

Monika Brinker

**Untersuchungen  
zur circadianen Rhythmik  
in Gymnospermen**



Cuvillier Verlag Göttingen

**Untersuchungen**  
**zur circadianen Rhythmik**  
**in Gymnospermen**

**Dissertation**  
**zur Erlangung des Doktorgrades**  
**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche**  
**der Universität Rostock**

**vorgelegt von:**  
Monika Brinker  
aus Surwold (Emsland)

Rostock 2001

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

**Brinker, Monika:**

Untersuchungen zur circadianen Rhythmik in Gymnospermen /  
vorgelegt von Monika Brinker. -

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2001

Zugl.: Rostock, Univ., Diss., 2002

ISBN 3-89873-373-4

**Gutachter:**

Prof. Dr. Birgit Piechulla  
Universität Rostock

Prof. Dr. Maria Mittag  
Universität Jena

Prof. Dr. Wolfgang Engelmann  
Universität Tübingen

**Datum der Verteidigung:**

22.02.2002

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2002

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung  
des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile  
daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie)  
zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2001

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-373-4

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Taxonomie der Spermatophyta	1
1.2 Circadiane Rhythmen in Pflanzen	2
1.3 Der LHC-Komplex in Pflanzen	5
1.4 Zielsetzungen	7
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>8</b>
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	8
2.1.2 Mikroorganismen	8
2.1.3 Pflanzen	9
2.1.4 Plasmide	9
<b>2.2 Methoden</b>	
<b>2.2.1 Bakterien- und Pflanzenanzucht</b>	<b>10</b>
2.2.1.1 Anzucht von <i>E.coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (nach Sambrook et al. 1989)	10
2.2.1.2 Anzucht von <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Nicotiana glauca</i>	10
2.2.1.3 Anzucht von <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinus contorta</i> und <i>Picea abies</i>	11
2.2.1.4 Anzucht von <i>Ginkgo biloba</i>	11
2.2.1.5 Anzucht von <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> Moneymaker und <i>Nicotiana tabacum</i> in Sterilkultur	11
<b>2.2.2 RNA-Isolierungsmethoden</b>	<b>12</b>
2.2.2.1 RNA-Isolierung (CsCl-Methode) aus <i>Lycopersicon esculentum</i>	12
2.2.2.2 RNA-Extraktion nach der CTAB-Methode aus Gymnospermen (Chang et al. 1993)	13
2.2.2.3 RNA-Extraktion-LiCl-Methode (nach Piechulla et al. 1996)	14
2.2.2.4 RNA-Extraktion Qiagen-Kit RNeasy	14
<b>2.2.3 DNA-Isolierungsmethoden</b>	<b>15</b>
2.2.3.1 DNA-Isolierung aus <i>Pinus contorta</i>	15
2.2.3.2 DNA-Isolierung aus <i>Lycopersicon esculentum</i>	15
2.2.3.3 Isolierung von genomischer DNA als zweites Produkt bei der RNA-Isolierung	15
2.2.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	15
2.2.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit Hilfe des DNA-Plasmid-Qiagen Kits	16
<b>2.2.4 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration</b>	<b>16</b>
<b>2.2.5 Horizontale Gelelektrophorese</b>	<b>17</b>
2.2.5.1 Überprüfung der Intaktheit der RNA durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese	17
2.2.5.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese	17
<b>2.2.6 Transfer von RNA auf Nylonmembranen</b>	<b>18</b>
2.2.6.1 Transfer von RNA auf Nylonmembranen durch Kapillarkraft ("Northern Blot")	18
2.2.6.2 Transfer von RNA auf Nylonmembranen durch Unterdruck ("Northern Blot" durch einen Vakuumblotter)	19
<b>2.2.7 Hybridisierungstechniken</b>	<b>19</b>
2.2.7.1 Herstellung von Lachsspermien-DNA als Blockingreagenz	19
2.2.7.2 Radioaktive Markierung der Sonde durch „Random Priming“	20
2.2.7.3 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	20

2.2.7.4	Markierung der Sonde mit Dig-dUTP durch „Random Priming“	20
2.2.7.5	Markierung der Sonde mit Dig-dUTP mittels PCR	21
2.2.7.6	Bestimmung der eingebauten Menge an Radioaktivität in die DNA-Sonde	22
2.2.7.7	Bestimmung der eingebauten Menge an DIG-dUTP in die DNA Sonde	22
2.2.7.8	Hybridisierung mit radioaktiven Sonden, die über „Random priming“ markiert worden waren	22
2.2.7.9	Hybridisierung mit radioaktiven Oligonukleotiden als Sonde	24
2.2.7.10	Hybridisierung mit Dig-dUTP-markierten Sonden	25
2.2.7.11	Immunologischer Nachweis der mRNA bzw. rRNA	25
<b>2.2.8</b>	<b>Klonierungstechniken</b>	<b>26</b>
2.2.8.1	Plasmid-Restriktion	26
2.2.8.2	Gelaufreinigung von DNA mit QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen)	27
2.2.8.3	Reinigung von PCR-Produkten	27
2.2.8.4	Ligation	27
2.2.8.5	PCR auf Kolonien von <i>E. coli</i> oder <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
2.2.8.6	DNA-Sequenzierung	28
<b>2.2.9</b>	<b>Transformationstechniken</b>	<b>29</b>
2.2.9.1	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen	29
2.2.9.2	Herstellung und Transformation chemokompenter <i>E.coli</i> -Zellen	30
2.2.9.3	Tomatentransformation mittels Agrobakterien (modifiziert nach Filatti et al. 1987)	31
2.2.9.4	Transformation von <i>Picea abies</i> durch Partikelbombardement	33
<b>2.2.10</b>	<b>GUS-Proteinaktivitätsassay</b>	<b>35</b>
2.2.10.1	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	35
2.2.10.2	Fluorimetrische Messungen von GUS-Protein (nach Jefferson et al. 1987)	35
<b>2.2.11</b>	<b>Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)</b>	<b>37</b>
<b>2.2.12</b>	<b>Blattbewegungen</b>	<b>40</b>
<b>2.2.13</b>	<b>Gaswechsellmessungen</b>	<b>40</b>
<b>2.2.14</b>	<b>EM-Bilder</b>	<b>42</b>
<b>2.2.15</b>	<b>Untersuchungen zur RNA-Stabilität</b>	<b>42</b>
2.2.15.1	Kinetische Grundlagen für die Bestimmung von Halbwertszeiten mit Hilfe von Actinomycin D	42
2.2.15.2	Untersuchungen zur Stabilität der Transkripte verschiedener Gene in <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Ginkgo biloba</i>	43
2.2.15.3	Überprüfung des Transportes von radioaktiven Substanzen in Gymnospermen	44
2.2.15.4	Überprüfung der Wirkung von Actinomycin D	44
2.2.15.5	Berechnungen zur Vorhersage der Sekundärstrukturen verschiedener <i>Lhc</i> -RNA-Spezies	45
<b>2.2.9</b>	<b>Zur Auswertung der Experimente</b>	<b>46</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Genexpression in Gymnospermen und Angiospermen</b>	<b>47</b>
3.1.1	<i>Lhc</i> -Genexpression im Licht-Dunkelwechsel	47
3.1.2	<i>Lhc</i> -Genexpression im Dauerdunkel bei <i>Pinus sylvestris</i> und <i>Ginkgo biloba</i>	51
3.1.3	Expressionsmuster anderer Gene in Angiospermen und Gymnospermen	56

