resultiert möglicherweise unter veränderten Umweltbedingungen eine Schutzfunktion, die bis dahin in der Evolution funktionell nicht so offensichtlich in Erscheinung trat. Die in diesen Fällen sich ergebende Verminderung schädlicher Einwirkungen, welche zur Aufrechterhaltung intakter Stoffwechselkreisläufe als auch zu einer Stabilisierung der Reproduktionsfähigkeit führt, ist für das Überleben unter extremen Bedingungen essentiell und erhöht damit das Resistenzpotential.

IV. Diskussion

Die zum Teil genetisch festgelegten Programme oder aber auch die durch die veränderten Umweltbedingungen hervorgegangenen Mutationen bilden folglich höchst effiziente Mechanismen. Diese Mechanismen kennzeichnen die Resistenzfähigkeit eines Organismus bzw. einer symbiotischen Organisationsform.

In den folgenden Kapiteln wird die in dieser Arbeit herausgestellte hohe Resistenz gegenüber den simulierten Weltraumparametern detailliert diskutiert und in einen Kontext mit den bereits bekannten Ergebnissen aus anderen Arbeiten über die für die Resistenz verantwortlichen Substanzen gebracht. Dabei wird sich herausstellen, dass die hohe Effizienz des Überlebens der Flechten auf einen regelrechten Cocktail an Resistenzmechanismen zurückzuführen ist.

12.1.1. Bedeutung der Thallusmorphologie und -anatomie für die UV- und Vakuumresistenz

Die Thallusmorphologie spielt eine entscheidende Rolle beim Strahlenschutz. Vorausgehende Analysen hoben den Stellenwert dieses Adaptationsmechanismus gegenüber intensiver Sonneneinstrahlung und UV-B (Lud 2001) hervor. In den Untersuchungen wurde deutlich, dass erhöhte UV-B Bestrahlung, wie sie bei Verringerung der Ozonschicht in der Atmosphäre auftritt, keinerlei Einfluss auf die Primärproduktion und Sekundärchemie in der antarktischen Flechte *Usnea antarctica* hatte. *U. antarctica* wächst strauchförmig, und die im oberen Thallusbereich vorhandenen Verzweigungen schützten den unteren Bereich durch Beschattung gegenüber zu intensiver Einstrahlung und damit auch vor UV-Strahlung. Normalerweise ist bekannt, dass erhöhte simulierte UV-B Strahlung die photosynthetische Aktivität und Vitalität durch Verlust der Calvin-Zyklus-Enzyme (Allen 1998) einschränkt. Jedoch ergaben die Untersuchungen bei Lud (2001) weder eine Hemmung der Photosyntheseaktivität noch eine Verminderung der Produktion des sekundären Flechteninhaltsstoffes Usninsäure.

Wie sich in der vorliegenden Arbeit herausstellte, ist die Anatomie des Thallus der beiden untersuchten Flechten von *F. bracteata* und *X. elegans* ebenfalls für die Erhaltung der Vitalität des gesamten Symbioseorganismus, jedoch insbesondere des Photobionten unter extremen, simulierten Weltraumbedingungen von grundlegender Bedeutung. Dabei spielt der obere Cortex eine besondere Rolle. Beide Flechten kennzeichnen sich durch eine mehr oder weniger dichte Rindenstruktur und besitzen jeweils hohe Konzentrationen UV-absorbierender Stoffe (Wynn-Williams et al. 2002), die sich überwiegend in und auf der oberen Rinde

befinden. Dies wird bereits durch die optische Analyse der Autofluoreszenz des UV-absorbierenden sekundären Flechteninhaltsstoffs Parietin mit Hilfe des CLSM's sichtbar (Abb. 56a – d, Abb. 62 a - b). Leichte Unterschiede in der Dichte der Gallertmatrix, der Dicke der Rinde und der Dicke der abgelagerten Kristallschicht auf der Oberfläche führen bereits zu Veränderungen in der Vitalität der unterhalb der Rinde befindlichen Photobiontenschicht.

12.1.1.1. Schutzfunktion des Cortex in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand

Bei jungen Thalli der Flechte *X. elegans* (Kap. 11.1, Abb.56c) bietet der sehr gering ausdifferenzierte, dünne Cortex mit einer sehr dünnen Kristallabscheidung auf der Oberfläche keinen ausreichenden Schutz für die Photobionten. Erkennbar wird dies durch den Fluoreszenzfarbstoff SYTOX-green, welcher abgestorbene Zellen markiert. Man stellt in diesem Fall eine grüne Verfärbung der blauen Photobiontenzellen fest, was somit die durch die extremen Umweltparameter abgestorbenen Zellen sichtbar macht. Ältere Thalli mit gut ausgebildeter Rinde weisen dagegen äußerst wenige durch SYTOX-green markierte Zellen auf.

Wird die Rinde älterer Thalli jedoch vor den experimentellen Tests vollständig entfernt, so sterben die direkt der UV-Strahlung und dem Vakuum ausgesetzten Photobionten ebenfalls ab (Abb. 56 a-d). Nur tiefer im Thallus befindliche Photobionten überleben. Der Grad der Vitalität ist folglich nicht nur von der Präsenz einer intakten Rinde abhängig, sondern hängt auch von der Lage der Zellen im Thallus zueinander ab, denn auch der tiefer im präparierten Thallus befindliche Mycobiont, welcher die Marksicht bildet, bleibt überwiegend unbeeinflusst.

12.1.1.2. Schutzfunktion des Cortex von verschiedenen Flechtenarten

Unterschiede im Grad der Vitalität zwischen den beiden untersuchten Flechtenarten basieren möglicherweise auch auf der unterschiedlichen Cortexstruktur der beiden untersuchten Flechtenarten.

Bei *F. bracteata* ist die obere Kristallschicht des Parietins über der vom Mycobionten gebildeten, plectenchymatischen Rinde im Vergleich zu *X. elegans* sehr viel dünner. Den selben Unterschied stellt man bei der Kristallschicht über den Hymenien der Fruchtkörper beider Flechten fest (Abb. 62a – b). Auch die Dicke der Rinde fällt bei den Loben von *F. bracteata* sehr viel geringer aus, als es bei *X. elegans* der Fall ist. Die Penetration der UV-

IV. Diskussion

Strahlung wäre folglich bei *F. bracteata* viel leichter und könnte für die stärkere Beeinträchtigung der Vitalität vom Thallusgeflecht und die leicht verringerte Keimungsfähigkeit der Sporen auch verantwortlich sein.

Diese Beobachtungen führen letztendlich zu folgender Schlussfolgerung: die Einzelkomponenten der Rindenstruktur, wie die Dicke der Kristallschicht, die Dichte und Dicke der Gallertschicht und die Dichte sowie Dicke des durch den Mycobionten gebildeten Plectenchyms optimieren jeweils additiv den Schutz gegenüber zu starker UV-Strahlung sowie starker Austrocknung.

Ergebnisse der UV-Absorptionsanalyse durch Photometermessungen an Schichten des Hymeniums, der Rinde, der Photobiontenschicht sowie des Parietins unterstreichen dies zusätzlich. Sie verdeutlichen ebenfalls die sich ergänzenden UV-Absorptionsoptima von jeder untersuchten Schicht. Während Parietin im UV-Bereich zwischen 200 und 300 nm optimal absorbiert und anschließend erst wieder ein weiteres Absorptionsmaximum bei etwa 400 nm aufzeigt, so wird die Lücke der UV-Absorption zwischen 300 und 400 nm, wie beispielsweise bei *F. bracteata* und *X. elegans* (Abb. 58) gemessen, durch die Absorptionsmaxima der Rinde oder des Hymeniums ausgeglichen (Abb. 57a – d). Die UV-Strahlung gelangt also in sehr geringem Ausmaß bis in die Photobiontenschicht und kann bei intakter Struktur des Cortex oder des Hymeniums nur einen sehr geringen Einfluss auf die Vitalität der in Symbiose befindlichen Bionten ausüben.

12.1.2. UV- und Vakuumschutz durch Clusterbildung

Die isolierten Photobionten sind ebenfalls charakterisiert durch morphologisch-anatomische Besonderheiten, die einen Schutzeffekt bezüglich UV und Vakuum aufweisen. Dies manifestiert sich in allen 3 Analyseschritten, nämlich der Fluoreszenzanalyse, der Wachstumsanalyse und der DNA-Photoproduktanalyse an isolierten Photobionten. So waren Photobionten in Clustern besser vor den negativen Einflüssen der harten UV-Strahlung und teilweise des Vakuums geschützt, als ein Monolayer von Einzelzellen auf dem Nährsubstrat. Die auf der Oberfläche der Cluster befindlichen, zumeist nur aufgrund einer geringen Gallertschicht umhüllten und durch die Strahlung abgestorbenen Zellen schützten die im Inneren des Clusters liegenden Zellen (de Vera et al. 2003/ Abb. 60 a-b). Damit war ein weiteres Wachstum der Photobiontenzellen (Abb. 59) möglich. Der verringerte Photoproduktanteil in der DNA der clusterreichen Photobiontenkultur trotz erhöhter UV-

Dosis in Abb. 55 ist ebenfalls durch den Abschirmungseffekt der am Cluster außen aufliegenden Zellen erklärbar. Die DNA der im Zentrum des Clusters liegenden Zellen wurde von der UV-Strahlung nicht mehr erreicht.

Die Sporen als Meioseprodukt im Ascus der Flechte *X. elegans* wurden bei der Sporulation ebenfalls meist in Clustern von 8 Ascosporen aus dem Fruchtkörper ausgeschleudert, was auch von anderen Flechten bekannt ist (Etges 2001, Molina & Crespo 2000, Shapiro 1971). Während in früheren Publikationen die Entstehung der Sporen-Cluster aufgrund elektrostatischer Ladung erklärt wurde (Garrett 1972), kann man im Rahmen dieser Arbeit anhand von CLSM-Aufnahmen (Abb. 63) auch einen diffusen Halo um die Sporenpakete erkennen, der Ähnlichkeiten mit der Gallertmatrix aufweist. Querschnitte zeigten jedoch sehr deutlich, dass sich die bei der Sporulation herauskatapultierten Sporen noch innerhalb eines Ascus befanden (Abb. 63).

Bisher wurde das Ausschleudern von Sporenclustern als Selektionsvorteil betrachtet. Der Mycobiont konnte nach Auskeimung von mehreren Sporen schneller eine radiäre Form des Mycels erreichen. Das ermöglichte damit eine effektivere Besiedlung des Substrats und damit die optimale Ausschöpfung der vorhandenen Nährstoffe über eine größere Fläche. In der freien Natur bedeutet diese Fähigkeit auch eine Erhöhung der Chance für das Auftreffen auf den passenden Symbiosepartner (Ott, 1987). Gleichfalls erlaubt aber die Clusterform auch ähnliche Eigenschaften der Optimierung von Strahlungsschutz und Schutz vor schädlichem Vakuumeinfluss, wie sie bereits bei den Photobionten zu beobachten war.

12.1.3. Bedeutung der Gallerte für die Bionten sowie für die Flechtensymbiose

Die hohe Überlebensfähigkeit der Photobionten und der hyalinen Ascosporen in den Fruchtkörpern sowie aber auch der Hyphen des Mycobionten gegenüber den simulierten Weltraumbedingungen beruht unter anderem auf den poikilohydrischen Fähigkeiten, das heißt der wechselfeuchten Natur der Flechten. Flechten sind artspezifisch unterschiedlich in der Lage, Wasser bis zur Sättigung aufzunehmen, als auch sehr starke Trockenheit in regelmäßigen oder unbestimmten Zeitabfolgen zu tolerieren. Bei Trockenheit können bei Flechten im Mittel (\leq) 20 % Wasser und bei Feuchtigkeit eine Wassersättigung mit (\geq) 160 % Wasser pro Thallusgewicht (Kappen, 1988) nachgewiesen werden. Die Fähigkeit zur Poikilohydrie erlaubt es der Flechte während sehr trockener Perioden in ihrem natürlichen Habitat in einen Zustand der Dormanz zu gelangen, in der die Stoffwechselaktivität

IV. Diskussion

heruntergesetzt wird, aber die Vitalität der Bionten erhalten bleibt. Dies könnte durch die Präsenz der Gallertmatrix im Thallus erreicht werden, die praktisch ein Carbohydrat-Biofilm ist, welcher aus Biokrusten bereits bekannt (Belnap et al. 2001) ist. Dieser Carbohydrat-Biofilm ist in der Lage, Wasser zu speichern und kann damit als Wasserreservoir während langer Trockenzeiten fungieren (Flemming and Wingender 2001; Wharton, 2002). Eine Reihe von Carbohydrat-Molekülen ist durch Untersuchungen an Pilzen und Mycobionten sowie an Photobionten bekannt. Dabei handelt es sich um Zuckeralkohole, wie Polyol, Mannitol, Sorbitol, Arabitol und Ribitol, welche als schützende Agenzien mit anderen Makromolekülen ebenfalls einen Wasserersatz während trockener Perioden bilden können (Jennings & Lysek 1999). Aufgrund der massiven Präsenz von Zuckern und Zuckeralkoholen befinden sich in den Flechten vermutlich Makromoleküle, wie das Disaccharid Trehalose, welche die Carbohydrat-Gallertmatrix, den schützenden Biofilm bilden (Jenning & Lysek 1999). Dieses Molekül besitzt die typischen Eigenschaften eines Stabilisators von trockenen Membranen anhydrobiotischer Organismen (Crowe et al. 1984, Crowe et al. 1996). Die bei den Vakuumexperimenten entstehende Trockenheit hätte somit keine unmittelbaren Folgen auf das System Flechte sowie auf den Mycobionten oder auf die Photobiontencluster.

12.1.4. Strahlungsschutz durch Parietin und Chitin

Schon in den ersten Experimenten zeigte sich eine hohe Sensitivität der Photobionten gegenüber direkter UV-Einstrahlung und Vakuumeinfluss. Während die Vakuumresistenz der Photobionten, wie in Kap. 12.1.2 und 12.1.1.1 erläutert, von der Lage der Zellen in Clustern oder im Flechtenthallus und von der sie umgebenden Gallerte abhängig ist, ist Strahlungsresistenz der Photobionten in der Symbiose noch auf eine Reihe weiterer Faktoren zurückzuführen. Im Thallus befindliche Photobionten sind nicht nur aufgrund morphologisch-anatomischer Besonderheiten gegenüber sehr harter UV-Strahlung geschützt, sondern der Pilz kann durch seine Ummantelung dem empfindlichen Symbiosepartner einen effizienten Schutz bieten. Auch die Einbettung in eine Gallertmatrix kann ein zusätzlicher Schutz vor Strahlung bedeuten.

Die Ergebnisse aus den Vitalitätstests, den Keimungs- und Kulturexperimenten sowie aus der Photoproduktanalyse an der DNA der Bionten weisen auf eine stärkere Resistenz des Mycobionten hin. Er übersteht die simulierten Weltraumbedingungen fast ohne Schädigung. Insbesondere ist dies im Falle der untersuchten Hochgebirgsflechte von *X. elegans*

augenfällig. In einigen Fällen ist sogar eine Farbreaktion des Pilzes erkennbar. Je länger Mycelien der UV-Strahlung ausgesetzt waren, um so stärker verfärbte sich das blass-weiß bis blass rosa- farbige Mycel in ein intensives rosé und CLSM-Aufnahmen bestätigten gleichfalls die starke Verfärbung der rosafarbenen Autofluoreszenz nach rot (Abb. 60 c-d). Es kann angenommen werden, dass die eingesetzte UV-Strahlung die Induktion eines rötlichen UV-absorbierenden Stoffes bewirkt, welcher im Fall von *X. elegans* Carotin, Parietin oder Vorstufen des Parietins sein könnte.

Frühere Untersuchungen sowohl mit den Flechtenthalli als auch mit dem isolierten Mycobionten zeigten auch nach Bestrahlung mit weißem Licht bereits eine lichtabhängige Reaktion (Honegger et al.1990, Solhaug et al. 2003). Eine verstärkte Bildung von intensiv roten Farbstoffen war in diesen Untersuchungen feststellbar. Rosa bis intensiv rote Färbung unter UV-Licht war hier zweifelsfrei auf das Parietin zurückzuführen. Dasselbe gilt für die in dieser vorliegenden Arbeit untersuchten Fluoreszenzbilder des CLSM. Es finden sich bei den getesteten Mycelien des Mycobionten jedoch keine Kristallabscheidungen, so dass offen bleibt, ob der letzte notwendige Kristallisationsschritt bzw. die Abscheidung der Kristalle auf den Zellwänden der Hyphen aufgrund zeitlich befristeter Beobachtung oder aufgrund fehlender Syntheseschritte, die verstärkt in Anwesenheit der Photobionten erfolgen können, nicht möglich ist. Es ist bereits bekannt, dass bei *Xanthoria parietina* als auch bei *X. elegans* für die Parietinproduktion die Anwesenheit der Photobionten aufgrund ihrer Zuckeralkohol- (meist Ribitol) und Zuckerproduktion und damit letztendlichen Energielieferung für die notwendige Flechteninhaltsstoffproduktion förderlich ist (Honegger et al. 1990, Solhaug & Gauslaa 2004).

Jedoch ergab sich in den Untersuchungen an bestrahlten isolierten Mycobionten der hier vorliegenden Arbeit, dass die Abwesenheit der Photobionten die Resistenzfähigkeit des Mycobionten von *X. elegans* kaum einschränkt. Selbst wenn bei isolierten Mycobionten der Parietinanteil nicht so optimal gebildet wurde und auskristallisieren konnte, wie es im Thallusverband durch CLSM-Fluoreszenzbilder der Kristallschicht erkennbar ist, konnte der Mycobiont von *X. elegans* offensichtlich sehr gut hohe UV-Strahlungsdosen überleben und war zudem noch wachstumsfähig. Beim Mycobiont von *F. bracteata* war jedoch keine Verfärbung der Mycelien erkennbar und abgesehen von der Konservierung der Vitalität der Hyphen, war das Mycel nach Bestrahlung nicht mehr wachstumsfähig. Die fehlende Pigmentbildung wirkt sich damit wahrscheinlich nach UV-Bestrahlung negativ auf die

IV. Diskussion

Wachstumsfähigkeit des Mycobionten von *F. bracteata* aus. In diesem Zusammenhang bleibt die Frage, welcher Resistenzmechanismus zusätzlich zu den vorhandenen Pigmenten, wie das Parietin, einen Strahlenschutz bieten kann, der letztendlich den Mycobionten beider Flechten zumindest ermöglicht, die Vitalität der Hyphen aufrecht zu erhalten.