3.1.4 Expression von Reportergenen unter der Kontrolle verschiedener Promotoren in Angiospermen und Gymnospermen	59
3.1.5 Reaktionen der <i>Lhc</i> -Transkriptmenge auf Lichteinstrahlung in <i>Ginkgo biloba</i> und <i>Pinus sylvestris</i> nach einigen Tagen im Dauerdunkel	72
<b>3.2 Untersuchungen zur RNA-Stabilität</b>	<b>77</b>
3.2.1 Transport von radioaktiv markierten Molekülen in <i>Ginkgo biloba</i> und <i>Pinus sylvestris</i>	77
3.2.2 Wirkung von Actinomycin D in <i>Pinus sylvestris</i>	80
3.2.3 Bestimmung von Transkriptstabilitäten in verschiedenen Pflanzen	83
3.2.3.1 Halbwertszeiten der <i>Lhc</i> -Transkripte in verschiedenen Pflanzen	83
3.2.3.2 Halbwertszeiten der Transkripte anderer Gene	90
3.2.3.3 Gleichzeitige Bestimmung der Stabilitäten der <i>Pinus contorta-Lhc</i> - und der Tomaten- <i>Lhc</i> -Transkripte in transgenen Tomaten	94
3.2.3.4 Sequenzvergleichende Untersuchungen und Berechnungen zur Vorhersage der Sekundärstrukturen verschiedener <i>Lhc</i> -RNA-Spezies aus <i>Lycopersicon esculentum</i> und <i>Pinus contorta</i>	103
<b>3.3 Physiologische Untersuchungen</b>	<b>107</b>
3.3.1 Blattbewegungen	107
3.3.2 Gaswechselfmessungen und elektronenmikroskopische Aufnahmen	110
<b>4. Diskussion</b>	<b>115</b>
4.1 <i>Lhc</i> -Transkriptakkumulation und <i>Lhc</i> -Transkription in Gymnospermen	115
4.2 <i>Lhc</i> -Genexpression und <i>Lhc</i> -mRNA-Stabilität	125
4.2.1 Auswahl eines geeigneten Verfahrens und Voraussetzungen zur Bestimmung von Transkripthalbwertszeiten	125
4.2.2 <i>Lhc</i> -Genexpression und <i>Lhc</i> -mRNA-Stabilität	132
4.3 Rhythmische Phänomene in Gymnospermen	138
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>142</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Fotos von <i>Ginkgo biloba</i> und <i>Pinus sylvestris</i>	2
Abb. 1.2	Model der inneren Uhr in Eukaryoten, modifiziert nach Kondo und Ishiura 1999	5
Abb. 2.1	Genkanone zur Transformation von <i>Picea abies</i> -Zellen	33
Abb. 2.2	Herstellung und Regeneration transgener <i>Picea abies</i> -Pflanzen	34
Abb. 2.3	Apparatur zur Detektion von Blattbewegungen	40
Abb. 2.4	Apparatur zur Messung der stomatären Leitfähigkeit und Assimilation	41
Abb. 3.1	<i>Lhc</i> -Transkriptverteilung in <i>Heliantus annuus</i> im Licht-Dunkelwechsel	47
Abb. 3.2	<i>Lhc</i> -Transkriptverteilung in <i>Pinus sylvestris</i> im Licht-Dunkelwechsel	48
Abb. 3.3	<i>Lhc</i> -Transkriptverteilung in <i>Pinus contorta</i> im Licht-Dunkelwechsel	49
Abb. 3.4	<i>Lhc</i> -Transkriptverteilung in <i>Ginkgo biloba</i> im Licht-Dunkelwechsel	50
Abb. 3.5	<i>Lhc</i> -Transkriptverteilung am ersten und zweiten Tag im Dauerdunkel in <i>Pinus sylvestris</i>	51
Abb. 3.6	<i>Lhc</i> -Transkriptverteilung am sechsten Tag im Dauerdunkel in <i>Pinus sylvestris</i> bei Anzucht auf Erde	52
Abb. 3.7	<i>Lhc</i> -Transkriptverteilung am sechsten Tag im Dauerdunkel in <i>Pinus sylvestris</i> bei Anzucht in Sterilkultur	53
Abb. 3.8	<i>Lhc</i> -Transkriptverteilung am vierten und sechsten Tag im Dauerdunkel in <i>Ginkgo biloba</i>	54
Abb. 3.9	<i>Lhc</i> -Transkriptgehalt um 12 Uhr mittags im Dauerdunkel in <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Pinus sylvestris</i> und <i>Nicotiana sylvestris</i>	55
Abb. 3.10	<i>rca</i> -Transkriptverteilung in <i>Gnetum gnemon</i> im Licht-Dunkelwechsel	57
Abb. 3.11	<i>gs</i> -Transkriptverteilung in <i>Pinus sylvestris</i> im Licht-Dunkelwechsel	58
Abb. 3.12	Promotor::Reporter-Gen-Konstrukt (p <i>Lhcb</i> :: <i>uidA</i> ::nos)	59
Abb. 3.13	<i>uidA</i> -Transkriptverteilung in transgenen Tabakpflanzen p <i>LHCb</i> :: <i>uidA</i> ::nos der F0-Generation im Licht-Dunkelwechsel	61
Abb. 3.14	Promotor::Reporter-Gen-Konstrukte ( $\Delta 119$ :: <i>uidA</i> ::nos, $\Delta 251$ :: <i>uidA</i> ::nos)	63
Abb. 3.15	Fluoreszenzmessungen von embryonischen <i>Picea abies</i> -Zellen nach Bombardement mit Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten	64
Abb. 3.16	Untersuchungen zur Bestimmung der Expression eines stabil integrierten Transgens in <i>Picea abies</i> über reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)	65
Abb. 3.17	RT-PCR-Produkte der Linie 77-17	68
Abb. 3.18	RT-PCR-Produkte einer RNA-Probe einer 35S:: <i>uidA</i> -Tomate (Erntezeitpunkt 12 Uhr)	70
Abb. 3.19	<i>Lhc</i> -Transkriptverteilung in <i>Pinus sylvestris</i> vor und nach 4h Belichtung bei Anzucht auf Erde	73
Abb. 3.20	<i>Lhc</i> -Transkriptverteilung in <i>Pinus sylvestris</i> vor und nach 4h Belichtung bei Anzucht in Sterilkultur	75
Abb. 3.21	<i>Lhc</i> -Transkriptverteilung in <i>Ginkgo biloba</i> vor und nach 4h Belichtung	76
Abb. 3.22	Verteilung der Radioaktivität eines P <sup>32</sup> -markierten Oligonukleotids in unterschiedlichen Blatteilen von <i>Ginkgo biloba</i>	78
Abb. 3.23	Verteilung der Radioaktivität eines P <sup>32</sup> -markierten Nukleotids (dCTP) in unterschiedlichen Teilen von <i>Pinus sylvestris</i>	79
Abb. 3.24	Schema des ersten Versuchaufbaus zur Testung der Wirkung in <i>Pinus sylvestris</i>	80
Abb. 3.25	Erster Versuch zur Testung der Wirkung von Actinomycin D in <i>Pinus sylvestris</i>	81
Abb. 3.26	Zweiter Versuch zur Testung der Wirkung von Actinomycin D in <i>Pinus sylvestris</i>	82
Abb. 3.27	Untersuchungen zur Bestimmung der <i>Lhc</i> -Transkriptstabilität in <i>Lycopersicon esculentum</i>	84
Abb. 3.28	Untersuchungen zur Bestimmung der <i>Lhc</i> -Transkriptstabilität in <i>Nicotiana tabacum</i>	86
Abb. 3.29	Untersuchungen zur Bestimmung der <i>Lhc</i> -Transkriptstabilität in <i>Pinus sylvestris</i>	88
Abb. 3.30	Untersuchungen zur Bestimmung der <i>Lhc</i> -Transkriptstabilität in <i>Ginkgo biloba</i>	89
Abb. 3.31	Untersuchungen zur Bestimmung der <i>trnH</i> -Transkriptstabilität in <i>Pinus sylvestris</i>	91
Abb. 3.32	Untersuchungen zur Bestimmung der <i>psbA</i> -Transkriptstabilität in <i>Lycopersicon esculentum</i>	93
Abb. 3.33	Übersicht über die Herstellung transgener Tomatenpflanzen	94
Abb. 3.34	35S:: <i>Lhcb</i> ( <i>Pinus contorta</i> ) T-DNA zur Expression eines <i>Pinus contorta</i> - <i>Lhcb</i> -Gens in Tomate	95
Abb. 3.35	Autoradiogramme der Northern Blots zur Bestimmung der Tomaten- <i>Lhc</i> -Transkriptstabilität und <i>Pinus-Lhc</i> -Transkriptstabilität in transgenen Tomatenpflanzen	97
Abb. 3.36	Densitometrische Auswertungen der Autoradiogramme der Proben zur Bestimmung der Tomaten- <i>Lhc</i> -Transkriptstabilität in transgenen Tomatenpflanzen mit dem Konstrukt 35S:: <i>Lhcb</i> ( <i>Pinus contorta</i> )	98

Abb. 3.37	Densitometrische Auswertungen der Autoradiogramme der Proben zur Bestimmung der <i>Pinus-Lhc</i> -Transkriptstabilität in transgenen Tomatenpflanzen mit dem Konstrukt35S:: <i>Lhcb</i> ( <i>Pinus contorta</i> )	100
Abb. 3.38	Densitometrische Auswertungen der Autoradiogramme des Wildtyps und der Kontrollproben in den Stabilitätsversuchen	103
Abb. 3.39	Sequenzvergleich zwischen der <i>Lhcb</i> mRNA aus <i>Pinus contorta</i> und der <i>Lhc1*2</i> ( <i>cab1b</i> ) mRNA aus Tomate	105
Abb. 3.40	Kalkulierte Sekundärstrukturen der <i>Lhcb</i> mRNA aus <i>Pinus contorta</i> und der <i>Lhc1*2</i> ( <i>cab1B</i> ) mRNA aus Tomate	107
Abb. 3.41	Blattbewegungen von 6 Gymnospermen- und 2 Angiospermenarten im Dauerlicht	109
Abb. 3.42	Stomatäre Leitfähigkeit bei <i>Ginkgo biloba</i> und <i>Nicotiana tabacum</i>	111
Abb. 3.43	EM-Aufnahmen der Stomata von <i>Ginkgo biloba</i> und <i>Nicotiana tabacum</i> im Lichtdunkelwechsel	113
Abb. 3.44	EM-Aufnahmen der Stomata von <i>Ginkgo biloba</i> und <i>Nicotiana tabacum</i> im Dauerlicht	114
Abb. 4.1	Modellrechnung zur Bestimmung der Konzentration	133

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Taxonomie der Spermatophyta	1
Tabelle 2.1	Verwendete Pflanzen	9
Tabelle 2.2	Sonden, die radioaktiv mittels „Random-Priming“ markiert wurden	23
Tabelle 2.3	Oligonukleotid-Sonden	24
Tabelle 2.4	Sonden, die mittels PCR mit Dig-dUTP markiert wurden	25
Tabelle 2.5	In PCR-Reaktionen verwendete Oligonukleotide	38/39
Tabelle 2.6	Größe der PCR-Produkte bei verschiedenen Oligonukleotidkombinationen	39
Tabelle 3.1	cis-regulatorische Motive im <i>Lhcb</i> -Promotorbereich aus <i>Pinus contorta</i>	62
Tabelle 3.2	Übersicht über die Ergebnisse der Stabilitätsmessungen bei Bestimmung eines <i>Pinus contorta-Lhc</i> - und der Tomaten- <i>Lhc</i> -Transkripte in transgenen Tomaten	99
Tabelle 3.3	Ergebnisse des Vergleichs von 3-untranslatierten Regionen mit Hilfe einer Datenbank	104
Tabelle 4.1	Übersicht aller bisher bekannten Daten zur diurnalen/circadianen <i>Lhc</i> -Genexpression in Gymnospermen	116
Tabelle 4.2	Übersicht aller bisher bekannten Daten der <i>Lhc</i> -Transkripthalbwertszeiten in verschiedenen Organismen in Kombination mit den <i>Lhc</i> -Transkriptakkumulation im Tagesverlauf unter Licht-Dunkel-Bedingungen und der <i>Lhc</i> -Transkription	134
Tabelle 4.3	Übersicht aller bisher bekannten Daten zur Expression von Genen in Gymnospermen, die in Angiospermen diurnal/circadian reguliert sind mit Ausnahme der <i>Lhc</i> -Gene	138

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
AC	Accession number
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Grad Celsius
C	Cytosin
cab	Gene für Chlorophyll a/b-bindende Proteine
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie
cm	Centimeter
d-	Didesoxy-
DD	Dauerdunkel
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	1-4-Dithiothreitol
E	Einstein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (lat.: und andere)
g	Gramm
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde
K	Kelvin
<i>Lhc</i>	Gene der Chlorophyll a/b-bindenden Proteine
LHC	Lichtsammelkomplex
LL	Dauerlicht
ln	natürlicher Logarithmus
M	molar
ml	Milliliter
mRNA	Messenger-RNA
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysi
<i>psbA</i>	Gen für das Q <sub>B</sub> -bindende Protein
<i>rca</i>	Gen für die Ribulose 1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase-Aktivase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodezylsulfat
T	Thymin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
trna H	Transfer-RNA für Histidin
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
<i>uidA</i>	Gen für die $\beta$ -Glucuronidase aus <i>E. coli</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
v	Volumen
V	Volt
vgl.	vergleiche
w	Gewicht
W	Watt
WT	Wildtyp



Bünning 1977). Im Gegensatz dazu werden tagesperiodische Schwankungen, die nicht unbedingt unter konstanten Umweltbedingungen weiter anhalten, als diurnale Oszillationen bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass die Präsenz einer inneren Uhr Vorteile mit sich bringt. So ist ein Organismus durch dieses innere Zeitmesssystem in der Lage, Geschehnisse zu antizipieren, was ihm entscheidende evolutionäre Selektionsvorteile bietet. Von Ouyang et al. (1998) wurden beispielsweise Cyanobakterienstämme mit veränderter Periodenlänge in Bezug auf die Expression eines Promotor-Reportergenkonstruktes gemischt und zusammen in einem Gefäß angezogen. Sie stellen fest, dass die Stämme dominierten, deren Periodenlänge der Tageslänge entsprach. Piechulla (1999) vermutete energetische Bedingungen wie z.B. Unterschiede der Ribonukleotidkonzentrationen im Tagesverlauf als Grund der Oszillationen der mRNA der *Lhc*-Gene in Angiospermen. Darüber hinaus sind nach Bünning (1977) Schwingungen bei der komplexen Zusammensetzung eines Organismus unvermeidbar: „Die Pflanze muss zur Anpassung an die Umwelt nur aus den verfügbaren Frequenzen selektionieren“ (Bünning, S.20).