Eine mögliche Antwort kann das in der Zellwand befindliche Chitin bieten. Chitin findet man in allen Pilzen, den Ascomyceten sowie Basidiomyceten, und auch in den zu den zumeist zu den Ascomyceten gehörenden Flechtenpilzen (Boissière 1967, Honegger & Bartnicki-Garcia 1991, Ahmadjian 1993). Es kann aufgrund seines Absorptionsverhaltens gerade im UV-Bereich ebenfalls eine wichtige Rolle beim UV-Schutz spielen. Viele Untersuchungen über Chitin konnten bereits zweifelsfrei nachweisen, dass es als Zellwandkomponente im UV-Spektrum Absorptionsoptima bei 200 nm, 210 nm, 300 bis 330 nm besitzt (van der Drift et al. 1996, Thoss 1999). Sehr wahrscheinlich ist auch die hohe Strahlenresistenz von einigen Insekten gegenüber verschiedene Strahlungsformen (Berenbaum 2001, Bletchly & Fisher 1957, Cork 1957, Davey 1919, Lee et al. 1984, Meyer-Rochow et al. 2002, Misra Parvathy Bhatia 1998, Ross & Cochran 1963, Upton 2001, Vernós et al. 1989, Wharton & Wharton 1957, 1959) möglicherweise unter anderem auch auf die Präsenz von Chitin in ihren Exoskeletten zu begründen.

12.1.5. Resistenz hyaliner Ascosporen

Hyaline Ascosporen sind Pilzsporen, die im Lichtmikroskop äußerst transparent erscheinen und keinerlei sekundäre Metaboliten, wie Melanin, Usninsäure oder Parietin eingelagert oder aufgelagert haben. Die hier untersuchten Flechtenarten bilden beide die hyalinen Ascosporen. Die Ergebnisse der Strahlenversuche an hyalinen Ascosporen von *F. bracteata* und *X. elegans* zeigten in Abhängigkeit von ihrer Lage im oder außerhalb des Thallus deutliche Unterschiede bei der Resistenz. Wie bereits in den vorangehenden Kapiteln erläutert, sind aufgrund der anatomischen Struktur und der Präsenz von Parietin auf dem Hymenium die Ascosporen in den Fruchtkörpern äußerst effizient geschützt. Die Vitalität und die Keimungsfähigkeit der Sporen wurden nach extremer UV-Bestrahlung und Vakuum kaum beeinträchtigt.

Ein stärkerer Effekt der simulierten Weltraumparameter konnte auf die isolierten, ungeschützten Sporen beider Flechten beobachtet werden. So nahmen die Vitalität der isolierten Ascosporen sowie die Keimungsfähigkeit mit zunehmender Dosis der simulierten

Weltraumparameter ab. Nur Sporen, die in Clustern bzw. mit den vollständigen Ascis auf das Substrat ausgeschleudert wurden, waren vor schädlicher Strahlung und dem Vakuum geschützt (siehe Kap. 12.1.2).

Aufgrund dieser Ergebnisse ergibt sich folgende Schlussfolgerung: das Resistenzpotential der hyalinen Ascosporen ist begrenzt. Die Resistenzfähigkeit gegenüber den Weltraumparametern muss für isolierte, außerhalb des Ascus befindliche, hyaline Ascosporen als äußerst gering eingeschätzt werden. Das Fehlen von dunkel inkrustierten, zuweilen ornamentierten Wänden der Sporen, wie sie bei anderen Flechten extremer Standorte meist zu beobachten sind (z.B. Gattung *Solorina*, Thomson & Thomson 1984) spielt sicherlich für die geringe Resistenzfähigkeit gegenüber den Weltraumparametern eine wichtige Rolle.

12.2. Funktion latenten Lebens

Alle in Kap. 12.1. beschriebenen Resistenzmechanismen führen zu einem äußerst wirksamen Schutz der wichtigsten Überlebensfunktionen und zu einer sehr guten Konservierung der Vitalität der beiden untersuchten Flechten.

Ein weiterer möglicher Resistenzmechanismus wurde bisher jedoch ausgeklammert. Dieser Mechanismus, der insbesondere mit den in den vorangegangenen Kapiteln erwähnten Resistenzfaktoren im Zusammenhang steht und als unmittelbare Folge davon gesehen werden muss, ist die Fähigkeit der Flechten in den Zustand latenten Lebens überzugehen. Latentes Leben wird nach Feofilova (2003) als eine von vier bekannten Formen der Vitalitätsaktivitätsverzögerung (VAV, engl. DVA = Deceleration of Vital Activity) definiert, welche durch Abnahme des Metabolismus gekennzeichnet ist. Zum VAV gehören ebenfalls die Quiescence (eine exogene durch beispielsweise Wassermangel erzwungene Wachstumseinstellung oder endogene Ruhepause durch Einstellung physiologischer Prozesse - bei Sporen, auch Parapause genannt), die Cryptobiose, welche bei ungünstigen Bedingungen den Metabolismus von Organismen oder Organisationsformen sehr stark einschränkt und eventuell auf eine verborgene Aufrechterhaltung aller Lebensfunktionen durch biochemische Veränderungen im Stoffwechselkreislauf während der zu überbrückenden „lebensfeindlichen“ Phase zurückzuführen ist und die Anabiose, ergo die Konservierung der Induktionsfähigkeit für einen intakten Stoffwechsel nach einer dem Tod ähnelnden Ruhephase, beispielsweise nach völligem Wasserentzug (van Leeuwenhoek 1802). Latentes Leben kann fast synonym zu

IV. Diskussion

Cryptobiose verwendet werden. Die Lebensform weicht hier aber im Gegensatz zur Cryptobiose nur vorübergehend auf einen verborgenen alternativen cryptobiotischen Stoffwechsel aus und kann sogar im Endstadium die vollkommene todesähnliche Starre mit der Einstellung aller Lebensfunktionen erreichen, welche aber beim Antreffen günstigerer Bedingungen für die Lebensform reversibel ist und somit auch die Konservierung der Anabiosefähigkeit beinhaltet. Die Fähigkeit einer Lebensform in latentes Leben übergehen zu können, kann folglich als die Summe der verschiedenen Formen der VAVs bezeichnet werden. Flechten sind in diesem Kontext auch Modellorganismen, die durch eine besondere Form latenten Lebens gekennzeichnet sind, da die Symbiose von zwei bis sogar mehreren Bionten aus den beiden Reichen von Prokaryoten und Eukaryoten einem komplexen System die selbe Fähigkeit der Konservierung aller Lebensfunktionen verleiht, wie sie bereits bei den einfachsten Lebensformen der Bakterien beobachtet werden konnten, welche dadurch sogar bis zu Millionen von Jahren beispielsweise im Permafrost überleben konnten (Gilichinsky, D., 2003, Shi et al. 1997, Vishnivetskaya, 2000).

13. Wachstumsverhalten des Mycobionten

Der Mycobiont von *F. bracteata* war als Mycel ebenfalls sensitiver als der Mycobiont von *X. elegans*. Er stellte bei höheren Dosen der Weltraumparameter sein Wachstum vollständig ein. Dies bedeutet, dass die Strahlung, aber auch der hohe Austrocknungsgrad durch Vakuum direkten Einfluss auf das Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* hat.

13.1. Wachstum nach UV-Strahleneinfluss

In Bezug auf die geringere Strahlenresistenz von *F. bracteata* können folgende Überlegungen in Betracht gezogen werden: da in Abhängigkeit von der Expositionsdauer bei der Bestrahlung eine Farbreaktion der Mycelien von *X. elegans* auftrat, welche beim Mycobionten von *F. bracteata* nicht zu beobachten war (siehe Kap. 12.1.4), kann man von einer möglichen UV-induzierten Pigmentsynthese bei *X. elegans* ausgehen, welche das Mycel verstärkt vor möglichen Schäden schützt. Dieser Schutz könnte weitere Penetration schädlicher UV-Strahlung in die Zellen verhindern und damit mögliche Folgeschäden an den für das Wachstum erforderlichen Sequenzen auf der DNA verhindern und eine von Strahlung unbeeinflusste Proteinsynthese für das Wachstum der Hyphen ermöglichen. Diese Fähigkeit scheint jedoch der Mycobiont von *F. bracteata* nicht zu besitzen, so dass die Einstellung des

Wachstums sehr wahrscheinlich auf diesen Verlust der Pigmentsynthese zurückzuführen ist. Um vollständige Sicherheit für die hier postulierte Erklärung für die Wachstumshemmung zu erlangen, wären Untersuchungen von Häufigkeiten und Verteilungen der DNA-Schäden, wie beispielsweise die bei *X. elegans* erfolgten Photoproduktanalysen, notwendig gewesen. Sicherlich hätten Ergebnisse aus dieser Analyse am Mycobionten von *F. bracteata* im direkten Vergleich mit den Ergebnissen vom Mycobionten von *X. elegans* mehr Aufschluss über die postulierte Begründung geben können. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit die Bildung von UV-induzierten Photoprodukten der DNA nach Bestrahlung der Mycelien von *F. bracteata* nicht analysiert werden. Sicherlich hätten Ergebnisse dieser Analyse wertvolle Informationen bezüglich der Mutagenität des Mycobionten nach Bestrahlung liefern können. Nicht zuletzt können verschiedene Reparaturmechanismen der DNA in beiden Flechten eine weitere Begründung für das unterschiedliche Wachstumsverhalten beider Arten sein. Ebenfalls können morphologisch-anatomische Gründe vorliegen, die im folgenden Abschnitt auch für die unterschiedliche Vakuumresistenz der beiden Flechten erläutert werden.

13.2. Wachstum nach Vakuumexposition

Auch Vakuumexposition hatte bei *F. bracteata* eine Hemmung des Wachstums zur Folge. Eine mögliche Erklärung ist die Strukturierung im Mycel. Während Hyphen des Mycobionten von *X. elegans* ein dichtes Geflecht im Mycel bilden und abgerundet geschlossene Spots auf den Nährsubstraten bilden, sind die Mycelien von *F. bracteata* großflächiger verteilt sowie offen und locker strukturiert und erscheinen makroskopisch wie ein Rasen aus Hyphen. Das bedeutet, dass aufgrund der lockeren Mycelstrukturierung von *F. bracteata* eine viel größere Angriffsfläche für das Vakuum vorhanden ist und eine maximale Austrocknung der Zellen möglich ist, die offensichtlich schädliche Auswirkungen auf die Wachstumsfähigkeit hat. Ob diese Schäden dauerhaft sind, oder ob eine längere Regenerationsfähigkeit beim Mycobionten von *F. bracteata* für eine neue Initiation des Wachstums notwendig ist, war in dieser Arbeit nicht feststellbar.

13.3. Der unterschiedliche Anpassungsgrad des Mycobionten und des Flechtenthallus

Unter den künstlich veränderten Bedingungen besitzt die Hochgebirgsflechte *X. elegans* offensichtlich aufgrund der hier erzielten Ergebnisse einen Selektionsvorteil gegenüber der Flechte *F. bracteata* aus Gotland. *X. elegans* kann aufgrund des hohen Resistenzpotentials des

IV. Diskussion

Mycobionten sogar im Rahmen der angewendeten Parameter ein breiteres Spektrum der UV-Strahlung sowie einen höheren Austrocknungsgrad überstehen. Die unterschiedliche Reaktion der Mycobionten auf die Parameter könnte auch ein Hinweis auf den unterschiedlichen Anpassungsgrad an ihre jeweiligen natürlichen Habitate sein. *X. elegans* ist im Hochgebirge sowie in den polaren Regionen aufgrund des Ozonlochs oder wegen der dünneren Atmosphäre einer höheren UV Strahlung ausgesetzt. Zudem bewächst die Flechte *X. elegans* nackten Fels, bei dem die Wasserverfügbarkeit aufgrund des schnellen Abflusses und stärkerer Verdunstung sowie durch den häufigen festen Aggregatzustand des Wassers in Form von Eis und Schnee äußerst gering ist. Eine schnelle Austrocknung zumindest des Habitats ist die Folge. Hohe UV-Strahlung und extreme Trockenheit sind damit für *X. elegans* die Regel.

Trockenheit herrscht in den Habitaten von *F. bracteata* auf Gotland ebenfalls vor. Jedoch sind die Substrate, die diese Flechte besiedelt, meist Moose und andere Flechten (Elders 1991, Meier 1994, Osenberg 1993, Ott et al. 1995, 1996, 1997), die als zusätzlicher potentieller Wasserspeicher dienen können. Das Wasser steht im Vergleich zu den Habitaten im Hochgebirge zumindest für einen längeren Zeitraum zur Verfügung. Auch der Ablauf des Wassers ist aufgrund von Staunässe auf dem kalkhaltigen Felsuntergrund nicht so stark ausgeprägt. Da die Atmosphäre in den Breiten, wo *F. bracteata* vorkommt, aufgrund ihrer höheren Dichte ebenfalls einen großen Teil der UV-Strahlung absorbiert, kann man von einem geringeren UV-Stress am natürlichen Standort für die Flechte *F. bracteata* ausgehen. Die unterschiedlichen Anpassungsmuster spiegeln sich folglich auch unter den simulierten Weltraumparametern wider.

13.4. Wachstum auf unterschiedlichen Substraten

Die hier diskutierten Ergebnisse der beiden Flechtenarten *F. bracteata* und *X. parietina* auf verschiedenen Substraten können nicht ohne weiteres verallgemeinert werden und damit nicht für die Flechte *X. elegans* gelten. Man kann nur verschiedene Tendenzen aufzeigen, die innerhalb der *Telochistaceae* erkennbar werden.

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Mycobionten der Flechten *F. bracteata* und *X. parietina* auf den verschiedenen Nährmedien zeigt eine eindeutige Tendenz der Bevorzugung mineralreicher Substrate durch die beiden getesteten Mycobionten. Insbesondere für den Mycobionten von *X. parietina* wurde die Tendenz der Bevorzugung von Mischsubstraten wie MY/Erdextrakt, MY/Marsextrakt, H₂O-Agar/Erdextrakt, H₂O-Agar/Marsextrakt sehr

deutlich. *F. bracteata* wies ein eingeschränktes Wachstum beim MY/Mars-Extraktsubstrat auf. Der Mycobiont von *F. bracteata* kann viel besser die terrestrischen Minerale seines Standortes, die im Erdextrakt vorhanden waren, für ein optimales Wachstum verwerten als die Mineralienzusammensetzung des Marsextrakts, während für *X. parietina* die Anwesenheit beider Extrakte im Kulturmedium keine signifikanten großen Unterschiede im Wachstum hinsichtlich des Substrats aufzeigen. Folglich scheint die kosmopolitische Flechte *X. parietina* weniger wählerisch zu sein als die zur „Bunten Erdflechtengesellschaft“ zugehörige Flechte *F. bracteata*. Wenige Kulturexperimente mit *X. elegans* auf dem JSC-Mars-1 Substrat (Abb. 40), welche zudem mit simulierten Weltraumparameter tests gekoppelt waren, zeigten ebenfalls, dass ungestörtes Wachstum des Mycobionten auf dem besagten Marssubstrat möglich war. Unter astrobiologischem Gesichtspunkt kann man vorsichtig postulieren, dass zumindest zwei Arten der Gattung *Xanthoria* die Marssubstrate (jedoch mit Agarzusatz idealisiert) für ihr Wachstum genauso gut verwerten können, wie entsprechende Erdextraktsubstrate.

14. Wachstumsverhalten des Photobionten nach simulierter Weltraumexposition

Fast deckungsgleich mit den Ergebnissen der Vitalitätsanalyse ergaben die Kulturversuche ähnliche Tendenzen bei der Wachstumsanalyse. Der Photobiont ist in der Flechtensymbiose eindeutig der sensitivere Partner, der nach UV-Strahlung sowie Vakuumexposition sehr schnell seine Grenzen für das Überleben erreicht. Dies wird nicht zuletzt durch den hohen Photoproduktanteil in der DNA der Photobionten von *X. elegans* sehr deutlich. Schon wenige Stunden (4 bis 8 Stunden) Vakuum- bzw. UV-Exposition haben einen negativen Einfluss auf das Wachstum und führen sogar zur Degeneration der auf dem Substrat noch vorhandenen Photobiontenzellen. Auch hier kann wieder eine leicht verbesserte Resistenz des Photobionten von *X. elegans* gegenüber dem Photobionten von *F. bracteata* beobachtet werden. Offensichtlich haben die hohe Strahlenintensität und UV-Dosis im Hochgebirge bei *X. elegans* nicht nur beim Mycobionten zu einer optimaleren UV- und Trocken-Anpassung geführt. Auch der Photobiont von *X. elegans* konnte sich an diese Umweltbedingungen anpassen und besitzt offensichtlich unter den simulierten Weltraumbedingungen einen Selektionsvorteil gegenüber dem Photobionten von *F. bracteata*. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich durch molekularbiologische Untersuchungen (siehe Kap. 8.5.) herausstellte, dass *X. elegans* sowie *F. bracteata* die selbe Photobiontenart in ihrem Thallus eingebunden haben, obwohl sie isoliert in Kultur ein unterschiedliches Wuchsverhalten

IV. Diskussion

(ausgeprägte Clusterbildung bei *F. bracteata* oder geringe Clusterbildung bei *X. elegans*) aufweisen und zudem gering abweichende Reaktionen zu den extremen Simulationsbedingungen zeigen. Die Unterschiede im Reaktionsverhalten gegenüber den simulierten, extremen Parametern könnten, wie bereits erläutert, aufgrund des unterschiedlichen Anpassungsgrades der beiden Flechten gegenüber den natürlichen Habitaten erklärbar sein. Photobionten von *X. elegans* sind einem viel höheren Anteil an UV-Strahlung im Hochgebirge ausgesetzt als die im Flachland lebende Flechte *F. bracteata*.