In Angiospermen existieren zahlreiche circadian regulierte Phänomene. Dazu gehören beispielsweise: Stomata- und Blattbewegungen, die Gasaufnahme, der Wurzeldruck, die CO<sub>2</sub>-Produktion, das Öffnen der Blüten, die Duftstoffproduktion, das Wachstum von Stängel, Enzymaktivitäten und auch die Expression vieler Gene (Sweeney 1987). So wurde durch den Einsatz der Microarray-Technik beispielsweise von Harmer et al. (2000) ermittelt, dass in *Arabidopsis thaliana* etwa 6% von insgesamt 8000 untersuchten Genen solchen Schwankungen unterliegen. Die Proteine dieser 480 Gene erfüllen die verschiedensten Funktionen. Darunter fanden sich Photorezeptoren, photoprotektive Pigmente, Proteine zur Kältetoleranz und für die Zellelongation, Enzyme im Schwefel-, Zucker- und Stickstoffstoffwechsel sowie regulatorische Proteine. Eine circadiane Rhythmik konnte außer in Pflanzen auch in Tieren, Pilzen und einigen Prokaryonten, wie z. B. Cyanobakterien beobachtet werden (zusammengefasst in: Millar und Kay 1991, Sweeney und Borgese 1989). Selbst in Zytoplasten, Acetabularia-Zellen mit fehlendem Kern, wurde eine solche innere Uhr detektiert (Mergenhagen und Schweiger 1975). In der Literatur wird davon ausgegangen, dass die Fähigkeit zur Zeitmessung mehrmals in verschiedenen Lebewesen entstanden ist (Golden 1998). Dies resultiert aus der Beobachtung, dass die Schlüsselproteine der inneren Uhr unterschiedlicher Organismen häufig keine Sequenzähnlichkeit zeigen. So konnten in dem Cyanobakterium *Synechococcus* keine Homologe von *per*, *tim*, *clock*, *bmal* oder *frq* ermittelt werden, von denen angenommen wird, dass sie an der circadianen Rhythmik verschiedener Eukaryoten beteiligt sind.

Um circadiane Rhythmen zu erklären, wurde neben anderen von Takahashi (1993) folgendes Modell vorgeschlagen. Danach enthalten alle circadianen Systeme drei Elemente:

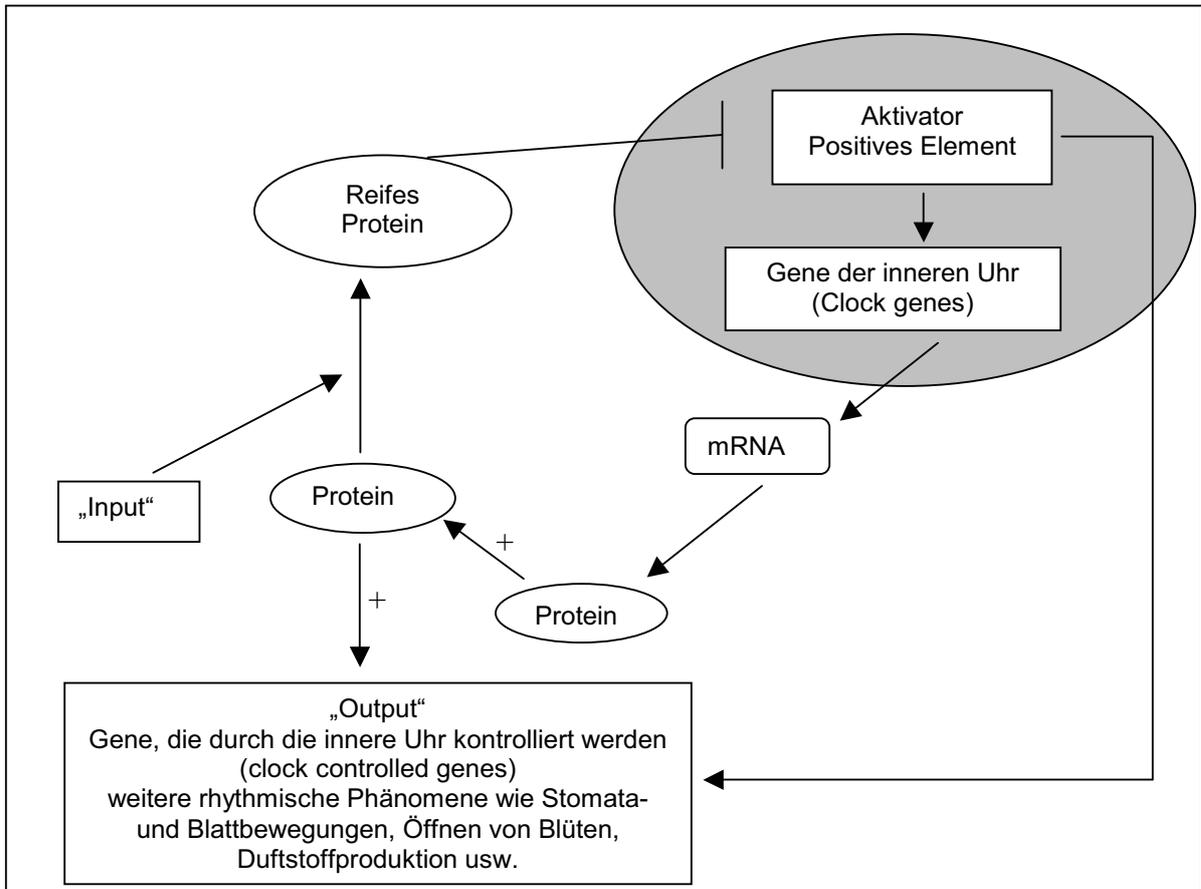
- a) einen oder mehrere „input pathway(s)“, auf denen Informationen aus der Umwelt in das System gelangen,
- b) einen oszillierenden Schrittmacher („circadian pacemaker“) und
- c) einen oder mehrere „output pathway(s)“, auf denen die Informationen des Schrittmachers in entsprechender Weise das System regulieren.

Die Identifizierung der einzelnen Elemente dieses Modells in einem Organismus ist problematisch, weil sie untereinander wechselwirken können und damit Rückkopplungen existieren. So ist der Oszillator beispielsweise in der Lage, die Sensitivität der „input pathways“ für äußere Reize wie z. B. Licht zu modulieren (Kay und Millar 1993, Meyer et al. 1989). Außerdem kann eine Rückkoppelung des „output pathways“ auf den Oszillator existieren (z.B. wirkt die Lokomotionsaktivität in Skorpionen auf den Oszillator, Mrosovsky 1988). Ferner konnte z. B. bei *Gonyaulax* die Existenz zweier Oszillatoren in einer Zelle gezeigt werden (Roenneberg und Morse 1993). Darüber hinaus wurden in einzelnen Zellen mehrzelliger Organismen mehrere circadiane Systeme mit voneinander unabhängigen Perioden detektiert (Shinohara et al. 1995).

In der Literatur wird davon ausgegangen, dass ein zentraler Oszillator aus folgenden Komponenten besteht (zusammengefasst in: Dunlap 1999): Es wird ein negativer Feedbackloop benötigt, d. h. es ist notwendig, dass ein Prozess existiert, der über eine Rückkopplungsschleife (Feedback) einen Einfluss auf die eigene Syntheserate ausübt („negatives Element“). Dabei muss die Ausführung dieses Feedbacks zeitlich verzögert erfolgen. Ferner ist ein „positives Element“ bzw. ein Aktivator erforderlich, der den Oszillator davon abhält zu stoppen.

Auf zellulärer Ebene wird ein solches Modell des Oszillators oft als Transkription-Translation-Schleife dargestellt (Abb. 1.2). Dabei fördert ein Aktivatorprotein („positives Element“) die Expression der Gene der inneren Uhr. Diese Gene werden transkribiert und die mRNA in das Zytoplasma befördert. Nach Translation und entsprechender Modifikation der Proteine wirken sie negativ auf den Aktivator („negative Elemente“). Licht oder andere Zeitgeber wirken im „Input pathway“ über Rezeptoren vermutlich auf diese „negativen Elemente“. Als Aktivatoren wurden bislang KaiA (japanisch für Zyklus) in *Synechococcus*, WC1 und WC2 (WHITE COLLAR 1, 2) in *Neurospora*, CLK (CLOCK) und CYC (CYCLE) in *Drosophila* und CLOCK und BMAL in Säugern beschrieben. Als negative Komponenten konnten KaiC in *Synechococcus*, FRQ (FREQUENCY) in *Neurospora*, PER (PERIOD) und

(TIM) TIMELESS in *Drosophila* und mPER1, mPER2, mPER3 (PERIOD 1, 2, 3) in Säugern identifiziert werden.



**Abb. 1.2 Modell der inneren Uhr in Eukaryoten, modifiziert nach Kondo und Ishiura 1999**  
Nähere Erläuterungen siehe Text.

Alternativ zu dem oben beschriebenen Modell formulierten Roenneberg und Merrow 1998 ein weiteres Konzept, bei dem auch der „input pathway“ eine Feedbackschleife beinhaltet. Aus diesen Überlegungen folgerten die Autoren, dass die Unterscheidung von Elementen, die im „Input pathway“ oder im zentralen Oszillator auftreten, mit den bislang verwendeten Kriterien sehr schwer ist. Bei der Bewertung von Versuchsergebnissen zu einem zentralen Oszillatorsystem sollte deshalb sehr sorgfältig vorgegangen werden.

Der molekulare Mechanismus der circadianen Uhr der Pflanzen ist bei *Arabidopsis thaliana* durch unterschiedliche Versuchsansätze untersucht worden. Durch Fusionen des *Lhcb1\*2(cab2)*-Promotors aus *Arabidopsis thaliana* mit dem Reporter gen Luciferin, die in *Arabidopsis thaliana* transferiert wurden, konnten mit Hilfe eines Bildanalyse-Systems Mutanten mit veränderter Periodenlänge identifiziert werden. Außerdem wurde die photoperiodische Kontrolle des Blühens von *Arabidopsis* analysiert. Aus beiden Versuchsansätzen resultierten zahlreiche Mutanten, aus denen in fortführenden Experimenten diverse Proteine isoliert werden konnten wie z. B. die ATPP1/ TOC1 Familie (TOC = timing

of CAB), CCA1 (circadian clock associated), FKF1, GI (GIGANTEA), LHY (late elongated hypocotyl) oder ZTL (Zeitlupe) (Fowler et al. 1999, Makino et al. 2000, Nelson et al. 2000, Park et al. 1999, Schaffer et al. 1998, Somers et al. 1998, Somers et al. 2000, Strayer et al. 2000, Wang und Tobin 1998). Alle diese Proteine sind unmittelbar oder mittelbar an der circadianen Uhr und/oder der Regulation der Photomorphogenese in *Arabidopsis* beteiligt. Den neuesten Untersuchungen zufolge (Alabadi et al. 2001) stellen CCA1, LHY und TOC1 zentrale Komponenten des Oszillators in *Arabidopsis* dar. CCA1 und LHY wirken dabei als positive Elemente, TOC1 fungiert als negatives Element.

### 1.3 Der LHC-Komplex in Pflanzen

Alle photosynthetisch aktiven eukaryotischen Zellen verfügen über Chloroplasten. In den Thylakoidmembranen dieser Organellen sind zwei Photosysteme lokalisiert (Photosystem I, Photosystem II), die gemeinsam für die Ladungstrennung und den Elektronentransfer bei der Photosynthese sorgen und somit die Bereitstellung von ATP und NADPH ermöglichen. Jedes der Photosysteme besteht aus einem Antennensystem (LHC, „light-harvesting-complex“) und einem inneren Enzymkomplex („core component“), in dem das Reaktionszentrum enthalten ist (zusammengefasst in: Nechushtai et al. 1995). Die LHC-Komplexe enthalten Proteine, die Chlorophyll a und Chlorophyll b nicht-kovalent binden, während in den inneren Komplexen ausschließlich Chlorophyll a zu finden ist. Die Gene, die für die LHC-Komplexe der Photosysteme kodieren, befinden sich im Zellkern und werden nach Jansson et al. (1994) als *Lhc a-* bzw. *Lhc b*-Gene bezeichnet (frühere Bezeichnung: *cab*-Gene für Chlorophyll a/ b bindende Proteine). Diese Gene können nach Green et al. (1991) in verschiedene Typen eingeteilt werden. Ausschlaggebend sind dabei Unterschiede und Gemeinsamkeiten in Homologie und Genorganisation.

Ein diurnaler/circadianer Verlauf der Transkript-Mengen im Tagesverlauf konnte für 38 *Lhc*-Gene aus 23 verschiedenen Angiospermenarten gezeigt werden. Darunter befanden sich sowohl Monokotyledonen wie auch Dikotyledonen, sowie Sonnen- und Schattenpflanzen. Auch in Farnen, Algen und Moosen konnte bei 9 von 10 untersuchten Arten ein circadianer Rhythmus der *Lhc*-mRNA-Menge gezeigt werden (zusammengefasst in: Piechulla 1999). Allgemein lässt sich sagen, dass die Maxima der *Lhc*-mRNA-Gehalte um die Mittagszeit oder am Vormittag liegen (Meyer 1989). Die Amplitude dieser Schwingung kann verschieden stark ausgeprägt sein. So beträgt der Unterschied zwischen Maximum und Minimum bei Detektion des Gesamt-*Lhc*-Gehaltes in *Arabidopsis thaliana* das Dreifache, während bei

Weizen, Tabak oder Tomate ein zwanzig- bis fünfzigfacher Unterschied ermittelt werden konnte (Kay und Millar 1993). Die Transkriptionsexpression der *Lhc*-Gene in Angiospermen erfolgt gewebespezifisch in allen grünen Gewebeteilen einer Pflanze (Apel und Kloppstech 1978, Karlin-Neumann et al. 1988), kann durch Licht induziert werden (Tavladoraki et al. 1989, Wehmeyer et al. 1990, Reed et al. 1994, Millar et al. 1992, Nagy et al. 1993) und ist auch durch externe Reize wie z. B. Temperaturschwankungen beeinflussbar (Kreps und Simon 1997, Riesselmann und Piechulla 1990). Die Regulation erfolgt auf transkriptionaler Ebene. So konnte für Angiospermen durch Transkriptions-Run-On-Experimente gezeigt werden, dass die Synthese der *Lhc*-mRNA circadian reguliert ist (Millar und Kay 1991, Giuliano et al. 1988, Taylor 1989, Wehmeyer et al. 1990). Die circadiane Uhr beeinflusst darüber hinaus auch die Translation der *Lhc*-Transkripte. Von Riesselmann und Piechulla (1992) wurde gezeigt, dass neben schwankenden mRNA-Gehalten auch die die LHC-Proteinsynthese in der Angiosperme Tomate circadian reguliert ist.