Die Art des Symbiosekontaktes zwischen dem Photobionten und dem Mycobionten im Thallus der beiden Flechtenarten könnte ebenfalls einen Einfluss auf das unterschiedliche Wuchsverhalten und das Resistenzpotential des Photobionten haben. Vermutlich wirkt im Falle von *X. elegans* der vor der isolierten Kultivierung bestehende symbiotische Kontakt vom Photobionten zum Mycobionten optimierend auf die Resistenzfähigkeit des Photobionten. Da der Photobiont von *X. elegans* prinzipiell eine deutlich höhere Resistenz gegenüber simulierten Weltraumbedingungen zeigt als dieselbe Photobiontenart isoliert aus *F. bracteata*, kann ein Einfluss des Mycobionten auf den Photobionten bezüglich der unterschiedlichen Resistenz postuliert werden. Eine Übertragung von Resistenzeigenschaften des Mycobionten auf den Photobionten auf genetischer Ebene könnte für eine mögliche Erklärung der leicht stärkeren Resistenz des Photobionten von *X. elegans* in Betracht gezogen werden.

Ergänzend muss erwähnt werden, dass ähnliche Substrattests mit den Photobionten beider Flechtenarten, wie sie beim Mycobionten erfolgten, aufgrund der limitierten MARS-I-Substratmenge leider nicht durchgeführt werden konnten.

15. Schlussfolgerungen aus der Photoproduktanalyse des 3-Komponenten-Systems von *X. elegans*

Der Mycobiont von *X. elegans* ist vor der Thymindimerproduktion als eines der durch UV-Strahlung induzierten Formen von DNA-Schäden geschützt. Mit Hilfe der in dieser Arbeit angewendeten HPLC-Tandem-Massenspektrometrie-Methode konnten keine Photoprodukte nachgewiesen werden, obwohl die DNA-Massenausbeute des Mycobionten höher gegenüber der Masse der DNA aus den Photobionten (in µg) war. Da im Verhältnis zum Flechtenthallus beim Mycobionten nur wenig vor UV-Strahlung schützende kristalline Pigmente wie das

Parietin über die CLSM-Fluoreszenz-Analyse detektierbar waren, kann der geringe Einfluss des UVs auf die DNA auf molekulare Schutzmechanismen begründet sein. DNA-Schutzproteine bzw. Reparaturmechanismen der DNA könnten dafür verantwortlich sein.

Der Photobiont zeigte im Gegensatz dazu einen relativ hohen Anteil aller Formen der Thymindimer-Photoprodukte. Setzt man dies in Relation zu den Vitalitätstests und Kulturversuchen des Photobionten, so erkennt man, dass möglicherweise auch die Einschränkung bis absolute Einstellung des Wachstums sowie die Abnahme der Vitalität des Photobionten molekulare Ursachen hat. Die viel stärker geschädigte DNA ist vermutlich auch im Bereich von wichtigen Genen, die für das Wachstums und die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen sowie für die für den die Vitalität der Zellen steuernden Stoffwechselprozess notwendig sind, in Mitleidenschaft gezogen worden. Damit bleibt vermutlich der Zelle kein anderer Ausweg, als die Apoptose auszulösen, welche durch SYTOX-green bei den entsprechenden Vitalitätstests detektierbar war.

Die Gesamtflechte (Myco- und Photobiont) weist auch Photoprodukte der DNA auf und besitzt somit leichte Schädigungen. Diese Schäden können aber bei Betrachtung der Gesamtausbeute der Flechten-DNA zu der DNA-Ausbeute der Photobionten unmissverständlich auf Schäden der im Flechtenverband befindlichen Photobionten zurückgeführt werden. Ein weiteres Indiz für diese Annahme ist auch der hohe Anteil an Sporen-TT in den Flechten, der nur durch die Vermehrungsform der Autosporenbildung der Photobionten erklärbar ist, denn die besagten Autosporen sind gerade in zumeist jungen Thalli sowie Randbereichen der Loben der Flechte häufig anzutreffen.

Die Apothecien der Flechte hingegen weisen keinerlei Schäden auf, was nicht zuletzt, wie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert, aufgrund der kompakten Struktur der Fruchtkörper und der vielschichtigen Parietinauflage auf dem Hymenium zurückgeführt werden kann. Das Fehlen von DNA-Schäden bei den Apothecien hebt zudem die besondere Schutzfunktion der Fruchtkörper für die Ascosporen hervor. Die Reproduktionsorgane mit den hyalinen Sporen können optimal geschützt werden und eine Reduktion bzw. Verhinderung der durch Strahlung induzierten Mutationen wird ermöglicht, so dass die nächste Generation der Flechtenpilze unbeschadet wieder auskeimen und wachsen kann.

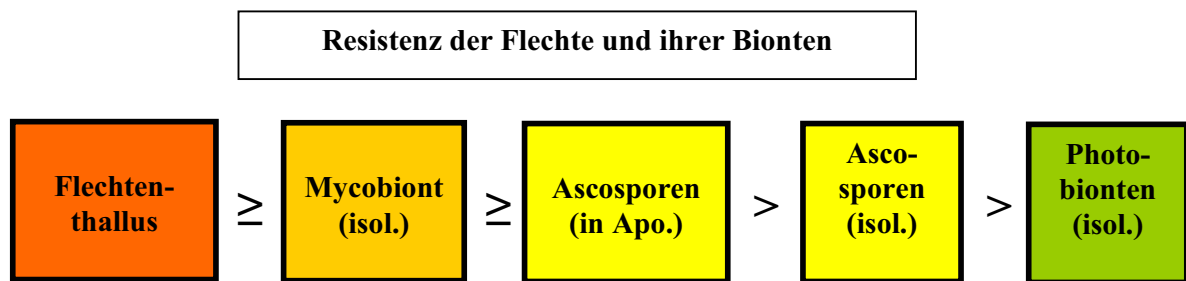
IV. Diskussion

1 . Resistenzmodell gegenüber den Weltraumparametern in Abhängigkeit von Art und Symbiosegrad

Die Ergebnisse in dieser Arbeit führen zu spezifischen Resistenzabstufungen, die einen unterschiedlichen Grad der Konservierung von Vitalität und Wachstumsfähigkeit in Abhängigkeit von der verwendeten Flechtenart sowie in Abhängigkeit von dem Zustand des Biontenkontaktes (ob lichenisierter oder isolierter Biont) erlauben.

Jede Flechte sowie die jeweiligen Bionten ergeben gegenüber den Weltraumparametern folgendes Resistenzschema: die Flechte und die im Thallus lichenisierten Bionten zeigen in dieser Form eine hohe Resistenz. Die Resistenz gegenüber den simulierten Weltraumparametern nimmt vom isolierten Mycobionten zu den in Apothecien eingebetteten Ascosporen und letztendlich zu den isolierten Ascosporen deutlich ab. Die aus dem Thallus isolierten Photobionten zeigen die geringste Resistenz.

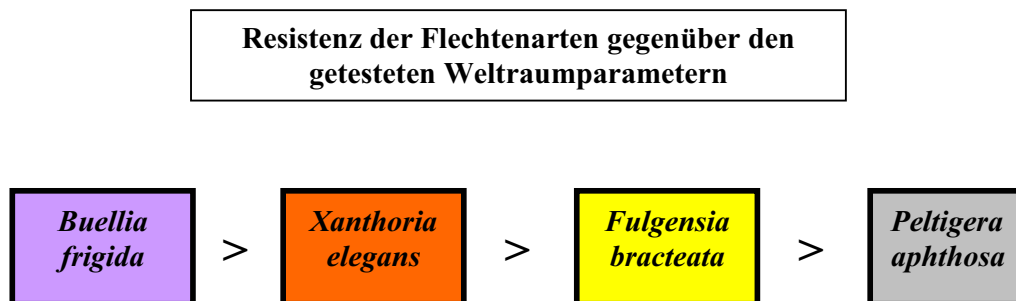
Dies lässt sich sehr gut durch ein Modellschema veranschaulichen:



Dieses Schema zeigt sehr deutlich den Selektionsvorteil, den die Symbiose der Bionten im Flechtenthallus besitzt. Die Evolution begünstigte offensichtlich die Symbiose.

Dass die Flechtensymbiose in verschiedenen Ausprägungen vorkommt und somit verschiedene Flechtenarten unter den verschiedenen Umweltbedingungen ihrer Habitate auch unterschiedliche Anpassungsmuster aufweisen, kann nicht zuletzt auch durch Ergebnisse der Diplomarbeit von Wieners (2005) gestützt werden. In dieser Diplomarbeit konnten Unterschiede zwischen verschiedenen Flechtenarten nach UV-Bestrahlung festgestellt werden. Während die Flechte *Peltigera aphthosa* von Standorten mit geringer natürlicher Strahlungsfluenz (Schattenflechte) unter den selben monochromatischen UV C-Dosen, wie sie in den hier durchgeführten Experimenten verwendet wurde, bereits nach einer

Expositionszeit von 1 Stunde ihre Vitalität vollständig einbüßte, so konnte die antarktische Flechte *Buellia frigida*, die zudem an extremen Standorten des antarktischen Kontinents gesammelt wurde, die eingesetzten Parametern fast unbeeinflusst überleben. Dies führt unweigerlich zu einer graduellen Resistenz-Einstufung der verschiedenen Flechtenarten. Das folgende Resistenzmodell basiert auf den Ergebnissen aus der eigenen Arbeit sowie auf Ergebnissen aus der Diplomarbeit von Wieners (2005).



17. Erörterung: Interplanetarer Austausch von Leben am Beispiel von *X. elegans*

Die Diskussion der Ergebnisse über die Asteroiden/Meteoriten-Einschlags-Simulationen gestaltet sich nicht zuletzt wegen sehr geringer zur Verfügung stehender Literatur als äußerst schwierig. Die Frage über die Wahrscheinlichkeit einer Panspermie ist nicht leicht zu beantworten, ohne mögliche Thesen, Hypothesen und Spekulationen anzusprechen. Allzu viele Parameter spielen im Szenario eines möglichen interplanetaren Austausches eine Rolle. Viele und aufwendige Tests wären nötig, um einer zufrieden stellenden Antwort nur annähernd nahe zu kommen. Somit soll die nun folgende Erörterung für das „Pro“ und „Kontra“ einer erfolgreichen Panspermie nur ein Versuch sein, darzustellen, in wieweit die in den Schockwellen-Experimenten getestete Flechte *X. elegans* als Vertreter eines eukaryotischen Symbioseorganismus für einen erfolgreichen interplanetaren Transfer in Frage kommen könnte. Selbst, wenn vieles noch Spekulation bleiben sollte, so wäre es sicherlich nicht uninteressant dieses Themenfeld einmal zu diskutieren.

17.1. Interpretationen für die Hochdruckresistenz von *X. elegans*

Die Asteroiden-Simulations-Analysen erfolgten in dem hier vorgestellten Fall mit *X. elegans*, da diese Flechte und insbesondere ihr Mycobiont bereits in den Vorversuchen eines simulierten begrenzten Aufenthalts im All (2. Phase eines Panspermie-Szenarios: Transferphase durch das All; Horneck et al. 2001a, b, c) hohe Überlebens- sowie Wachstumsraten zeigen konnte (de la Torre 2002, de la Torre et al. 2004; de Vera et al. 2003, 2004a, b).

Mit Hilfe der Schockwellenanalyse konnte nun das Wissen über das Resistenzpotential der Flechte unter sehr hohen Drücken und Temperaturen, wie dies nach einem Asteroideneinschlag der Fall ist (1. Phase des Panspermie-Szenarios Horneck et al. 2001a, b, c), getestet werden und die damit erfolgten Analysen fügten sich ideal in das Thema der vorliegenden Dissertation über das Überleben von Flechten in Grenzbereichen des Lebens und Überlebens ein. Die Ergebnisse zeigten eine überraschende Plastizität der Flechten. Würde die Flechte durch einen Asteroideneinschlag getroffen, so könnten, wie die Ergebnisse zeigten, wenige Photobionten bei einem Einschlagsdruck von 10 bis 30 GPa noch überleben, während der Mycobiont in Form der Ascosporen sogar bis zu 50 GPa überstehen kann. Der Grund für die hohe Resistenz der Sporen unter diesen hohen Drücken kann zurzeit noch nicht erklärt werden. Eine Interpretation wäre nur spekulativ. Es soll aber hier ein Versuch einer möglichen Erklärung erfolgen: vermutlich spielt die Gallertmatrix eine wichtige Rolle. Wenn die Schockwelle an der Oberfläche der Flechtenproben angekommen ist, so könnte die Gallerte durch die Hitze aufschmelzen und wie ein Fluidum wirken, das zu den Seiten des Gabbros hin verdrängt wird und sich dort aufgrund des Containers aufstaut. Dieses aufgestaute Material könnte dort auch für die Abpufferungen möglicher schädlicher Wirkungen eines Einschlags auf das Flechtengewebe verantwortlich sein, und damit wäre die Präsenz intakter Flechtenthalli zumindest bei 10 GPa sowie das häufige Auffinden von intakten, vitalen Ascosporen bei höheren Drücken von bis zu 50 GPa in den Randbereichen der Gabbrounterlage eine mögliche Erklärung. Bei höheren Drücken von 40 bis 50 GPa kann auch ein hoher Wassergehalt im Probenzylinder, wie er bei Öffnung der Proben feststellbar war, eine Rolle für die Konservierung der Sporen und der daraus resultierende Erhalt der Keimungsfähigkeit spielen. Der hohe Wasseraustritt ist bisher ungeklärt, könnte aber aus den umgebenden Zellen bei den höchsten Einschlagsdrücken ausgetreten sein.

17.2. Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Panspermie der Flechte *X. elegans*

Eine erfolgreiche Panspermie der epilithischen Flechte *X. elegans* kann es von der Erde ausgehend wahrscheinlich nicht geben, da diese Flechte im natürlichen Habitat nicht endolithisch ist, das heißt nicht im Gestein lebt, so dass eine abdeckende Gesteinsschicht keinen Schutz vor den Folgen eines Asteroideneinschlags bieten kann. Aufgrund der zu den biologischen Tests zusätzlich erfolgten mineralogischen Untersuchungen, konnten bei den hier getesteten Drücken der simulierten Asteroiden- bzw. Meteoriteneinschläge Veränderungen der Mineralien im Gestein festgestellt werden (Meyer 2005). Diese Veränderungen führten zu Rückschlüssen auf die durch den Schockwellendruck resultierenden sehr hohen Temperaturen (siehe Kap. 3.1.4). Die hier festgestellten Temperaturbefunde lassen nur folgenden Schluss zu: die epilithische Flechte wäre auf der Oberfläche des Gesteins sofort verbrannt.

17.3. Hypothetische Überlegungen über den Transfer von Leben zwischen Mars und Erde

Der Versuchsaufbau für die in dieser Arbeit präsentierten Schockwellenversuche ähnelte mehr dem Prinzip experimenteller Tests an endolithischen Lebensformen, da für die mineralogischen Untersuchungen eine aus einem Gabbroplättchen bestehende Deckschicht notwendig war. Die hier erzielten Drücke und Temperaturen simulierten zudem tatsächliche Einschlagsresultate auf dem Mars (Artemieva et al. 2004, Meyer 2005), da die Berechnung von Gesteinsveränderungen nach Einschlagsereignissen auf der Erde aufgrund der Erosion der Einschlagskrater nach vielen Millionen Jahren sich als äußerst schwierig gestaltete. Gesicherte Daten erhält man nur von Einschlagskratern auf dem Mond und auf dem Mars, die durch Erosion überhaupt nicht oder nur in geringem Maße beeinflusst worden sind. Diese gesicherten Daten, konnten somit für adäquate Simulationen verwendet werden.

Würden die Organismen endolithisch leben oder durch ein weiteres Gestein abgedeckt sein, wäre zumindest ein hypothetisch angenommener Transfer von endolithischen Lebensformen über Meteoriten- und Asteroidenfähren vom Mars aus möglich.

Sofern in der Vergangenheit vor Millionen Jahren sich Leben auf dem Mars entwickelt haben könnte, so hätte die Erde möglicherweise vom Mars aus befruchtet werden können. Der umgekehrte Fall wäre bedeutend schwieriger. Schwierigkeiten bildet erstens die Erdanziehungskraft. Die Fluchtgeschwindigkeit des durch einen Asteroideneinschlag

IV. Diskussion

ausgeworfenen mit Leben besiedelten Materials muss auf der Erde höher sein als es auf dem Mars der Fall wäre, um die Umlaufbahn des Planeten Erde zu verlassen. Dies würde erst bei bedeutend höheren Drücken oberhalb von 80 – 100 GPa möglich sein (Burchell et al. 2004). Da aber die Ergebnisse in dieser Arbeit schon bei einem 50 GPa-Druck einen starken Abfall der Vitalitätskurve des resistenteren Mycobionten bis auf 0.002 % Vitalität zeigen, kann angenommen werden, dass höhere Drücke für die hier getestete Flechte letal sind.

X. elegans wäre somit aufgrund ihrer epilithischen Natur und ihrer bei höheren Drücken sich abzeichnenden abfallenden Hochdruckresistenz (siehe Kap. 9.2.1 und 9.2.2: Abfall der Vitalitätskurve) kein viel versprechender Kandidat für eine mögliche erfolgreiche Panspermie, obwohl es der resistensteste Organismus der Versuchsreihe war, den wir in unserer interdisziplinären Arbeitsgruppe [EMI, DLR, Naturkundemuseum Berlin (Freie Universität Berlin und Humboldt-Universität), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf getestet hatten. Auch andere Organismen waren nicht unbedingt resistenter. Das Cyanobakterium *Chroococcidiopsis* überlebte nur simulierte Schockwellen von 10 GPa und *Bacillus subtilis* konnte als einziger Organismus bei 40 GPa noch denselben Wert von 0.02 % Überlebensrate erreichen (siehe Diagramm im Anhang).

17.4. Welche Bedingungen könnten einen erfolgreichen interplanetaren Transfer von Leben ermöglichen?

Am Beispiel von *X. elegans* soll in diesem Kapitel das Zusammenspiel verschiedener in der Natur und im Umfeld dieser Flechte vorkommenden Parameter ausgelotet werden und auch der Frage nachgegangen werden, welche Bedingungen gegeben sein müssten, damit ebenfalls eine epilithische Flechte einen Asteroideneinschlag überstehen könnte.