## 1.4 Zielsetzungen

Vor Beginn der Arbeiten zu dieser Dissertation waren nur wenige Untersuchungen bekannt, die sich mit der diurnalen/circadianen Rhythmik in Gymnospermen befassen. Von Oberschmidt et al. (1995) und Jäschke (1996) wurde gezeigt, dass in den Gymnospermen *Abies alba*, *Ephedra campylopoda*, *Ginkgo biloba*, *Larix decidua*, *Picea abies*, *Pinus sylvestris*, *Taxus baccata* und *Welwitschia mirabilis* die Akkumulation der *Lhc*-mRNA-Gehalte nicht diurnal/circadian erfolgte. Als einziges rhythmisches Phänomen in Gymnospermen detektierten Clapham et al. (1997) eine annuelle Knospenbildung in *Picea abies*, die abhängig von der Photoperiode war. Folglich gab es nur wenige Indizien für die Existenz einer inneren Uhr in Gymnospermen. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit Parameter untersucht werden, von denen bekannt ist, dass sie in Angiospermen eine circadiane Rhythmik aufweisen, um über das Vorhandensein oder Fehlen einer inneren Uhr in Gymnospermen Hinweise zu erhalten. Darüber hinaus war die detaillierte Aufklärung der Regulationsebene der *Lhc*-Genexpression in Gymnospermen von besonderem Interesse, da gravierende Unterschiede in Bezug auf die *Lhc*-Transkriptakkumulationen im Tagesverlauf zwischen Gymnospermen und Angiospermen bestehen. Die diurnale/circadiane Regulation der *Lhc*-Expression in Gymnospermen könnte dabei auf der Transkriptionsebene oder auf der posttranskriptionalen Ebene geschehen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle im Folgenden beschriebenen Lösungen wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls durch 20minütiges Autoklavieren bei 120 °C und  $2 \times 10^5$  Pa sterilisiert. Lösungen mit thermolabilen Substanzen wurden sterilfiltriert (Filterausschlussgröße 0,2 µm). Jede angegebene Lösung ist eine wässrige Lösung, sofern keine andere Angabe erfolgt. Die eingesetzten Chemikalien des Reinheitsgrades p. a. wurden von Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Spezielle Reagenzien und Enzyme wurden erworben bei:

AGS, Heidelberg: Klenow-Fragment, Restriktionsenzyme, dNTPs  
 Amersham Buchler GmbH, Braunschweig: Hybond-N-Membran  
 Roche-Boehringer Mannheim GmbH, Penzberg: Nylonmembran  
 Gibco BRL, Eggenstein: synthetische Oligonukleotide, Desoxyribonuklease I (Amplification Grade)  
 MWG-Biotech, Ebersberg: synthetische Oligonukleotide  
 Hartmann Analytik, Braunschweig:  $\alpha$ - $^{32}$ PdCTP,  $\gamma$ - $^{32}$ PdCTP markierte Oligonukleotide  
 Messer, Griesheim: flüssiger Stickstoff  
 Promega, Mannheim: AMV-Reverse Transkriptase  
 Sigma, Deisenhofen: Actinomycin D, Desoxyribonuklease I (Amplification Grade), Naphtylelessigsäure (NAA)  
 Duchefa, Niederlande: Zeatin, 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (2,4-D), Kinetin, Plant Agar  
 SmithKline Beecham Pharma GmbH, München: Betabactyl

#### 2.1.2 Mikroorganismen

*E. coli*:

DH5 $\alpha$  F $^-$ ,  $\Phi$ 80dlacZ  $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF), U169, endA1, recA1, hsdR17, ( $r_k^-$ -  $m_k^+$ ), deoR, thi-1, supE44,  $\lambda^-$ , gyrA96, relA1 (Hanahan 1983)  
 XL1-Blue MRF'  $\Delta$ (mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44, thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI $^q$  $\Delta$ M15 Tn10 (tet $^r$ )] (Stratagene)

*A. tumefaciens*:

C58C1 mit Helferplasmid pGV 2260 (Mc Bride und Summerfeld 1990)

### 2.1.3 Pflanzen

<b>Pflanzenart</b>	<b>Standort bzw. Bezugsquelle für Saat</b>
<i>Araucaria angustifolia</i>	Anzucht aus Samen im Gewächshaus der Universität Tübingen
<i>Araucaria heterophylla</i>	Zimmerpflanze, Abteilung Biochemie, Universität Rostock
<i>Ginkgo biloba</i>	Carter Seeds, 475 Mar Vista Drive, Vista, California, USA
<i>Gnetum gnemon</i>	Gewächshaus, Doberaner Str.143, Universität Rostock
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. VFNT LA 1221, cherry-line	Saatgut aus Bestand, Abteilung Biochemie, Universität Rostock
<i>Lycopersicon esculentum</i> , var. Moneymaker	Firma Treppens, Berliner Str., Berlin-Zehlendorf
<i>Nicotiana sylvestris</i> L.	Saatgut aus Bestand, Abteilung Biochemie, Universität Rostock
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Saatgut aus Bestand, Abteilung Biochemie, Universität Rostock
<i>Picea abies</i> L.	Niedersächsisches Forstamt, Forstweg 5, 29633 Munster-Oerrel
<i>Pinus contorta</i> L.	Fa. Appel, Forst- und Gehölzsamen, Neckartalstr. 151, 64743 Beerfelden
<i>Pinus sylvestris</i> L.	Niedersächsisches Forstamt, Forstweg 5, 29633 Munster-Oerrel
transgene Tomatenpflanzen (Moneymaker) mit dem Konstrukt 35S-Promotor:: <i>Pinus contorta</i> <i>Lhcb</i>	Herstellung der Pflanzen vgl. 2.2.9.3
transgene <i>Picea abies</i> -Pflanzen mit dem Konstrukt <i>Lycopersicon esculentum</i> $\Delta$ 251- <i>Lhc4*1</i> -Promotor:: <i>uidA</i> :: <i>nos</i>	Herstellung der Pflanzen vgl. 2.2.9.4
transgene Tabakpflanzen mit dem Konstrukt 1,1 kb <i>Pinus contorta</i> <i>Lhcb</i> -Promotor:: <i>uidA</i> :: <i>nos</i>	F0-Generation, Saatgut aus Bestand, Abteilung Biochemie, Universität Rostock Herstellung der Pflanzen vgl. Jäschke 1996

**Tabelle 2.1** Verwendete Pflanzen

### 2.1.4 Plasmide

pGEM-T: Klonierungsvektor mit 3'-Thymidin-Overhang zur schnellen und effizienten Klonierung von PCR-Produkten von Taq-Polymerasen (Promega, Mannheim)

pBI121: Pflanzentransformationsvektor, vermittelt Kanamycinresistenz in Pflanzen, *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens* (Clontech)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bakterien- und Pflanzenanzucht

#### 2.2.1.1 Anzucht von *E.coli* und *Agrobacterium tumefaciens* (nach Sambrook et al. 1989)

##### LB-Medium:

1 % (w/ v) Trypton; 0,5 % (w/ v) Hefeextrakt; 1 % (w/ v) NaCl  
zur Herstellung von Agarplatten Zugabe von 1,5 % (w/ v) Agar  
autoklavieren

##### YEB-Medium:

0,5 % (w/ v) Rinderextrakt; 0,1 % (w/ v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/ v) Pepton; 0,5 % (w/ v) Saccharose; 2 mM MgSO<sub>4</sub>  
zur Herstellung von Agarplatten Zugabe von 1,5 % (w/ v) Agar  
autoklavieren

##### Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin: 50 mg/ ml  
Kanamycin: 12,5 mg/ ml  
Rifampicillin: 50 mg/ ml (in DMSO)  
sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

*Agrobacterium tumefaciens* und *E. coli* wurden unter folgenden Kulturbedingungen auf LB- bzw. YEB-Platten oder schüttelnd bei 200 rpm angezogen:

Organismus	Anzuchttemperatur	Medium
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28°C	YEB-Medium mit Antibiotika
<i>E.coli</i>	37°C	LB-Medium mit Antibiotika

#### 2.2.1.2 Anzucht von *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana sylvestris*

Die Samen von *Lycopersicon esculentum* Mill., var. VFNT LA 1221 und Moneymaker, *Nicotiana sylvestris* und *Nicotiana tabacum* wurden auf Vermiculite ausgesät, mit Hoagland-Nährlösung bewässert, nach Erscheinen der Primärblätter in mit Vermiculite gefüllten Kunststofföpfen vereinzelt und bei 25°C, 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , 4-20 Uhr Lichtphase weiter herangezogen. Wichen die Licht- und/oder Temperaturbedingungen von den angegebenen Werten ab, so wird darauf im Ergebnisteil näher eingegangen.

##### Hoagland-Nährlösung:

180 ml 1M KNO<sub>3</sub>-Lösung; 120 ml 1M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösung; 60 ml 1M MgSO<sub>4</sub>-Lösung; 36 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung; 36 ml NaFeEDTA; 36 ml Spurenelemente-Lösung  
ad 60 l mit (Leitungs-)Wasser

**Spurenelemente-Lösung:**

2,86 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 1,5 g  $\text{MnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 80 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; 220 mg  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 29 mg  $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
ad 1l mit (Leitungs-)wasser

**FeNa-EDTA Lösung:**

35,9 g  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ; 17 g Na-EDTA  
ad 1l mit (Leitungs-)wasser; pH 8,0 einstellen

**2.2.1.3 Anzucht von *Pinus sylvestris*, *Pinus contorta* und *Picea abies***

Samen von *Pinus sylvestris*, *Pinus contorta* und *Picea abies* wurden durch eine Lagerung (als Gemisch mit Sand) 14 Tage bei 4°C stratifiziert. Danach wurden sie auf Erde in Tontöpfen mit möglichst großer Fläche ausgesät, um gegebenenfalls pilzinfilzierte Pflanzen entfernen zu können. Die Anzucht erfolgte bei maximal 25°C in den Versuchsgewächshäusern (Doberaner Str.143, Universität Rostock). Im Sommer wurden die natürlichen Lichtverhältnisse beibehalten, im Winter eine Zusatzbeleuchtung (Assimilationsleuchten, 400W, Fa. Visser) zugeschaltet. Für die Ernte wurden die Pflanzen in eine Klimakammer überführt und mindestens 5 Tage an die veränderten Verhältnisse (vgl. Ergebnisteil) adaptiert.

**2.2.1.4 Anzucht von *Ginkgo biloba***

Die Samen von *Ginkgo biloba* wurden mit Hilfe von Schleifpapier an einer Stelle der Samenschale etwas angeraut und auf feuchte Erde (3 Teile Torf: 1Teil Kies: 1 Teil Vermiculite) gelegt. Es war dabei darauf zu achten, frische Samen zu nehmen (Ernte September/November), da gelagerte Samen schnell ihre Keimfähigkeit verlieren. Nach 3-5 Wochen wurden die Keimlinge vereinzelt und im Gewächshaus unter natürlichen Licht- und Temperaturverhältnissen weiter angezogen. Zur Überwinterung blieben die Pflanzen im Gewächshaus oder wurden ins Freiland transferiert.

**2.2.1.5 Anzucht von *Pinus sylvestris*, *Lycopersicon esculentum* Moneymaker und *Nicotiana tabacum* in Sterilkultur**

Alle Samen wurden durch folgende Behandlung oberflächensterilisiert:

10 min 70 % Ethanol

5-20 min 5 %ige Calciumhypochlorit-Lösung (je nach Größe der verwendeten Samen)

gründliches Spülen mit destilliertem, autoklaviertem Wasser

und anschließend auf 2MS-Medium (vgl. 2.2.9.3) (*Lycopersicon esculentum* Moneymaker/*Nicotiana tabacum*) bzw. 1/3MS (vgl. 2.2.9.3) (*Pinus sylvestris*) ausgelegt.

Um die Samen von *Pinus sylvestris* zu stratifizieren, wurden sie im Anschluss in den Weckgläsern 21 Tage bei 4°C gelagert. Die Anzucht erfolgte in einer Klimakammer (20°C konstant, 75-90  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , 6-20 Uhr Lichtphase).

## 2.2.2 RNA-Isolierungsmethoden

Da bei RNA-Extraktionen die Freisetzung von zelleigenen RNasen stets eine Gefahr darstellt, wurde bei den nachfolgend beschriebenen Extraktionen darauf geachtet, zügig und bei niedriger Temperatur (Lagerung auf Eis) zu arbeiten. Das Gelelektrophoresezubehör wurde vor Benutzung mit 0,1 % SDS-Lösung behandelt, um mögliche RNase-Kontaminationen zu beseitigen. Im Anschluss an die RNA-Isolierung wurde die Konzentration wie unter 2.2.4 beschrieben bestimmt. Die Lagerung aller RNA-Lösungen erfolgte bei -20 °C.

### 2.2.2.1 RNA-Isolierung (CsCl-Methode) aus *Lycopersicon esculentum* (nach Sambrook et al. 1989)

#### 3 M Natrium-Acetat-Lösung

#### 5 M Natrium-Chlorid-Lösung

##### CsCl-Puffer:

5,7 M CsCl; 50 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA (Na<sub>2</sub>-Salz); 5 mM Natriumacetat;  
pH 8,0; autoklavieren; kann länger bei RT gelagert werden

##### GTC-Puffer:

4 M Guanidiniumisothiocyanat; 25 mM Na<sub>3</sub>-Citrat; 0,5 % (w/v) Laurylsarkosinat  
pH 7,0; sterilfiltrieren  
Lagerung bei 4°C  
direkt vor Gebrauch: 1 %  $\beta$ -Mercapthoethanol zugeben

#### 1 M Essigsäure

Mit Hilfe dieser Methode ließ sich RNA aus *Lycopersicon esculentum* gewinnen. In einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser wurde das Blattmaterial fein zerrieben und 25 ml GTC-Puffer wurden hinzugefügt. Die so erhaltene Suspension wurde zur vollständigen Lyse der Zellen 2 h auf einem Schüttler bewegt. Danach erfolgte zur Pelletierung der Zelltrümmer eine 20 minütige Zentrifugation bei 6000 g, 20°C. Die zuvor autoklavierten Polyallomerröhrchen wurden ca. 1/3 mit CsCl-Puffer gefüllt, und der Überstand vorsichtig auf dieses CsCl-Kissen geschichtet. Im Anschluss wurde eine Zentrifugation bei 100000 g (16 h) durchgeführt. Das so erhaltene Pellet wurde mit 100  $\mu\text{l}$  3 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,8)

gewaschen und durch Zugabe von 750 µl GTC-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Lösung in ein Eppendorfgefäß überführt, mindestens eine Stunde bewegt und anschließend zentrifugiert (9000 g, 5 min, Eppendorf Tischzentrifuge, 12000 Upm). Der klare Überstand wurde abgenommen, und die RNA wurde unter Zugabe von 1/50 Volumen 1 M Essigsäure und 1/25 5 M NaCl-Lösung sowie 3 Volumen Ethanol (96 %, unvergällt) über Nacht bei -20°C gefällt. Nach einer Zentrifugation (15 min, 12000 Upm, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde der Überstand vorsichtig entfernt, das weiße Pellet 15 min an der Luft getrocknet und in 300-600 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **2.2.2.2 RNA-Extraktion nach der CTAB-Methode aus Gymnospermen (Chang et al. 1993)**