Berücksichtigt man verschiedene andere Parameter, wie Schnee und Eis von Gletschern und Permafrostböden im gewöhnlichen Umfeld der Habitate von *X. elegans* und zieht den natürlichen, unpräparierten Zustand der Flechte in Betracht, so könnte die Wahrscheinlichkeit für ein erfolgreiches Überleben von Asteroideneinschlägen wieder ansteigen. Denn in den im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Versuche, wurden 50 µm-Schnitte der Thalli angefertigt, so dass die verwendeten Proben bei diesen Experimenten nicht ihre Normalgröße von 100 bis 200 µm im Querschnitt und somit nicht die wirkliche Zellanzahl der in der Natur vorkommenden Thalli repräsentieren. Wahrscheinlich würde unter denselben Bedingungen aufgrund der Verdoppelung bis Vervierfachung der Zellanzahl ebenfalls zumindest eine Verdoppelung der Überlebensrate erfolgen. Wäre *X. elegans* oder Bruchstücke des

Flechtenthallus unter das Eis eines Gletschers geraten – was an ihren Standorten im Hochgebirge oder im Polargebiet über längere Zeiträume betrachtet nicht ganz unwahrscheinlich wäre -, könnte dieses Flechtenmaterial durch die Eisummantelung gut geschützt sein. Da zumeist in einem Gletscher zudem Kryoturbationen vorherrschen, die Bodenmaterial durch das sich bewegende Eis abtransportieren, können sogar Eis-Gestein-Konglomerate entstehen. Ehemals dieses Gestein besiedelnde Lebensformen, die nachträglich aufgrund der Kryoturbation in den Gletscher eingeschlossen sind, wären im gefrorenen Zustand optimal konserviert. Findet ein großer Einschlag im Eis statt, so würde selbstverständlich erst einmal das Eis verdampfen und einen Großteil der Einschlagsenergie abpuffern.

Ein Teil des harten Eis-Gesteins-Konglomerats, welches auch Lebensformen wie Flechten und Bakterien beherbergt und gefroren konserviert hat, könnte nun aber unseren Planeten verlassen. Letzteres ist ein hypothetisches Gedankenexperiment, das jedoch bereits von Burchell et al. (2004) mit den Bakterien *Bacillus subtilis* und *Rhodococcus erythropolis* in Eis mit bedeutend höheren Drücken von 78 GPa erfolgreich getestet wurde, denn 4.9×10^{-6} aktive Sporen konnten nach der Einschlagssimulation in Eis gezählt werden. Da allgemein bekannt ist, dass ein Gramm Erde 10^9 Mikroben enthält und für Felsen dieser Wert nur um einen Faktor 10 bis 100 geringer ausfällt (Burchell et al. 2004), könnten gefrorene Mikroorganismen, wie auch Diasporen und Fragmente von Flechten, Ascosporen von Pilzen und Flechten beispielsweise in Permafrostböden oder Gletschern nach einem Einschlag konserviert erhalten bleiben und möglicherweise ohne größere Schäden den Planeten verlassen.

Wie wahrscheinlich ein erfolgreiches Überleben verschiedener Organismen nach einem Einschlags-Ereignis ist, ist ergo Abwägungssache. Die Möglichkeit einer erfolgreichen Panspermie nach Asteroideneinschläge ist jedoch nach den hier dargestellten Szenarien nicht so unwahrscheinlich. Sicherlich ist auch noch der Umstand interessant, dass ein Großteil des Auswurfmaterials nach einem Einschlag auf die Erde zurückfällt. Das Artensterben, was auf einen großen Kataklysmus dieser Art auf dem Planeten erfolgt, birgt somit auch in dieser besagten Auswurfmaterie bereits den Keim, den Samen für die neue Evolution nach der Katastrophe, den Neubeginn, das heißt die Neubesiedlung des Planeten (Wells et al. 2003). Um alle diese Möglichkeiten zu berücksichtigen, sind eine Vielzahl an Experimenten und Simulationen der hier geschilderten Szenarien noch notwendig. Die Frage für die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen interplanetaren Transfers von Leben bleibt folglich

IV. Diskussion

noch offen und eröffnet ein breit gefächertes Spektrum an neuen Forschungsmöglichkeiten in einem interdisziplinären Rahmen, wo Geologie, Physik, Chemie und Biologie einen wichtigen Beitrag leisten können. Könnte man diese Frage nach der Panspermie eines Tages beantworten, würde dies das uns heute geläufige Weltbild festigen oder von Grund auf revolutionieren.

V. Zusammenfassung

Ein 3-Komponenten-System der Flechten (Flechtenthallus, Photobiont und Mycobiont) wurde auf seine Resistenzfähigkeit und somit Aufrechterhaltung der Vitalität nach UV-Bestrahlung und Vakuumdruck sowie Hochdruck, wie er bei Asteroideneinschläge vorherrschen kann, durch drei verschiedene Analysemethoden untersucht. Vitalitätstests mit Hilfe der Fluoreszenzanalyse durch das CLSM und der Verwendung von LIVE/DEAD-kits ermöglichten die Analyse der Vitalität der Flechte und der isolierten Bionten nach Exposition zu den simulierten Weltraumparametern. Kulturexperimente dienten zur Beobachtung der Wachstumsfähigkeit der Bionten nach Exposition zu den extremen simulierten Umweltbedingungen. Die Photoproduktanalyse der DNA der Flechtenthalli und Apothecien sowie der einzelnen Bionten konnte die Mutagenität der Parameter herausstellen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Flechten von *Fulgensia bracteata* und *Xanthoria elegans* sind äußerst widerstandsfähig und die tatsächlichen Grenzen des Überlebens konnten unter den hier getesteten Parametern nur bei den isolierten Photobionten und bedingt beim Mycobionten von *F. bracteata* festgestellt werden. Die Symbiose ermöglicht ein Optimum an Resistenz, was die einzelnen Bionten für sich genommen nicht erreichen können. Erst in der Symbiose wirken die verschiedenen Resistenzmechanismen, wie die spezielle morphologisch-anatomische Struktur des Thallus, die Präsenz UV-absorbierender Sekundärmetabolite und die Gallertmatrix additiv und erlauben auch den sensitiven Photobionten gegenüber den harschen Weltraumparametern eine höhere Überlebensrate. Die Resistenz des Mycobionten kann eventuell auch auf einen Reparaturmechanismus der DNA zurückzuführen sein. Das Fehlen von DNA-Photoprodukten, wie es in *X. elegans* nachgewiesen werden konnte, könnte ein Indiz dafür sein. Auch die offensichtliche UV-induzierte Synthese eines Pigments beim Mycobionten von *X. elegans* bewirkt wahrscheinlich im Vergleich zum Mycobionten von *F. bracteata* sogar eine größere Resistenz gegenüber möglichen UV-Schäden. Strukturunterschiede im Mycel der Mycobionten können auch für den unterschiedlichen Konservierungsgrad der Wachstumsfähigkeit der Hyphen nach Simulation der Weltraumparameter verantwortlich sein. Ein lockerer Hyphenrasen auf den Kultursubstraten, wie bei *F. bracteata* bietet mehr Angriffsfläche für die extremen Parameter als ein dichtes Aggregat, wie bei Mycelien von *X. elegans* feststellbar. Strukturen wie Clusterbildung bei den Photobionten und Ascosporen optimieren ebenfalls die Resistenz gegenüber Bestrahlung und Vakuum.

V. Zusammenfassung

Die Beschaffenheit der Substrate bei den Kulturexperimenten spielt außerdem für ein ungestörtes Wachstum der Bionten eine wichtige Rolle. Das Wachstum der Mycobionten ist in mineralreichen Medien optimal. Ein Mars-Analagon-Medium beeinträchtigt das Wachstum nicht, sondern kann als Erdersatz fungieren.

Beide Bionten überleben in der Symbiose sogar sehr hohe Stoßwellendrucke von 30 GPa, wobei der Mycobiont in Form von Ascosporen sogar Drücke von 50 GPa übersteht.

Die Flechtensymbiose besitzt folglich als eukaryotisches System unter den getesteten Bedingungen ein mindestens ebenso starkes Resistenzpotential wie die bisher unter den selben Bedingungen untersuchten Prokaryoten und wäre für eine erfolgreiche Panspermie oder Neubesiedlung unseres Planeten nach einem Asteroideneinschlag bedingt tauglich, erfordert aber eine große Anzahl an Langzeitversuchen sowie die Berücksichtigung anderer Parameter, um die Frage abschließend vollständig beantworten zu können.

VI. Literaturverzeichnis

- Ahmadjian, V., 1964. Further studies on lichen fungi. *The Bryologist* 67, 87-98.
- Ahmadjian, V., 1967. A guide to the algae occurring as lichen symbionts: isolation, culture, cultural physiology and identification. *Phycologica* 6, 127-160.
- Ahmadjian, V., 1993. The lichen symbiosis. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Allen, C.C., Morris, R.V., Jager, K.M., Golden, D.C., Lindstrom, D.J., Lindstrom, M.M., Lockwood, J.P., 1998. Microbial life in martian regolith simulant JSC Mars-1. *Lunar and Planetary Science XXIX*, 89-90.
- Allen, C.C., Griffin, C., Steel, A., Wainwright, N., Stansbery, E., 2000. Microbial life in martian regolith simulant JSC-Mars-1. *Lunar and Planetary Science Conference XXXI*, 100-110.
- Allen, J.D. (1998). Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis? *J. Exper. Botany* 49, 1775-1788.
- Arrhenius, S., 1903. Die Verbreitung des Lebens im Weltraum. *Die Umschau* 7, 481-485.
- Artemieva, N., Ivanov, B., 2004. Launch of martian meteorites in oblique impacts. *Icarus* 171, 84-101.
- Bachereau, F. & Asta, J., 1997. Effects of solar ultraviolet radiation at high altitude on the physiology and biochemistry of a terricolous lichen (*Cetraria islandica* (L.) Ach.). *Symbiosis* 23, 197-217.
- Belnap, J., Büdel, B. & Lange, O.L., 2001. Biological soil crusts: characteristics and distribution. *Ecological Studies* 150, 3-31.
- Berenbaum, M. 2001. Rad Roaches. *American Entomologist* Vol. 47, Nr. 3, 132-133.
- Bletchly, J.D. & Fisher, R.C., 1957. Use of gamma radiation for the destruction of wood-boring insects. *Nature* 179, 670.
- Brodo, I.M., Sharnoff, S.D., Sharnoff, S., 2001. Lichens of North America. Yale University Press, New Haven and London.
- Boissière, J.C., 1967. La chitine chez quelques lichens: mise en évidence, localisation. *Mémoires Société Botanique de France. Colloque sur les lichens et la symbiose Lichénique*. Paris, 141-150.
- Büdel, B., Wessels, D.C.J., 1986. *Parmelia hueana* Gyeln, a vargant lichen from Namib Desert SWA/Namibia. I. Anatomical and reproductive adaptations. *Dinteria* 18, 3-36.

VI. Literaturverzeichnis

- Buma, A.G.J., van Oijen, T., van de Poll, W., Veldhuis, M.J.W., & Gieskes, W.W.C., 2000. The sensitivity of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) to ultraviolet-B radiation. *J. Phycology* 36, 296-303.
- Buma, A.G.J., Engelen, A.H. & Gieskes, W.W.C., 1997. Wavelength-dependend induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. *Marine Ecol. Progr. Ser.* 153, 91-97.
- Burchell, M.J., Mann, J.R., Bunch, A.W., 2004. Survival of bacteria and spores under extreme shock pressures. *Mon. Not R. Astron. Soc.* 352, 1273-1278.
- Caimi, P., Eisenstark, A., 1986. Sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to near-ultraviolet radiation. *Mut. Res.* 162, 145-151.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., Markl, J., 2003. *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 533-639.
- Cockell, C.S., 1998. Biological effects of high ultraviolet radiation on early Earth – a theoretical evaluation. *J.Theor. Biol.* 193, 717-729.
- Cork, J.M. 1957. Gamma radiation and longevity of the flour beetle. *Radiat. Res.* 7, 551-557.
- Crowe, L.M., Reid, D.S., Crowe, J.H., 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical Journal*, Vol. 71, 2087-2093.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Chapman, D., 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic Organisms: the role of trehalose. *Science*, Vol. 223, Issue 4637, 701-703.
- Darwin, C. 1964 (1859). *On the origins of species: A Facsimile of the First Edition*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Davey, W.P. 1919. Prolongation of life of *Tribolium confusum* apparently due to small doses of X-rays. *J. Exp. Zool.* 28, 447-458.
- dePriest, P.T., 2004. Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986–2001. *Annual review of Microbiology* Vol. 58, 273-301.
- de la Torre, R., 2002. Estudio de los efectos de la radiación UV sobre ecosistemas epilíticos, Memoria Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- de la Torre, R., Horneck, G., Sancho, L.G., Pintado, A., Scherer, K., Facius, R., Deutschmann, U., Reina, M., Baglioni, P., Demets, R., 2004. Studies of lichens from high mountain regions in outer space: the BIOPAN experiment. *Proc. Of the III European Workshop on Exo-Astrobiology*. Mars: The search for Life, Madrid, Spain. ESA SP-545, 193-194.

- de la Vega, U., 2004. Studien zur UV-Strahlen- und Trockenresistenz von *Deinococcus radiodurans*. Diplomarbeit, Universität Köln/Institut für Luft- und Raumfahrt, Abteilung Strahlenbiologie.
- de Vera, J.P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2004. The potential of lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space II: germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. *Advances in Space Research* 33, 1236-1243.
- de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2003. The potential of lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space – I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *Int. J. Astrobiol.* 1 (4): 285-293.
- Douki, T., Magali, C. & Cadet, J., 2000a. Electrospray-mass spectrometry characterization and measurement of far-UV-induced thymine photoproducts, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 54, 145-154.
- Douki, T., Magali, C., Sauvaigo, S., Odin, F. & Cadet, J., 2000b. Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 11678-11685.
- Douki, T. & Cadet, J., 2001. Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC Photolesions, *Biochemistry*, 40, 2495-2501.
- Douki, T., Vadesne-Bauer, G. & Cadet, J., 2002. Formation of 2'-deoxyuridine hydrates upon exposure of nucleosides to gamma radiation and UV C-irradiation of isolated and cellular DNA, *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 565-569.
- Douki, T., 2005, personal message.
- Etges, S., 2001. Reaktionsmuster und morphogenetisches Potential isolierter Mycobionten (Flechtenpilze und die Bedeutung für den Symbioseorganismus Flechte. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, 1-176.
- Elders, U., 1991. Vegetationskundliche Untersuchungen in dem „Gotländischen Fels-Alvar“. *Diplomarbeit*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Esser, K., 1976. Kryptogamen: Blaualgen, Algen, Pilze, Flechten. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Fahselt, D., 1995. Growth form and reproductive character of lichens near active fumaroles in Japan. *Symbiosis* 18, 211-231.

VI. Literaturverzeichnis

- Feofilova, E.P., 2003. Deceleration of vital activity as a universal biochemical mechanism ensuring adaptation of microorganisms to stress factors: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 39, No. 1, 1-18.
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2001. Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie in unserer Zeit* 3, 169-180.
- Friedl, T., Besendahl, A., Pfeiffer, P. & Battacharya, D., 2000. The distribution of group I introns in lichen algae suggests that lichenization facilitates intron lateral transfer. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14, 342-352.
- Friedl, T. & Rokitta, C., 1997. Species relationships in the lichen genus *Trebouxia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): molecular phylogenetic analyses of nuclear-encoded large subunit rRNA gene sequences. *Symbiosis* 23 (2+3), 125-148.
- Friedl, T. 1996. Evolution of the polyphyletic genus *Pleurastrum* (Chlorophyta): inferences from nuclear-encoded DNA Sequences and motile cell ultrastructure. *Phycologia* 35, 456-469.
- Gatti, H., 1999. Giordano Bruno and Renaissance Science, Cornell University Press, Ithaca.
- Garcia-Pichel, F. & Castenholz, R.W., 1993. Occurrence of UV-absorbing mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 163-169.
- Garrett, R.M., 1972. Electrostatic charges on freshly discharged lichen ascospores. *The Lichenologist* 5, 311-113.
- Gilichinski, D., 2003. Biotic survival in the cryobiosphere on geological scale: implication for astro/terrestrial biogeoscience Journal: *EGS - AGU - EUG Joint Assembly*, Abstracts from the meeting held in Nice, France, 6 - 11 April 2003, abstract #12410 EGU
- Haugland, R.P., 2002. Handbook of fluorescent probes and research products. Ninth Edition ed. by Gregory, J. et al., *Molecular Probes*, 1-968.
- Hawksworth, D.L., 1988. The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Bot. J. Lin. Soc.* 96, 3-20.
- Helms, G., Friedl, T., Rambold, G. & Mayrhofer, H., 2001. Identification of photobionts from lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. *Lichenologist* 33 (1), 73-86.
- Henssen, A., Jahns, H.M., 1973 („1974“). Lichenes. Eine Einführung in die Flechtenkunde. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

- Hestmark, G., 1991. To sex or not to sex ... structures and strategies of reproduction in the family *Umbilicariaceae* (Lecanorales, Ascomycetes). *Sommerfeltia Supplement* 3, 1-47.
- Holder, J.M., Wynn-Williams, D.D., Perez, F.R. & Edwards, H.G.M., 2000. Raman spectroscopy of pigments and oxalates *in situ* within epilithic lichens: *Acarospora* from the Antarctic and Mediterranean. *New Phytologist* 145, 271-280.
- Honegger, R., 1998. The lichen symbiosis – what is so spectacular about it? *Lichenologist* 30, 193-212.
- Honegger, R., 1993. Developmental biology of lichens, Tansley review No. 60. *New Phytology* 125, 659-677.
- Honegger, R. & Bartnicki-Garcia, S. 1991. Cell wall structure and composition of cultured mycobionts from the lichen *Cladonia macrophylla*, *Cladonia caespiticia* and *Physcia stellaris* (Lecanorales, Ascomycetes). *Mycological Research* 95, 905-914.
- Honegger, R. and Kutasi, V., 1990. Anthraquinone production in the aposymbiotically cultured telochistacean lichen mycobiont: the role of the carbon source, in: Nardon, P., Gianizzi-Pearson, V., Grenier, A.M., Margulis, L. and Smith (Eds.), *Endocytobiology IV*. D.C. INRA, Paris, 175-178.
- Horneck, G., Stöffler, D., Eschweiler, U. and Hornemann, U., 2001a. Bacterial spores survive simulated meteorite impact. *Icarus* 149, 285-290.
- Horneck, G., Rettberg, P., Reitz G., Wehner, J., Eschweiler, U., Strauch, K., Panitz, C., Starke, V. & Baumstark-Khan, C., 2001b. Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion of Panspermia. *Orig. Life Evol. Biosphere* 31, 527-547.
- Horneck, G., 2001c. Likelihood of transport of life between the planets of our solar system. In: Chela-Flores, J. et al. (eds.). *First steps in the origin of life in the Universe*, *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands
- Horneck, G., 1999. Astrobiology studies of microbes in simulated interplanetary space. In *Laboratory Astrophysics and Space Research*, eds Ehrenfreund, P., Krafft, C., Kochan, H. & Pirronello, V., 667-685. Kluwer Dordrecht.
- Horneck, G., Bücker, H. & Reitz, G., 1994. Long-term survival of bacterial spores in space. *Adv. Space Res.* 14, 41-45.
- Horneck, G., 1993. Responses of *Bacillus subtilis* spores to space environment: result of experiments in space. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 23, 37-52.
- Hughes, K.A., Lawley, B. & Newsham, K.K., 2003. UV-B radiation inhibits the growth of Antarctic terrestrial fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (3), 1488-1491.

VI. Literaturverzeichnis

- Ishikura, M., Kato, C. & Maruyama, T., 1997. UV-absorbing substances in zooxanthellate and azooxanthellate clams. *Marine Biol.* 128, 649-655.
- Jahns, H.M. & Ott, S., 1997. Life strategies in lichens – some general considerations. In: Kappen, L. (ed.). New species and novel aspects in ecology and physiology of lichens. In honour of O.L. Lange. *Bibl. Lichenol.* 67, 49-67.
- James, P.W. & Henssen, A., 1976. The morphological and taxonomic significance of cephalodia. In: Lichenology: Progress and Problems. Brown, D.H., Hawksworth, D.L. & Bailey, R.H. (eds). *Academic Press*, London, 27-77.
- Jennings, D.H. & Lysek, G., 1999. Fungal Biology. Second Edition. Understanding the fungal lifestyle, 1- 165.
- Kappen, L., 2000. Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarctic Science* 12 (3), 314-324.
- Kappen, L., Schroeter, B. Green, T.G.A. & Seppelt, R.D., 1998. Chlorophyll a fluorescence and CO₂ exchange of *Umbilicaria aprina* under extreme light stress in the cold. *Oecologia* 13, 325-331.
- Kappen, L., Breuer, M. & Bölter, M., 1991. Ecological and physiological investigations in continental Antarctic cryptogams. 3. Photosynthetic production of *Usnea spaelata*: diurnal courses, models and the effect of photoinhibition. *Polar Biology* 11, 393-401.
- Kappen, L., 1988. Ecophysiological relationships in different climatic regions. In: Galun, M. (Ed.), Handbook of Lichenology, Vol. 2. CRC, Boca Raton, 37-100.
- Kappen, L., Bölter, M. & Kühn, A. 1987. Photosynthetic activity of lichens in natural habitats in the maritime Antarctic. In Progress and Problems in Lichenology in the Eighties (Peveling, E., ed.). *Bibliotheca Lichenologica* 25, 297-312.
- Kranner, I., Cram, W.J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheiner, E., Pfeifhofer, H.W., 2005. Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (8), 3141-3146.
- Kretschmar, M., Nichterlein, T., Nebe, C.T., Hof, H., Burger, K.J., 1996. Fungicidal effect of tyrothricin in *Candida albicans*. *Mycoses* 39 (1-2), 45-50.
- Lawrey, J.D., 1991. Biotic interactions in lichen community development: a review. *Lichenologist* 23 (3), 205-214.
- Lange, O.L., 1954. Einige Messungen zum Wärmehaushalt poikilohydrer Flechten und Moose. *Archiv f. Met., Geophys. und Bioklima* 5 (2), 182-190.
- Lange, O.L., 1969. Die funktionelle Anpassung der Flechten an die ökologischen Bedingungen arider Gebiete, *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 82, 3-22.

- Lange, O.L., Kilian, E. & Ziegler, H. 1986. Water vapor uptake and photosynthesis of lichens: performance differences in species with green and blue-green algae as phycobionts. *Oecologia* 71, 104-110.
- Lange, O.L., Green, T.G.A., Reichenberger, A. & Meyer, A., 1996. Photosynthetic depression at high thallus water contents in lichens: concurrent use of gas exchange and fluorescence techniques with cyanobacterial and green algal Peltigera species. *Botanica Acta* 109, 43-50.
- Lee, Y.J., Ducoff, H.S., 1984. Radiation-enhanced resistance to oxygen: a possible relationship to radiation-enhanced longevity. *Mech Ageing Dev.* 27 (1), 101-109.
- Lud, D., 2001. Biotic responses to UV-B in Antarctica, Ph.D. thesis, University of Amsterdam.
- Lutzoni, F., Pagel, M. & Reeb, V., 2001. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature* 411, 937-940.
- Mancinelli, R.L., White, M.R. & Rothschild, L.J., 1998. Biopan survival I: exposure of the osmophiles *Synechococcus sp.* (Nageli) and *Haloarcula sp.* to the space environment. *Ad. Space Res.* 22, 327-334.
- Margulis, L., 1993. *Symbiosis in Cell Evolution*. 2nd edn. Freeman, New York.
- Martin, W. & Russell, M.J., 2003. On the origin of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes to nucleated cells. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 258, 59-85.
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hansmann, S., Hasegawa, M. & Kowallik, V., 1998. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393, 162-165.
- Mattimore, V., Battista, J.B.J., 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Bacteriol.* 178, 633-637.
- McCormack, P.D.; Swenberg, Ch.E.; Bückler, H. (Eds.), Terrestrial Space Radiation and its Biological Effects, *NATO ASI Series* Vol. 154, New York: Plenum Press 1988, 864 S.
- McKay, D.S., Gibson, E.K., Thomas-Keprta K., Vali, H., Romanek, C., Clemett, S., Chillier, X.D.F., Maechling, C.R. & Zare, R.N., 1996. Search for past life on Mars: possible relic biogenic activity in Martian meteorite ALH84001. *Science* 273, 924-930.
- Melkonian, M., 2001. Systematics and evolution of the algae. I. Genomics meets phylogeny. *Progress in Botany* 62, 340-382.
- Meier, T., 1994. Interaktionen zwischen den Arten der bunten Erdflechtengesellschaft. *Diplomarbeit*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

VI. Literaturverzeichnis

- Meyer, C., 2005. Stoßwellenexperimente zur Simulation des Transfers von Mikroorganismen vom Mars zur Erde. Diplomarbeit im Fach Mineralogie, Museum für Naturkunde (Humboldt Universität), Freie Universität, Berlin.
- Meyer-Rochow, V.B., Kashiwagi, T., Eguchi, E., 2002. Selective photoreceptor damage in four species of insects induced by experimental exposures to UV-irradiation. *Micron*. 33 (1), 23-31.
- Mileikowsky, C., Cucinotta, F., Wilson, J.W., Gladman, B., Horneck, G., Lindegren, L., Melosh, J., Rickman, H., Valtonen, M. & Zheng, J.Q., 2000. Natural transfer of viable microbes in space, Part I: From Mars to Earth and Earth to Mars. *Icarus* 145, 391-427.
- Misra Parvathy Bhatia, H.P., 1998. Gamma radiation susceptibility of strains of *Tribolium castaneum* (Herbst) resistant and susceptible to fenvalerate. *Int. J. of Pest Management* 44, No. 3, 145-147.
- Moeller, R., Horneck, G., Facius, R., Stackebrandt, E., 2005. Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. endospores against environmental UV radiation. *FEMS Microbiology Ecology* 51, 231-236.
- Moeller, R., Horneck, G., Stackebrandt, E., Edwards, H.G.M., Villar, S.E.J., 2003. Do endogenous pigments protect *Bacillus* spores against UV-radiation? *Proc. of the III European Workshop on Exo-Astrobiology*. Mars: The search for life, Madrid, Spain, 241-242.
- Molina, M.C. & Crespo, A., 2000. Comparison of development of axenic cultures of five species of lichen-forming fungi. *Mycological Research* 104 (5), 595-602.
- Moseley, B.E.B., 1983. Photobiology and radiobiology of micrococcus (Deinococcus) radiodurans. *Photochem. Photobiol. Rev.* 7, 223-274.
- Müller, W.F. and Hornemann, U, 1969. Shock induced planar deformation structures in experimentally shock loaded olivines and in olivines from chondritic meteorites. *Earth Planet. Sci. Lett.* 7, 251-264.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of Bacillus Endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (3), 548-572.
- Osenberg, E., 1993. Die Besiedlung trockener Kalksteinplatten durch Flechten. *Diplomarbeit*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Ott, S., Osenberg, E., Jahns, H.M., 1997. Vegetation of the rock alvar of Gotland; III. Interaction of lichens in rock habitat. *Symb. Bot. Ups.* 32 (1), 209-221.

- Ott, S., Elders, U. & Jahns, H.M., 1996. Vegetation of the rock-alvar of Gotland – I. Microhabitats and succession. *Nova Hedwigia* 63 (3-4), 433-470.
- Ott, S., Meier, T. & Jahns, H.M., 1995. Development, regeneration and parasitic interactions between the lichens *Fulgensia bracteata* and *Toninia caeruleonigricans*. *Can. J. Bot.* Vol. 73. (Suppl. 1), 595-603.
- Ott, S., Treiber, K., Jahns, M., 1993. The development of regenerative thallus structures in lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society* 113, 61-76.
- Ott, S., 1987a. Sexual reproduction and developmental adaptations in *Xanthoria parietina*. *Nordic Journal of Botany* 7, 219-228.
- Ott, S., 1987b. Reproductive strategies in lichens. Progress and problems in Lichenology in the Eighties. *Bibl. Lichenol.* 25, 81-93.
- Ott, S. & Jahns, H.M., unpublished data/personal communication.
- Poelt, J., 1969. Bestimmungsschlüssel Europäischer Flechten. Verlag von J. Cramer.
- Poelt, J., 1977. Types of symbiosis with lichens. In H.E. Bigelow & E.G. Simmons (Eds), Abstract, Second International Mycological Congress, 2, 526.
- Quilhot, W., Fernandez, E., Rubio, C., Cavieres, M.F., Hidalgo, M.E., Goddard, M. & Galloway, D., 1996. Preliminary data on the accumulation of usnic acid related to ozone depletion in the Antarctic lichens. *Seria Cientias INACH* 46, 105-111.
- Race, H.L., Herrmann, R.G. & Martin, W., 1999. Why have organelles retained genomes? *Trends in Genetics*. Vol. 15 (9), 364-370.
- Rettberg, P., de la Vega, U., Horneck, G., 2003. *Deinococcus radiodurans* - a model organism for life under martian conditions. *Proc. of the III European Workshop on Exo-Astrobiology*. Mars: the search for life, Madrid, Spain.
- Richter, H., 1865. Zur Darwinschen Lehre. *Schmidts Jahrbuch Ges. Med.* 126, 243-249.
- Ross, M.H. & Cochran, D.G., 1963. Some early effects of ionizing radiation on the German cochroach, *Blattella germanica*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 56., 256-261.
- Rozema, J., Noordijk, A.J., Broekman, R.A., van Beem, A., Meijkamp, B.M., de Bakker, N.V.J., van de Staaij, J.W.M., Stroetenga, M., Bohncke, S.J.P., Konert, M., Kars, S., Peat, H., Smith, R.I.L., Convey, P., 2001. (Poly)phenolic compounds in pollen and spores of Antarctic plants as indicators of solar UV-B. A new proxy for the reconstruction of past solar UV-B? *Plant Ecology* 154, 11-26.
- Santesson, R., 1967. On taxonomical and biological relations between lichens and non-lichenized fungi. *Botaniska Notiser* 120, 497-498.

VI. Literaturverzeichnis

- Schaper, T. & Ott, S., 2003a. Photobiont selectivity and interspecific interactions in lichen communities. I. Culture experiments with the mycobiont *Fulgensia bracteata*. *Plant Biology* 5 (4), 441-450.
- Schaper, T., 2003b. Komplexe Interaktionsmuster und die Dynamik von Entwicklungsprozessen in Flechtenökosystemen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Schidlowski, M., 2001. Carbon isotopes as biogeochemical recorders of life over 3.8 Ga of Earth history: evolution of a concept. *Precambrian Res.* 106, 117-134.
- Schöller, H. (ed.), 1997. Lichenes, Flechten. Kleine Senckenberg-Reihe Nr. 27.
- Schroeter, B., Green, T.G.A., Kappen, L. & Seppelt, R.D. (1994). CO₂ exchange at subzero temperatures. Field measurements on *Umbilicaria aprina* in Antarctica. *Cryptogamic Botany* 4 (2), 233-241.
- Schubert, R., Wagner, G., 1993. Botanisches Wörterbuch. 11. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 519.
- Setlow, J.K., Boling, M.E., 1965. The resistance of micrococcus radiodurans to ultraviolet radiation. II. Action spectra for killing, delay in DNA synthesis and thymine dimerization. *Biochim. Biophys. Acta* 108, 259-265.
- Shapiro, I.A., 1971. Isolation of lichen fungi into culture. *Mykologija I Fitopatologija* ("Nauka", Leningrad) 5, 98-100.
- Shi, T., Reeves, R.H., Gilichinsky, D.A., Friedmann, E.I., 1997. Characterization of viable bacteria from siberian permafrost by 16S rDNA Sequencing. *Microbial Ecology* Vol. 33 (3), 169-179.
- Smith, D.C., 1975. Symbiosis and the biology of lichenized fungi. *Symposia Soc. Exper. Biol.*, University Press, Cambridge 29, 373-405.
- Soili, K., Stenroos, S.K. and dePriest, P. T., 1998. SSU rDNA phylogeny of cladoniiform lichens. *American Journal of Botany* 85, 1548 – 1559.
- Sojo, F., Valladares, F. & Sancho, G.L. 1996. Structural and physiological plasticity enables the lichen *Catillaria corymbosa* to colonize different microhabitats in maritime Antarctica. *Bryologist* 100 (2), 171-179.
- Solhaug, K.A. & Gauslaa, Y., 2004. Photosynthates stimulate the UV-B induced fungal anthraquinone synthesis in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *Plant, Cell & Environment*, Vol. 27, Issue 2, 167.
- Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., Nybakken, L., Bilger, W., 2003. UV-induktion of sun-screening pigments in lichens. *New Phytologist* 158, 91-100.

- Steele, A., Goddard, D.T., Stapleton, D., Toporski, J.K.W., Peters, V., Bassinger, V., Sharples, G., Wynn-Williams, D.D. & McKay, D.S., 2000. Investigations into an unknown organism on martian meteorite Allan Hills 84001. *Meteorites & Planetary Science* 25, 237-241.
- Stetter, K.O., 1996. Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 149-158.
- Stöffler, D., and Langenhorst, F., 1994. Shock metamorphism of quartz in nature and experiment: I. Basic observation and theory. *Meteoritics* 29, 155-181.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A.F.W., neubearbeitet durch Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A., 1991. Lehrbuch der Botanik. 33. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 851.
- Taylor, T.N., Hass, H., Remy, W. & Kerp, H., 1995. The oldest fossil lichen. *Nature* 378, 244.
- Teramura, A.H. & Sullivan, J.H., 1994. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Res.* 39, 463-473.
- Thomson, N.F. & Thomson, J.W., 1984. Spore ornamentation in the lichen genus *Solorina*. *The Bryologist* 87, 151-153.
- Thoss, V. 1999. Chemical characterisation of dissolved organic matter in natural matrices. Dissertation, University of Wales. Bangor, 180 ff.
- Toporski, J., Steele, A., McKay, D.S. and Westall, F., 2003. Bacterial Biofilms in Astrobiology: the importance of life detection. In: Fossil and Recent Biofilms – A Natural History of Life on Earth (Eds. Krumbein, W.E., Paterson, D.M., and Zavarzin, M.G.A.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 429-446.
- Upton, A.C., 2001. Radiation hormesis: data and interpretations. *Crit. Rev. Toxicol.* 31 (4-5), 681-695.
- van der Drift, K.M.G.M., Spaink, H.P., Bloemberg, G.V., van Brussel, A.A.N., Lugtenberg, B.J.J., Haverkamp, J., Thoams-Oates, J.E., 1996. *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* produces Lipochitin Oligosaccharides with nodE-dependent highly unsaturated fatty acyl moieties. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271, No. 37, Issue September 13, 22563-22569.
- van Leeuwenhoek, A., 1798-1807. *Select Works of Anatomy*, Vol.2 207-213.
- Vernós, I., Carratalá, M., González-Jurado, J., Valverde, J.R., Calleja, M., Domingo, A., Vinós, J., Cervera, M., Marco, R., 1989. Insects as test systems for assessing the potential role of microgravity in biological development and evolution. *Advances in Space Research* Vol. 9, Issue 11, 137-146.

VI. Literaturverzeichnis

- Vishnivetskaya, T., Kathariou, S., McGrath, J., Gilichninsky, D., Tiedje, J.M., 2000. Low-temperature recovery strategies for isolation of bacteria from ancient permafrost sediments. *Extremophiles* Vol. 4 (3), 165-173.
- Wang, D.Y.C., Kumar, S., & Hedges, S.B., 1999. Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, 163-171.
- Wells, L.E., Armstrong, J.C., Gonzales, G., 2003. Reseeding of early Earth by impacts of returning ejecta during the late heavy bombardment. *Icarus* 162, 38-46.
- Wharton, D.A., 2002. Life at the limits. Organisms in extreme environments. Cambridge University Press, Cambridge, 1-307.
- Wharton, D.R.A. & Wharton, M.L. 1957. The production of sex attractant substance and of oothecae by the normal and irradiated American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *J. Insect Physiol.* 1, 229-239.
- Wharton, D.R.A. & Wharton, M.L., 1959. The effect of radiation on the longevity of the cockroach, *Periplaneta americana*, as affected by dose, age, sex and food intake. *Radiat. Res.* 11, 600-615.
- Wieners, P.C., 2005. Das evolutionäre Potential der Flechtensymbiose gegenüber Extremstbedingungen. Diplomarbeit.
- Wynn-Williams, D.D., Edwards, H.G.M., Newton, E.M. & Holder, J.M., 2002. Pigmentation as a survival strategy for ancient and modern photosynthetic microbes under high ultraviolet stress on planetary surfaces. *Int. J. Astrobiol.* 1, 39-49.
- Wynn-Williams, D.D., Holder, J.M. & Edwards, H.G.M., 2000. Lichens at the limits of life: past perspectives and modern technology. *Bibliotheca Lichenologica* 75, 275-288.
- Yamamoto, Y., Miura, Y., Higuchi, M., Kinoshita, Y., 1993. Using lichen tissue cultures in modern biology. *The Bryologist* 96 (3), 384-393.
- Yuan, X., Xiao, S., Taylor, T.N., 2005. Lichen-like symbiosis 600 Million years ago. *Science*, Vol. 308, 1017-1020.
- Zook, D., 1999. Organisms living inside others. The symbiotic wonders. In: Seckbach, J. (ed.): Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments, Vol. 1: 575-584.

Anhang

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Vitality of untreated lichen thalli and fruiting bodies after exposure to UV-C radiation ($\lambda = 254 \text{ nm}$)					
time of exposure	Dose	F. bracteata		X. elegans	
t_e	kJ/m^2	%	Std.	%	Std.
0 min	0	91.45	6.56	95.65	3.34
5 min	2.42	80	10.32	93.22	2.54
15 min	7.28	85.4	9.46	94.44	4.23
30 min	14.55	84.88	3.33	87.42	5.55
1 h	29.1	74.32	3.88	82.42	3.91
2 h	58.2	75.58	4.77	85.73	5.25

Vitality of treated lichen thalli and fruiting bodies after exposure to UV-C radiation ($\lambda = 254 \text{ nm}$)					
time of exposure	Dose	F. bracteata		X. elegans	
t_e	kJ/m^2	%	Std.	%	Std.
0 min	0	89.45	6.13	96.66	2.22
1 min	2.42	85.32	7.21	95.76	4.65
15 min	7.28	85.41	3.67	92.16	3.98
30 min	14.55	74.77	3.79	82.37	4.47
1 h	29.1	77.12	2.21	77.49	3.99
2 h	58.2	70.88	2.85	79.23	7.76

Vitality of lichen tissue; exposure to UV-radiation ($\lambda > 200 \text{ nm}$) + vacuum ($p = 10^{-3} \text{ Pa}$)					
Lichen		F. bracteata (untreated)		X. elegans (untreated)	
t_e	Dose (J/m^2)	%	Std.	%	Std.
0 h	0	99.66	0.34	93.21	2.22
4 h	39.68	97.09	1.05	91.35	1.75
8 h	79.36	92.95	0.7	93.5	4.58
16 h	158.72	86.31	4.33	97.75	1.67
Lichen		F. bracteata (treated)		X. elegans (treated)	
t_e	Dose (kJ/m^2)	%	Std.1	%	Std.1
0 h	0	95.66	1.21	89.87	1.26
4 h	39.68	57.4	0.12	63.62	25.8
8 h	79.36	77.2	6.12	60.4	4.54
16 h	158.72	62.65	15.56	85.57	6.5

Vitalität des Flechtengewebes von <i>F. bracteata</i> nach Vakuumentexposition ($t_e = 2$ Wochen; $p = 10^{-5}$ Pa); ohne Licht			
	Probe	%	Std.
Norm.-cond.	A/ Cont.	85 98	11 6
	T / Cont	89 58	8 52
	T	41	9 74
VAC 2 Wochen	T +	36 45	11 55
	A	37 28	12 65
	A +	32 45	11 08

Vitalität des Flechtengewebes von <i>X. elegans</i> nach UV- und Vakuumentexposition ($\lambda \geq 200$ nm Dosis: 3374 kJm^{-2} ; $p = 10^{-5}$ Pa; $t_e = 2$ Wochen)			
	Probe	%	Std.
Norm.-cond.	A / Cont.	86 58	1 22
	T / Cont.	90 55	4 05
	T	50 96	24 03
VAC 2 Wochen	T +	47 08	14 05
	A	70 07	17 11
	A +	35 41	7 43

F. br. Mycobiont after exposure to UV C (254 nm)				X. e. Mycobiont after exposure to UV C (254 nm)			
t_e	Dose kJm^{-2}	%	Std.	t_e	Dose kJm^{-2}	%	Std.
0	0	95 54	1 05	0	0	94 09	3 69
2 h	5 04	80 44	17 22	2 h	5 04	80 14	10 57
4 h	10 08	70 22	21 64	4 h	10 08	83 93	7 37
8 h	20 16	75 81	22 43	8 h	20 16	81 21	8 34

Vitalität des Mycobionten von <i>F. bracteata</i> nach polychromatischer UV-Bestrahlung ($\lambda \geq 200$ nm); in Luft			
t_e	kJ/m^2	vitality in %	Std.
0	0	87 9	2 22
5 min	0 826	87 2	3 1
15 min	2 48	85 51	4 32
30 min	4 96	80 21	1 98
1 h	9 92	81 33	4 32
2 h	19 84	77 98	5 2
4 h	39 68	71 11	4 47
8 h	79 36	66 1	4 98

Vitalität des Mycobionten von <i>X. elegans</i> nach polychromatischer UV-Bestrahlung ($\lambda \geq 200$ nm); in Luft			
t_e	kJ/m^2	vitality in %	Std.
0	0	88 09	2 27
5 min	0 826	80 87	7 13
15 min	2 48	85 06	1 81
30 min	4 96	79 75	9 65
1 h	9 92	85 28	13 08
2 h	19 84	80 91	15 15
4 h	39 68	88 1	3 53
8 h	79 36	85 02	6 37

Vitalität des Mycobionten von <i>F. bracteata</i> nach Vakuum-Exposition			
p / Pa	t_e	vitality in %	Std.
1 atm	0	91 87	2 21
2.8×10^{-1}	5 min	90 37	3 12
7.9×10^{-3}	15 min	86 77	5 1
3.2×10^{-3}	30 min	85 6	4 76
2.2×10^{-4}	1 h	72 22	6 3
4.9×10^{-5}	2 h	70 1	4 43
4.0×10^{-5}	4 h	60 4	3 23
3.6×10^{-5}	8 h	57 29	3 52
Vitalität des Mycobionten von <i>X. elegans</i> nach Vakuum-Exposition			
p / Pa	t_e	vitality in %	Std.
1 atm	0	88 09	2 27
2.8×10^{-1}	5 min	64 4	18 04
7.9×10^{-3}	15 min	69 76	14 22
3.2×10^{-3}	30 min	83 91	6 85
2.2×10^{-4}	1 h	65 32	26 89
4.9×10^{-5}	2 h	73 25	6 91
4.0×10^{-5}	4 h	77 86	6 15
3.6×10^{-5}	8 h	82 38	5 19

Vitalität des Mycobionten von <i>F. bracteata</i> nach polychromatischer UV- und Vakuum-Exposition ($\lambda \geq 200$ nm)			
p / Pa	kJm^{-2}	%	Std.
1013	0	81.1	12
2.8×10^{-1}	2.42	73.16	6.91
7.9×10^{-3}	7.28	86.79	8.33
3.2×10^{-3}	14.55	68.8	3.67
2.2×10^{-4}	29.1	50.59	17.26
4.9×10^{-5}	58.2	52.43	8.94
4.0×10^{-5}	116.4	61.19	22.25
3.6×10^{-5}	232.8	46.06	5.85
Vitalität des Mycobionten von <i>X. elegans</i> nach polychromatischer UV- und Vakuum-Exposition ($\lambda \geq 200$ nm)			
p / Pa	kJ/m^2	vitality in %	Std.
1013	0	88.09	2.27
2.8×10^{-1}	2.42	76.65	6.65
7.9×10^{-3}	7.28	78.53	3.69
3.2×10^{-3}	14.55	84.09	9.83
2.2×10^{-4}	29.1	68.96	9.85
4.9×10^{-5}	58.2	81.47	9.91
4.0×10^{-5}	116.4	67.89	21.15
3.6×10^{-5}	232.8	76.46	9.16

Vitality of photobionts from <i>F. bracteata</i> (genera: <i>Trebouxia</i>) after exposure to UV C-radiation ($\lambda = 254$ nm)			
time of exposure (t_e)	Dose (kJ/m^2)	Vitality (%)	Std.
0 min	0	96.32	3.57
5 min	0.31	83.38	12.21
15 min	0.63	87.22	7.93
30 min	1.25	66.39	29.64
1 h	2.5	53.58	38.43
2 h	5	61.44	16.78
4 h	10	43.18	40.61
8 h	20	0	0

Vitality of photobionts from <i>X. elegans</i> (genera: <i>Trebouxia</i>) after exposure to UV C-radiation ($\lambda = 254 \text{ nm}$)			
time of exposure (t_e)	KJ/m ²	vitality (%)	Std.
0 min	0	87.98	11.57
5 min	0.21	75.7	16.75
15 min	0.63	73.44	15.62
30 min	1.25	72.78	18.01
1 h	2.5	71.55	21.7
2 h	5	63.89	19.84
4 h	10	40.25	23.99
8 h	20	33.79	20.87

Vitality of photobiont cells and clusters of <i>F. bracteata</i> after exposure to polychr. UV radiation ($200 \text{ nm} \leq \lambda \leq 400 \text{ nm}$) in air			
t_e	kJ/m ²	vitality in %	Std.
0	0	95.55	4.22
5 min	0.83	78.2	21.53
15 min	2.5	74.01	22.18
30 min	5	64.28	26.59
1 h	10	47.23	32.69
2 h	20	57.61	23.86
4 h	40	42.33	10.53
8 h	80	0	0
Vitality of photobiont cells and clusters of <i>X. elegans</i> after exposure to polychr. UV radiation ($200 \text{ nm} \leq \lambda \leq 400 \text{ nm}$) in air			
t_e	kJ/m ²	vitality in %	Std.
0	0	81.08	17.38
5 min	0.83	74.72	25.13
15 min	2.5	80.28	16.07
30 min	5	61.41	23.11
1 h	10	69.29	13.85
2 h	20	40.08	28.81
4 h	40	20.6	19.22
8 h	80	12.68	12.68

F. bracteata: Photobiont after vacuum exposure			
t_e	p (Pa)	Vitality (%)	Std.
0	1 atm	87.43	4.2
5 min	2.8×10^{-1}	74.23	25.09
15 min	3×10^{-2}	74.1	9.11
30 min	5×10^{-3}	68.29	37.5
1 h	2×10^{-3}	75.71	21.25
2 h	2×10^{-3}	64.15	25.75
4 h	2×10^{-3}	26.18	12.51
8 h	5×10^{-4}	0	0
X. elegans: Photobiont after vacuum exposure			
t_e	p / Pa	vitality in %	Std.
0	1 atm	85.23	3.3
5 min	2.8×10^{-1}	85.11	2.54
15 min	7.9×10^{-3}	71.78	7.67
30 min	3.2×10^{-3}	69.31	3.51
1 h	2.2×10^{-4}	64.45	5.22
2 h	4.9×10^{-5}	59.82	4.2
4 h	4.0×10^{-5}	55.25	5.13
8 h	3.6×10^{-5}	39.66	3.67

Vitality of photobiont cells of <i>F. bracteata</i> (genera: <i>Trebouxia</i>) after exposure to polychr. UV radiation ($\lambda \geq 160$ nm) and vacuum			
p / Pa	UV dose	vitality in %	Std.
1 atm	0	89.78	5.11
2.8×10^{-1}	2.42	85.87	13.38
7.9×10^{-3}	7.26	73.73	25.35
3.2×10^{-3}	14.55	70.63	29.05
2.2×10^{-4}	29.1	43.99	15.22
4.9×10^{-5}	58.2	40.5	15.41
4.0×10^{-5}	116.4	32.44	10.89
3.6×10^{-5}	232.8	0	0

Vitality of photobiont cells of <i>X. elegans</i> (genera: <i>Trebouxia</i>) after exposure to polychr. UV radiation ($\lambda \geq 160$ nm) and vacuum			
p / Pa	UV dose	vitality in %	Std.
1 atm	0	90 75	8 76
2.8×10^{-1}	2 42	83	6 53
7.9×10^{-3}	7 26	73	18 02
3.2×10^{-3}	14 55	68 58	16 04
2.2×10^{-4}	29 1	65 3	19 16
4.9×10^{-5}	58 2	57 75	29 47
4.0×10^{-5}	116 4	54 35	19 85
3.6×10^{-5}	232 8	35 74	8 21

Vitality of ascospores of <i>F. bracteata</i> embedded in apothecia after simulated space exposure ($\lambda \geq 160$ nm)				
t_e	p (Pa)	Dosis in kJ/m^2	Vitality (%)	Std.
0 min	1 atm	0	95 23	2 22
1 min	2.8×10^{-1}	0 168	92 12	3 61
5 min	7.4×10^{-2}	0 84	93 43	7 09
30 min	6.1×10^{-5}	5 04	87 1	4 76
1 h	4.4×10^{-5}	10 08	83 77	4 44
2 h	3.6×10^{-5}	20 16	60 32	10 42
4 h	3.2×10^{-5}	40 32	58 66	12 8
8 h	3.2×10^{-5}	80 64	57 97	26 53
16 h	3.1×10^{-5}	161 28	53 88	7 1

Vitality of ascospores of <i>X. elegans</i> embedded in apothecia after simulated space exposure ($\lambda \geq 160$ nm)				
t_e	p (Pa)	Dosis in kJ/m^2	Vitality (%)	Std.
0 min	1 atm	0	93 74	3 77
1 min	2.8×10^{-1}	0 168	91 58	3 55
5 min	7.4×10^{-2}	0 84	93 12	2 32
30 min	6.1×10^{-5}	5 04	93 44	3 78
1 h	4.4×10^{-5}	10 08	80 57	6 23
2 h	3.6×10^{-5}	20 16	81 22	11 44
4 h	3.2×10^{-5}	40 32	80 35	10 87
8 h	3.2×10^{-5}	80 64	81 99	7 49
16 h	3.1×10^{-5}	161 28	80 56	11 33

Vitality of isolated ascospores of <i>F. bracteata</i> after combined treatment of vacuum and polychr. UV radiation at $\lambda \geq 160$ nm				
t_e	p (Pa)	kJ/m^2	Vitality (%)	Std.
0	1 atm	0	75.18	9.93
5 min	7.4×10^{-2}	0.485	73.32	2.11
15 min	1.1×10^{-4}	2.42	41.73	0.95
30 min	6.1×10^{-5}	14.55	59.7	4.27
1 h	4.4×10^{-5}	29.1	22.07	6
2 h	3.6×10^{-5}	58.2	37.74	17.34
4 h	3.2×10^{-5}	116.4	26.12	2.11
8 h	3.2×10^{-5}	232.8	15.11	0.16
16 h	3.1×10^{-5}	465.6	24.26	15.11

Responses of ascospores of <i>F. bracteata</i> to the comined action of vacuum and polychromatic UV radiation ($\lambda \geq 160$ nm)				
t_e	p (Pa)	Dosis in kJ/m^2	Germination (%)	Std.
0 min	1 atm	0	85.23	11.32
1 min	2×10^{-1}	0.485	77.12	14.78
5 min	1.2×10^{-1}	2.42	93.43	1.32
30 min	8.3×10^{-2}	14.55	80.1	5.89
1 h	6.8×10^{-3}	29.1	84.33	2.27
2 h	6.1×10^{-3}	58.2	55.88	10.11
4 h	5.8×10^{-3}	116.4	66.72	20.26
8 h	5.5×10^{-3}	232.8	57.41	8.49
16 h	5.5×10^{-3}	465.6	51.78	15.42

Responses of ascospores of <i>X. elegans</i> to the comined action of vacuum and polychromatic UV radiation ($\lambda \geq 160$ nm)				
t_e	p (Pa)	Dosis in kJ/m^2	Germination (%)	Std.
0 min	1 atm	0	91.24	4.67
1 min	2×10^{-1}	0.485	89.78	3.33
5 min	1.2×10^{-1}	2.42	93.73	1.22
30 min	8.3×10^{-2}	14.55	94.44	3.44
1 h	6.8×10^{-3}	29.1	77.67	8.17
2 h	6.1×10^{-3}	58.2	81.14	13.44
4 h	5.8×10^{-3}	116.4	65.15	10.55
8 h	5.5×10^{-3}	232.8	84.59	8.59
16 h	5.5×10^{-3}	465.6	80.56	17.35

Germination capacity (%) of ascospores of both investigated lichens after UV ($\lambda = 254$ nm) irradiation and incubation on different substrates									
F. bracteata					X. parietina				
Substrate	t_e	Dose (kJm^{-2})	%	Std.	Substrate	t_e	Dose (kJm^{-2})	%	Std.
H ₂ O-Ag	0 min	0	20 11	1 23	H ₂ O-Ag.	0 min	0	23 45	0 97
	1 min	0 024	22 23	0 98		1 min	0 024	22 83	0 86
	5 min	0 12	25 3	1 35		5 min	0 12	27 65	0 5
	30 min	0 72	23 21	2 22		30 min	0 72	33 64	0 12
	1 h	1 44	9 09	7 87		1 h	1 44	20	1 11
	2 h	2 88	17 67	4 67		2 h	2 88	30 95	0 3
Erde/H ₂ O	0 min	0	86 77	1 22	Erde/H ₂ O	0 min	0	97 88	0 1
	1 min	0 024	85	1 43		1 min	0 024	94 05	2 34
	5 min	0 12	84 87	0 78		5 min	0 12	96 13	1 8
	30 min	0 72	80 64	3 23		30 min	0 72	99 18	0 3
	1 h	1 44	87 23	0 67		1 h	1 44	92 59	2 21
Mars/H ₂ O	0 min	0	87 45	1 43	Mars/H ₂ O	0 min	0	93 65	0 3
	1 min	0 024	70	4 46		1 min	0 024	91 58	2 25
	5 min	0 12	93 33	0 56		5 min	0 12	94 44	0 1
	30 min	0 72	84 88	1 23		30 min	0 72	85 42	4 76
	1 h	1 44	67 32	5 43		1 h	1 44	93 42	0 7
2 h	2 88	53 88	6 56	2 h	2 88	74 15	5 56		
F. bracteata					X. parietina				
Substrate	t_e	Dose (kJm^{-2})	%	Std.	Substrate	t_e	Dose (kJm^{-2})	%	Std.
MY-Agar	0 min	0	68 89	3 11	MY-Agar	0 min	0	40 34	0 89
	1 min	0 024	53 88	5 35		1 min	0 024	44 68	1 11
	5 min	0 12	82 2	2 13		5 min	0 12	37 85	2 02
	30 min	0 72	67 32	4 26		30 min	0 72	39 13	0 34
	1 h	1 44	58 2	4 37		1 h	1 44	42 85	1 54
	2 h	2 88	62 32	2 71		2 h	2 88	38	1 23
Erde/MY	0 min	0	78 97	0 76	Erde/MY	0 min	0	68 89	2 1
	1 min	0 024	75	2 1		1 min	0 024	65 63	2 1
	5 min	0 12	81 2	0 88		5 min	0 12	65 85	0 65
	30 min	0 72	81 1	1 32		30 min	0 72	42 86	5 47
	1 h	1 44	76 32	2 98		1 h	1 44	77 3	3 66
2 h	2 88	74 41	2 45	2 h	2 88	69 7	2 67		
Mars/My	0 min	0	43 67	1 98	Mars/My	0 min	0	62 89	3 2
	1 min	0 024	19 14	7 33		1 min	0 024	57 55	1 99
	5 min	0 12	37 72	2 22		5 min	0 12	45 88	3 78
	30 min	0 72	45 44	1 71		30 min	0 72	64 56	4 1
	1 h	1 44	41 14	2 99		1 h	1 44	62 86	2 13
2 h	2 88	39 78	1 24	2 h	2 88	64 67	3 33		

Anhang

Table 2. Germination rate (%) of ascospores after vacuum treatment (16 h at 10^{-3} Pa) UV irradiation ($200 \leq \lambda \leq 400$ nm; dose: 161.28 kJ/m²) or combined treatment of vacuum (16 h at 10^{-3} Pa) and UV radiation ($160 \leq \lambda \leq 400$ nm; dose: 465.41kJ/m²) and incubation on Medium 2.

Species	Germination rate			
	control	vacuum (10^{-3} Pa)	UV (161.28 kJm ⁻²)	vacuum + UV (10^{-3} Pa; 161.28 kJm ⁻²)
F. bracteata	85.34±9.32	53.00±21.19	53.67±6.36	51.78±15.42
X. elegans	92.21±3.54	75.57±12.01	78.77±4.78	80.56±15.51

Growth rate of mycobiont mycelia of <i>X. elegans</i> after exposure to monochromatic UV C radiation ($\lambda = 254$ nm)						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	dose (kJ/m ²)	Control	2 88	5 76	11 52	
time of incubation	first day	1 33	1 17	1 11	1 11	diameter of mycobiont mycelia (mm)
	After 1 month	2 96	1 88	1 53	1 39	
	After 2 month	4 03	3 2	2 39	3 8	

Growth rate of mycobiont mycelia of <i>F. bracteata</i> after exposure to monochromatic UV C radiation ($\lambda = 254$ nm)						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	dose (kJ/m ²)	Control	2 88	5 76	11 52	
time of incubation	first day	1 81	1 61	1 59	1 79	diameter of mycobiont mycelia (mm)
	After 1 month	4 08	2 21	2 91	3 06	
	After 2 month	4 85	3 38	3 61	3 12	

Growth rate of mycobiont mycelia of <i>X. elegans</i> after exposure to polychromatic UV radiation ($\lambda \geq 200$ nm)						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	dose (kJ/m ²)	Control	19.84	39.68	79.36	
time of incubation	first day	2 76	1 51	2 49	3 13	diameter of mycobiont mycelia (mm)
	After 1 month	3 8	1 97	2 91	3 24	
	After 2 month	4 56	2 02	3 11	3 3	

Growth rate of mycobiont mycelia of <i>X. elegans</i> after exposure to vacuum						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	P (Pa)	Control	4.9×10^{-5}	4.0×10^{-5}	3.6×10^{-5}	
time of incubation	first day	1 86	1 6	1 39	1 86	diameter of mycobiont mycelia (mm)
	After 1 month	3 38	2 59	2 2	2 83	
	After 2 month	4 49	2 91	2 92	3 93	

Growth rate of mycobiont mycelia of <i>X. elegans</i> after exposure to space parameters						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	dose (kJ/m ²)	Control	58.2	116.4	232.2	
	pressure (Pa)	1 atm	4.9 x 10 ⁻⁵	4.0 x 10 ⁻⁵	3.6 x 10 ⁻⁵	
time of incubation	first day	0.9	1.2	1	1	diameter of mycobiont mycelia (mm)
	After 1 month	3.5	2.1	1.9	2.1	
	After 2 month	4.1	4.3	3.3	3.3	

Growth rate of mycobiont mycelia of <i>F. bracteata</i> after exposure to space parameters						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	dose (kJ/m ²)	Control	58.2	116.4	232.2	
	pressure (Pa)	1 atm	4.9 x 10 ⁻⁵	4.0 x 10 ⁻⁵	3.6 x 10 ⁻⁵	
time of incubation	first day	1.2	1.2	1.7	1.3	diameter of mycobiont mycelia (mm)
	After 1 month	2	1.2	1.7	1.3	
	After 2 month	2.8	1.3	1.7	1.3	

Growth rate of photobiont cells of <i>X. elegans</i> after exposure to monochromatic UV C radiation ($\lambda = 254 \text{ nm}$)						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	dose (254 nm) (kJm ⁻²)	Control	2.88	5.76	11.52	
time of incubation	first day	33181	19275	26088	10934	Number of cells (N)
	After 7 days	82064	72700	40388	23958	
	After 12 days	97084	75665	63526	33575	

Growth rate of photobiont cells of <i>F. bracteata</i> after exposure to monochromatic UV C radiation ($\lambda = 254 \text{ nm}$)						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	dose (254 nm) (kJm ⁻²)	Control	2.88	5.76	11.52	
time of incubation	first day	256	147	170	129	Number of cells (N)
	After 7 days	513	188	193	66	
	After 12 days	688	200	197	0	

Growth rate of photobiont cells of <i>F. bracteata</i> after exposure to polychromatic UV radiation ($\lambda \geq 200$ nm)						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	dose (200 nm - 400 nm) (kJm^{-2})	Control	19 84	39 68	79 36	
time of incubation	first day	143	141	140	176	Number of cells (N)
	After 7 days	197	316	143	57	
	After 12 days	294	386	156	0	

Growth rate of photobiont cells of <i>X. elegans</i> after exposure to polychromatic UV radiation ($\lambda \geq 200$ nm)						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	dose (200 nm - 400 nm) (kJm^{-2})	Control	58.2	116.4	232.2	
time of incubation	first day	8825	29351	21437	11533	Number of cells (N)
	After 7 days	54392	54203	29899	12613	
	After 12 days	86981	62132	38541	13694	

Growth rate of photobiont cells of <i>F. bracteata</i> after exposure to vacuum						
Fbr parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	p (Pa)	1 atm	3.6×10^{-5}	3.2×10^{-5}	3.1×10^{-5}	
time of incubation	first day	1736	1528	1624	1687	Number of cells (N)
	After 7 days	3363	609	546	98	
	After 12 days	4878	322	457	0	

Growth rate of photobiont cells of <i>X. elegans</i> after exposure to vacuum						
Xe parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	p (Pa)	1 atm	3.6×10^{-5}	3.2×10^{-5}	3.1×10^{-5}	
time of incubation	first day	2221	2013	2029	2112	Number of cells (N)
	After 7 days	4425	1789	522	438	
	After 12 days	6291	24	7	0	

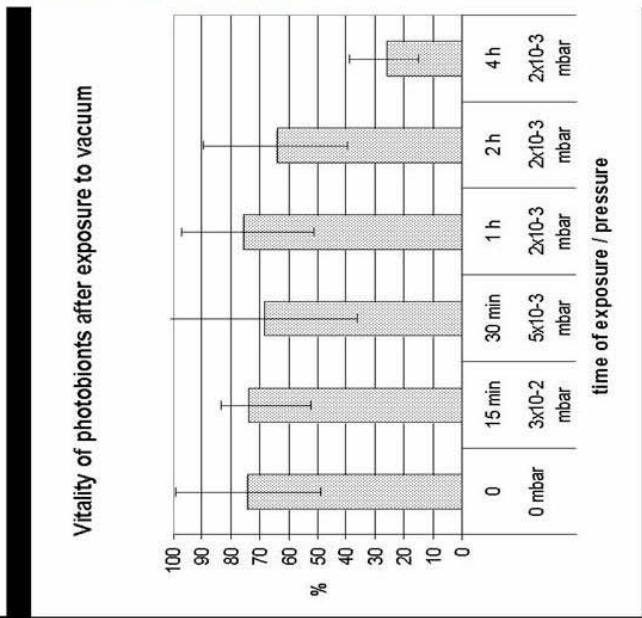
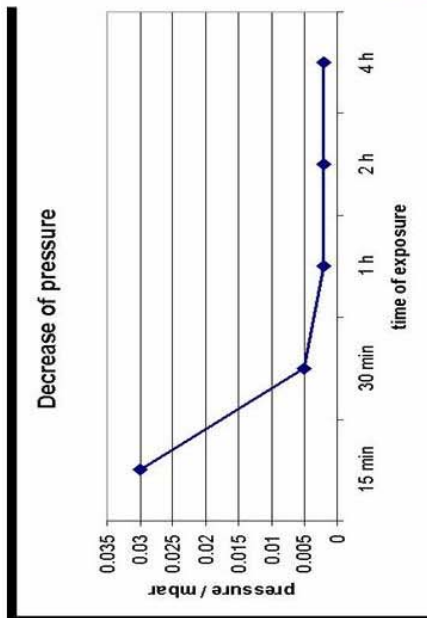
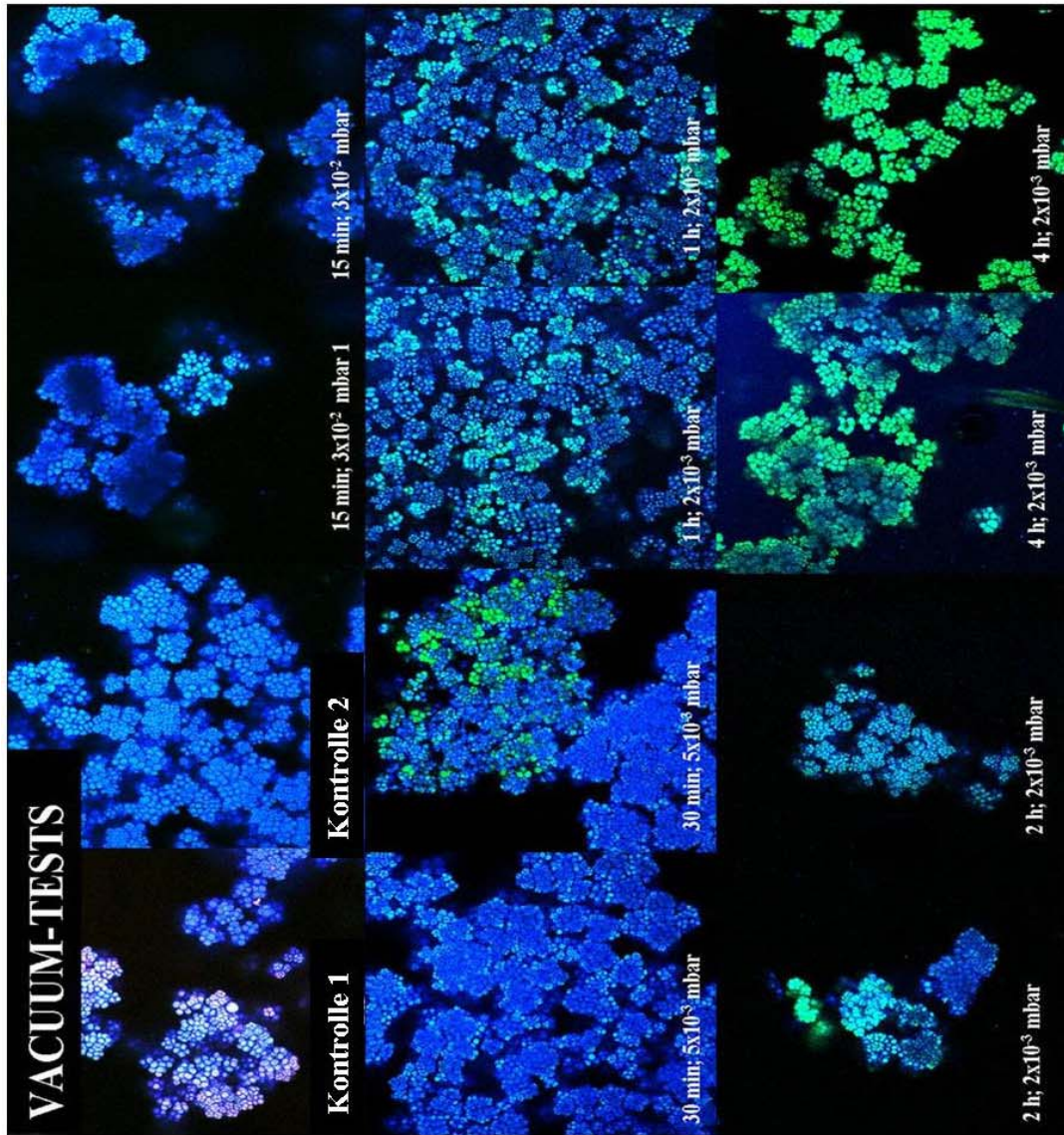
Growth rate of photobiont cells of <i>F. bracteata</i> after exposure to space simulation						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	dose (200 nm - 400 nm) (kJm ⁻²)	Control	58.2	116.4	232.2	
	p (Pa)	1 atm	3 6 x 10 ⁻⁵	3 2 x 10 ⁻⁵	3 1 x 10 ⁻⁵	
time of incubation	first day	1527	1537	1565	1484	Number of cells (N)
	After 7 days	2939	115	23	0	
	After 12 days	4268	0	0	0	

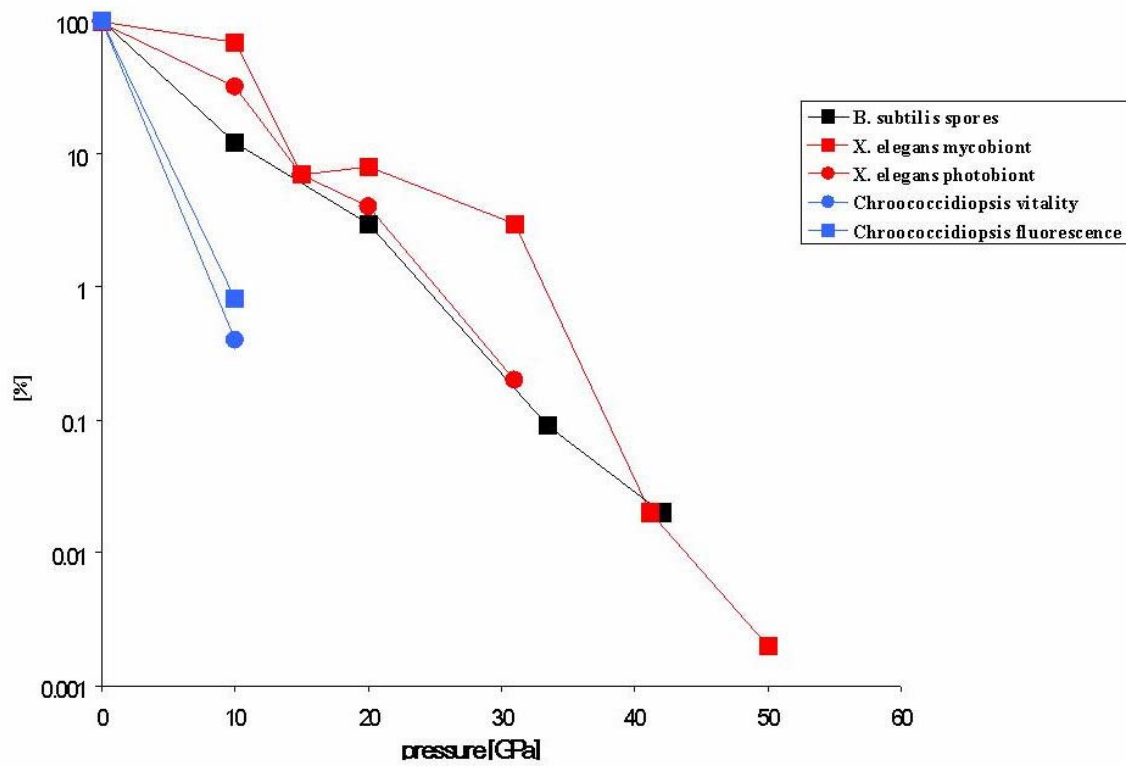
Growth rate of photobiont cells of <i>X. elegans</i> after exposure to space simulation						
parameters	time of exposure	0 h	2 h	4 h	8 h	parameters
	dose (200 nm - 400 nm) (kJm ⁻²)	Control	58.2	116.4	232.2	
	p (Pa)	1 atm	3 6 x 10 ⁻⁵	3 2 x 10 ⁻⁵	3 1 x 10 ⁻⁵	
time of incubation	first day	3240	2125	2039	1994	Number of cells (N)
	After 7 days	6457	1918	533	900	
	After 12 days	9211	0	0	0	

Vital cells of shocked lichen tissue (%)		
Shock pressure (GPa)	vital cells (%)	Std.
control	93 87	2 87
10	56 03	3 76
15	7 02	2 9
20	7 86	1 5
30	2 71	1 2
40	0 02	0 001
50	0 002	0 0001

<i>X. elegans</i> Mycobiont	
Shock pressure (GPa)	vital cells (%)
control	98 1
10	68 67
15	7 03
20	8 18
30	2 82
40	0 02
50	0 002

<i>X. elegans</i> Photobiont	
Shock pressure (GPa)	vital cells (%)
control	97 35
10	32 42
15	6 89
20	3 54
30	0 18
40	0
50	0



Ergebnisse der Stoßwellen belasteten Organismen im Vergleich zu *Xanthoria elegans*

.....ich denke, das war es! – Halt! Nein, es fehlt noch ein sehr wichtiger Teil. Das hätte ich nach der Anspannung der letzten Tage intensiven Zusammenschreibens fast vergessen:

Die DANKSAGUNG / The ACKNOWLEDGEMENTS

Dies ist eine schwere Aufgabe - insofern, dass ich niemanden vergessen möchte. An dieser Stelle sei gesagt: sollte ich jemand vergessen haben, so möchte ich mich entschuldigen und vorweg eine Reihe offen lassen, in der ich manuell oder maschinell noch nachträglich Namen von Personen einfügen kann, die ebenfalls meinen besonderen Dank verdienen:

Besonders möchte ich mich bei Dir/Euch/Ihnen noch einmal herzlich bedanken, wie z.B.:

.....

Es sind so viele die mich während einer langen Zeit auf die eine oder andere Art begleitet und unterstützt haben, es wäre traurig, wenn diese lieben Menschen aufgrund meiner ungewollten Unachtsamkeit ungenannt wurden (also liebe Leute: die punktierte Reihe wartet auf den Eintrag eures Namens).

Einen besonderen herzlichen Dank meinerseits hat Frau Prof. Dr. Sieglinde Ott verdient, die mich als Doktormutter trotz der vielen eigenen Arbeit in vielerlei Hinsicht unterstützt hat. Zunächst war ihre Idee für das Thema meiner Arbeit: „Flechten unter Extrembedingungen“ zu bearbeiten äußerst genial und befruchtete meinen Geist, der auch eigene Ideen bzgl. der Erforschung der „Grenzen des Überlebens“ von Organismen hatte. Das Resultat ist die hier vorliegende Arbeit. Frau Ott ließ mich wissen, dass diese Idee unter anderem aus Gesprächen des leider verstorbenen Antarktisforschers und Astrobiologen David Wynn-Williams geboren wurde. Somit möchte ich zumindest einen Dank an den in den Himmeln verweilenden David schicken:

*Danke, David!!! Ich werde mich bemühen Dein Erbe mit vielen anderen Mitstreitern,
wie beispielsweise diejenigen, die in dieser Danksagung erwähnt werden
weiterzuführen.*

Frau Ott möchte ich auch für einige Motivationsschübe, wichtige, teilweise hitzige, aber auch sehr viel weiterbringende gemeinsame Diskussionen und Gespräche danken. So manche schwierige Zeit konnte durch diese Form der Förderung der eigenen Ideen überbrückt werden. Auch danke ich ihr für die Bereitschaft, mir die Möglichkeit zu geben, an wichtigen Tagungen im In- und Ausland sowie an Exkursionen im Hochgebirge teilnehmen zu können. Derartige Exkursionen waren notwendig, um das wichtige Probenmaterial vorort sammeln zu können und standortmäßig zu erfassen. Die Tagungen waren wichtig, um den Dialog und die Zusammenarbeit mit etablierten und anerkannten Wissenschaftlern zu fördern.

Sehr dankbar bin ich auch Herrn Prof. Dr. Hans Martin Jahns, der mir in Gesprächen und bei den Institutsseminaren sehr wichtige konstruktive Anregungen für meine Arbeit gab, an die ich gerne anknüpfte und die mir sehr wertvoll waren. Auch für das finanzielle Auskommen während der Zeit meiner Arbeit teilte er unentwegt meine Sorgen und setzte sich trotz der allgemein leeren Kassen diesbezüglich sehr für mich ein.

Sehr dankbar bin ich auch für die Kooperationen, die während meiner Doktorarbeit entweder schon für meine Arbeit gedacht und konzipiert waren oder während der Arbeit entstanden. Einen besonderen Dank verdient an dieser Stelle meine – wie ich meine – zweite Doktormutter, die mich ebenfalls sehr förderte und die Tür zur Welt des sonst so fernen Weltraums mit seinen unendlichen Weiten aufgestoßen hat, so dass ich zur NASA ins Kontroll-Center in Houston während einer Tagung gelangen konnte, im DLR sowie im EAC (European Astronautic Center) der ESA selber über den Tellerrand hinausschauen durfte und sogar in Dingen der Astronautik informiert wurde, aber auch praktisch einiges ausprobieren konnte. Mein Kindheitstraum, Astronaut zu werden ist wieder belebt worden. All’ das, aber auch die vielen Gespräche und Diskussionen verdanke ich Ihnen, Frau Dr.

Gerda Horneck! Aber auch Dir Petra (Dr. Petra Rettberg), Dir Elke (Dr. Elke Rabbow) und Dir Corinna (Dr. Corinna Panitz), verdanke ich diesbezüglich sehr viel. Eure Ratschläge waren und sind mir immer sehr wertvoll.

Herrn Dr. Reitz als Nachfolger von Frau Dr. Horneck, möchte ich auch sehr für die Bereitwilligkeit der Fortsetzung unserer Kooperation danken und ich erinnere mich immer noch gerne an unsere erste Begegnung zurück, als Sie in meinen bevorzugten Aufenthaltsraum während der Langzeitbestrahlung meiner Proben [nämlich die Bibliothek der Abteilung Strahlenbiologie (DLR)] mit Physiker-Kollegen stürmten, mich aber nicht aus dem Raum gebeten hatten, sondern es mir erlaubten, einem Vortrag über solare Strahlung außerhalb der Erdatmosphäre mithören zu dürfen und mitdiskutieren zu können.

Die Danksagung ist aber hiermit noch nicht zu ende. Das ist erst der Anfang. Während meiner Promotion sind wie gesagt viele Kooperationen und sogar Freundschaften entstanden.

Ich möchte mich zunächst bei meinen Kooperationspartnern sehr herzlich bedanken, die es mir ermöglichten, andere Analyseansätze und neue Methodiken im Fach der Lichenologie (Flechtenkunde) anzuwenden oder andere Formen der Zusammenarbeit wie die Aufstellung von ESA-Projekten gewährten. Danken möchte ich diesbezüglich zunächst allgemein dem DLR (in Köln Porz/Wahn und in Berlin/Adlershof), dem Naturkundemuseum Berlin (Humboldt-Universität), dem EMI der Fraunhofer Gesellschaft in Efringen-Kirchen, dem C.E.N.G. in Grenoble (F), dem INTA in Madrid (E), der Open University in Milton Keynes (GB), der Università della Tuscia in Viterbo (I), dem JSC (NASA, USA) und dem Genetischen Institut der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf (D).

Damit diese ominösen Gesellschaften und Institutionen auch einen Namen bekommen, möchte ich mich persönlich bei folgenden Personen, die noch nicht genannt wurden, bedanken:

1. Die Männer der Werkstatt des DLR (Köln, Porz/Wahn)
2. Herr Prof. Dr. Stöffler (Naturkundemuseum Berlin, Humboldt-Universität)
3. Herr Dr. U. Hornemann (EMI, Fraunhofer Gesellschaft, Efringenkirchen) sowie die Sprengmeister
4. Herr Dr. T. Douki (C.E.N.G., Grenoble)
5. Frau Dr. R. Rosa de la Torre (INTA, Madrid)
6. Herr Prof. Dr. C. Cockell (Open University, Milton Keynes)
7. Herr Prof. Dr. S. Onofri (Università della Tuscia in Viterbo)
8. Herr Dr. Allan (JSC, NASA, Houston, USA) – Vielen Dank für zusätzliche 200 g Marsstaub -
9. Herr Prof. Dr. D. Möhlmann (DLR/Berlin)
10. Herr Dr. R. Facius (DLR/Köln)
11. Frau Prof. Dr. Knust (Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
12. Herr Dr. Wodarz (Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
13. Herr Dr. Müller (Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Frau Prof. Dr. Knust sowie Herrn Andreas Wodarz und Herrn Arno Müller möchte ich noch einmal einen gesonderten Dank aussprechen. Frau Prof. Dr. Knust danke ich für ihre Erlaubnis, das CLSM in ihrem Institut für meine Analysen auch zu unmenschlichen, ungewohnten, nächtlichen Zeiten nutzen zu können. Andreas und Arno sowie auch anderen Mitarbeitern des Instituts sei Dank für die Einführung in die CLSM-Technik und die Hilfe bei Software-Problemen.

Software-Probleme sind ein Stichwort! – Damit werde ich nun auch in einem Atemzug die Personen erwähnen, die aufgrund ihrer Hilfe und ihres Zuspruchs in schwierigen Zeiten mir freundschaftlich zur Seite standen und gute Freunde geworden sind.

Herrn Dr. G. Schuster danke ich für seine geduldige und ruhige Art die kniffligen Tücken der Technik und des Computerwesens zu lösen, wenn gar nichts mehr funktionierte (ich nenne nur zwei Beispiele „word“ und „pdf“!!!).

Ich danke Eva Posthoff für ihre Bereitschaft, mich in die Methodik der Myco- und Photobiontenkultivierung einzuführen. Sie war immer freundlich und hilfsbereit, wenn ich auch einmal Dampf wegen fehlgeschlagener Kulturversuche ablassen musste.

Ich danke Ulrike Ellersiek für interessante Diskussionen, die nicht nur fachspezifisch waren und das Institutsleben angenehm gestalteten sowie für mich äußerst erfrischend und belebend wirkten. Jeder Widerspruch von Dir, Ulrike, gegenüber einigen meiner Ansichten, führte dazu, dass ich mich kritischer mit so manchen Dingen auseinandersetzen konnte, was in der Wissenschaft äußerst wichtig ist!

Trudi Schaper möchte ich auch für ihre sehr guten Ratschläge für das Management während meiner Promotionszeit danken und für ihre herzliche Art, mir zu vermitteln, wie mit Problemen umzugehen ist. Ich konnte mir von ihrer Lebenserfahrung einiges abschauen. Viele Gespräche mit Dir, liebe Trudi (oder „Eure Hoheit, Prinzessin“), werden mir immer in Erinnerung bleiben und die Zeit auf Gotland (das Land unserer Flechte *Fulgensia bracteata* subsp. *Rijojaa*) ist ebenfalls unvergesslich.

Für die anregenden Gespräche und freundschaftliche Begleitung möchte ich mich in folgender Liste mit beigefügten Kurzkomentaren bedanken:

- Hannes Doessler (Danke für Lösung von Softwareproblemen und die Bereitstellung des Softwareprogramms Image Tool sowie jede Form der Erbauung)
- Julia Langohr (ermutigende Gespräche haben mich wirklich weiter gebracht)
- Judith Romeike + Sabine Etges (Ratschläge für die Promotionszeit waren äußerst wertvoll)
- Markus Brinkmann (Danke für kritische Hinterfragung im Institutsseminar und gute Ideenimpulse)
- Markus Linden (Danke für Computer-Tipps)
- Joachim Meeßen (Danke für kritische und interessante Gespräche)
- Marco Siegesmund (die Blitzeinführung in die Methodik der molekularbiologischen Charakterisierung von Photobionten war einfach genial!)
- Diana Borchard (die frischen, lustigen, frechen Kommentare werde ich vermissen)
- Thorsten Unterhuber (die Diskussionen über Politik fehlen mir schon eine gewisse Zeit)
- Andreas Engelen (Infos über Polarforschung, Antarktis –was mir leider während meiner Arbeit vergönnt gewesen ist- waren für mich sehr wertvoll und die Kurzeinweisung in so manche Softwareprogramme halfen mir sehr viel weiter)
- André Gassmann (meine große Wertschätzung für herrlich lange Diskussionen und gute Web-Site- sowie Internettipps)
- Paul Wieners (Deine Begeisterung für die Astrobiologie und viele Themenfelder der Wissenschaft belebten meinen bereits bestehenden Enthusiasmus immer wieder neu und unsere teils ins philosophische abdriftende Gespräche bereicherten meinen Geist –weiter so- ich hoffe noch auf zukünftige Zusammenarbeit)
- Valeska Wombacher (Danke für so manche kulinarischen Genüsse)
- Edith Geerkens + Silke Lamby (auch Andreas Engelen) danke ich für die wenigen entspannenden Stunden nach Feierabend beim Klettern
- Andrea Wegener (Deine ruhige Ausgeglichenheit war für mich ansteckend)
- Herr Dr. Behn (Danke für so manche Erbauung in schweren Stunden und die Unterkunft sowie Gastfreundschaft bei Dir in Deinem sehr schönen Haus im Wallis während ich meiner Sammelaktionen der Flechtenproben nachging)
- Herr Dr. Werner Dietrich (Du bist mit Deinem Wissen über die Pflanzen und als Gesprächspartner eine enorme Bereicherung für mich gewesen. Ich teile mit Dir ebenfalls die Bewunderung für Alexander von Humboldt und Deine ewig siegreichen Schachpartien sind für mich eine Herausforderung / Deine Familie hat mich auch sehr freundlich begleitet und erbaut)
- Herr Dr. Lisowsky und Herr Dr. Esser (Danke für wichtige Infos bzgl. Sequenzdateien und die richtige Einschätzung der Realisierbarkeit anderer von mir für die Promotion geplanter Projekte)

- Dr. Jan Toporski (Danke für die interessanten Gespräche in Houston und die wichtigen Hinweise für die Interpretation in Dingen der Panspermie in Deinen Publikationen)
- Uli Pogoda de la Vega (Gemeinsame Arbeitsstunden am CLSM sowie im DLR und auf Tagungen schweißen zusammen; gemeinsam Erlebtes hat uns zu richtigen Freunden gemacht, dafür bin ich Dir sehr dankbar)
- Patrick Lau + Jörg Nellen (unser Exkurs in die Felder der Astronautik mit der „Schüttelmaschine“ bleibt mir unvergessen)
- Christa Baumstark-Kahn (ich sage nur „HUSTEN“ – alias Houston war für uns eine Erfahrung wert; Danke auch für viele Ideenimpulse sowie wertvolle Ratschläge)
- Britta Rowehl (herzlichen Dank für alle Infos. Bei Dir läuft ein Großteil des DLR-Netzwerks zusammen und ohne Deine liebe Hilfsbereitschaft und Deine Hinweise sowie Verbindungen sähe meine Welt auch etwas ärmer aus)
- Conny Meyer (unser Impaktteam mit Ralf hat uns zu einer sehr guten Freundschaft geführt; ich danke Dir für so manch' interessante Einladung und interessante Gespräche über Musik sowie für die Unterkunft in Berlin während meiner Tätigkeiten dort)
- Ralf Möller (Du hast mir viele Türen geöffnet und ich erinnere mich immer daran, wie und wo unsere Freundschaft begann: in der bereits mythisch gewordenen, vielleicht geschichtsträchtigen Bibliothek der Abt. Strahlenbiologie im DLR; Danke, dass Du ein sehr guter Freund bist, der zudem meine Begeisterung für Space-Themen und die Tour de France teilt)

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner lieben langjährigen Freundin und bald zukünftigen Frau Elena sowie ihrer und meiner Familie, die aufgrund meiner vielen Reisen und der vielen Arbeit während meiner Promotionszeit auf mich verzichten mussten. Liebe Elena, ich weiß, wie oft es doch für Dich sehr schwer war, wenn wir einige Vorhaben wieder aufgrund meiner Arbeit auf Eis legen mussten. Aber ich danke Dir, dass es Dir trotzdem möglich war, mich bei einer Tagung sogar zu begleiten und mich aufzubauen. Danke für Dein Verständnis und Deine Liebe!

Meinen Eltern, sowie Geschwistern danke ich für ermutigende Gespräche und die Ermöglichung der Unterkunft bei ihnen in Paris, als ich dort eine Tagung besuchte. Ich bedanke mich auch für viel Liebe, die besonders meine Mutter und mein Vater mir für meinen Werdegang gegeben haben. Diese Liebe war mit viel Aufopferungsbereitschaft verbunden und unsere Familie war mehrmals durch viele schwere Zeiten gegangen (auch zu Promotionszeiten). Dafür sehr großen Dank!!! (diese Worte vermögen nicht das wirkliche Gefühl zu erfassen, das ich hierbei habe).

Ingo Soboll danke ich auch für die Gastfreundschaft während meines Aufenthalts in Berlin. Die Unterkunft bei Dir während des DFG-Workshops und aufgrund einer Einladung zum Vortrag am Naturkundemuseum war ein Glücksfall. Dafür noch einmal herzlichen Dank. Frau Eckert (insgeheim schon meine Schwiegermama) möchte ich für das Korrekturlesen mancher Publikation danken und Herrn Knauer sowie Ansgar Wallenhorst für die vielen schönen, entspannenden Stunden beim gemeinsamen Musizieren am Klavier, an der Orgel oder beim Chorgesang. Musik ist immer die beste Therapie, um so manchen Promotions-Stress abzubauen.

Beenden möchte ich den Dankesreigen mit der Nennung der Sponsoren. Einen sehr großen Dank richte ich hiermit an die Institutionen und Gesellschaften, die mir finanziell unter die Arme gegriffen haben und ohne die ich die Arbeit nicht hätte in der Weise ausführen können, wie sie letztendlich glücklicherweise doch erfolgen konnte. Vielen Dank an:

- FAZIT-Stiftung (für das zweijährige Stipendium)
- DFG (für die Förderung unserer Impaktstudien)
- COSPAR (für die Travel-Grants zum World-Space-Congress in Houston/Texas (NASA) und der COSPAR-Tagung in Paris)
- EANA (für den Travel-Grant nach Milton-Keynes, hier wäre insbesondere Herr Prof. Dr. André Brack zu erwähnen)

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen

Düsseldorf, 05.12.2005

Jean-Pierre Paul de Vera