##### **Extraktionspuffer:**

2 % (w/ v) CTAB; 2 % (w/ v) PVP; 100 mM Tris pH 8,0; 25 mM EDTA; 2M NaCl pH 8,0; autoklavieren  
vor Gebrauch 2 % (w/ v) Mercaptoethanol zugeben

##### **SSTE:**

1M NaCl; 0,5 % (w/ v) SDS; 10 mM Tris; 1 mM EDTA  
pH 8,0; autoklavieren

##### **Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1)**

##### **10 M LiCl**

Mit Hilfe dieser Methode ließ sich RNA aus verschiedenen Pflanzenarten mit hohem phenolischen Anteilen isolieren. Dazu gehörten *Ginkgo biloba*, *Pinus sylvestris*, *Pinus contorta* und *Picea abies*.

2-3 g Blattmaterial wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach Zusatz von 15 ml des auf 65°C erwärmten Extraktionspuffer erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 65°C. Um Proteine abzutrennen, wurde der Überstand nach einer Zentrifugation (4000-6000 rpm, 10 min, RT) mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und erneut bei 4000-6000 rpm, 10 min, RT zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt, um eine möglichst gute Separation der Proteine zu gewährleisten. Um die RNA von der DNA zu trennen, wurde der Überstand im Anschluss mit ¼ Volumen 10M LiCl versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch eine Zentrifugation (13000 rpm, 45 min, 4°C) wurde die RNA pelletiert und in 200-500 µl SSTE-Puffer gelöst. Um weitere Proteine abzutrennen, erfolgte ein weiteres Ausschütteln mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (Zentrifugationsschritt wie oben). Der Überstand wurde mit einem Volumen Isopropanol

gefällt (-20°C, über Nacht oder -70°C mindestens 2 h), das RNA-Pellet durch eine Zentrifugation (13000 rpm, 45 min, 4°C) erhalten, 15 min bei RT getrocknet und in Wasser gelöst.

### **2.2.2.3 RNA-Extraktion-LiCl-Methode (nach Piechulla et al. 1996)**

Mit Hilfe dieser Methode wurde für diese Arbeit RNA aus folgenden Pflanzen isoliert: *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* *Nicotiana sylvestris* und *Gnetum gnemon*.

#### **5xRP-Puffer**

1,75 M Sorbitol; 250 mM Tris-HCl pH 8; 125 mM EDTA; 10 mM DTT; 5 µg/ml Polyvinylpyrrolidon; 25 mM Aurintricarbonsäure  
sterilfiltrieren  
vor Gebrauch 2 % (w/v) β-Mercaptoethanol zugeben

#### **CLB-Puffer (chloroplast lysis buffer)**

5 % N-Laurylsarkosin; 50 mM Tris-HCl; 25 mM EDTA  
autoklavieren

#### **Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)**

#### **5 M Ammoniumacetat-Lösung**

#### **TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA  
pH 7,5; autoklavieren

#### **10M LiCl**

1-3 g Blattmaterial wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff und 1 ml 1 x RP-Puffer in einem vorgekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Nach dem Auftauen wurden 100µl CLB-Puffer zugegeben und die Suspension mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt, um Proteine abzutrennen. Die obere Phase wurde abgenommen und dieser Extraktionsschritt zweimal wiederholt. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei -20 °C unter Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 5 M Ammoniumacetat-Lösung. Durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 4°C (12000 Upm, Eppendorftischzentrifuge) wurde die RNA pelletiert und in 200 µl TE-Puffer; pH 7,5; resuspendiert. Danach wurde mit 1/4 Volumen 10M LiCl über Nacht bei 4°C gefällt. Durch eine 30minütige Zentrifugation (13000 Upm, 4 °C) wurde die RNA präzipitiert

und anschließend einige Minuten an der Luft getrocknet und in 50-100 µl Wasser aufgenommen.

#### **2.2.2.4 RNA-Extraktion Qiagen-Kit RNeasy**

Konnte nur wenig Blattmaterial (weniger als 1 g) geerntet werden, so wurde die RNA nach Herstellerangaben mit dem RNA-Extraktion-Qiagen-Kit RNeasy isoliert. Diese Methode ist gut geeignet für *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* und bedingt auch für *Picea abies* und *Taxus baccata*. Bei *Picea abies* und *Taxus baccata* ergaben sich geringere Ausbeuten und leichte Kontaminationen mit Polysacchariden.

### **2.2.3 DNA-Isolierungsmethoden**

#### **2.2.3.1 DNA-Isolierung aus *Pinus contorta***

Um DNA aus *Pinus contorta* zu erhalten, wurde der NukleoSpin Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben verwendet. Diese DNA ist für PCR-Analysen gut geeignet. Mit *Ginkgo biloba*-Blattmaterial konnte mit Hilfe dieser Methode keine DNA isoliert werden.

#### **2.2.3.2 DNA-Isolierung aus *Lycopersicon esculentum***

Für die Isolierung von DNA aus *Lycopersicon esculentum* wurde der High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese DNA ist für PCR-Analysen ausreichend. Für die in dieser Arbeit verwendeten Gymnospermen konnte mit Hilfe dieser Methode keine DNA isoliert werden.

#### **2.2.3.3 Isolierung von genomischer DNA als zweites Produkt bei der RNA-Isolierung**

Soll RNA aus Pflanzen isoliert werden, die viele Polysaccharide und andere Sekundärstoffe enthalten, so lässt sich dafür die Methode nach Chang et al. (1993) anwenden. Während dieses Verfahrens trennt man durch eine Fällung mit LiCl die DNA (im Überstand gelöst) von der RNA (Pellet). Aus diesem Überstand konnte durch Verdünnen mit einem Volumen Wasser und anschließender Zugabe von einem Volumen Isopropanol, Inkubation (-20°C, über Nacht oder -70°C mindestens 2 h) und Zentrifugation (13000 rpm, 45 min, 4°C) die genomische DNA pelletiert und im Anschluss in Wasser gelöst werden.

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte genomische DNA aus *Pinus sylvestris*, *Pinus contorta* und *Picea abies* isoliert werden, nicht aber aus *Ginkgo biloba*.

#### **2.2.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli***

##### **Lösung I:**

50 mM Tris; 50 mM EDTA; 20 % (w/ v) Saccharose  
pH 8,0; autoklavieren

##### **Lösung II:**

0,2 M NaOH; 1 % (w/ v) SDS  
autoklavieren

##### **Lösung III:**

3 M NaAc  
pH 4,8; autoklavieren

##### **TE-Puffer:**

10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA  
pH 7,5; autoklavieren

5 ml LB-Medium mit Antibiotika wurden mit Zellen einer Einzelkolonie von *E.coli* angeimpft, und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 2 ml von der so erhaltenen Kultur wurden abzentrifugiert (30 sec, RT, 13000 rpm), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 150 µl Lösung I aufgenommen. Zur alkalischen Lyse wurden 300 µl Lösung II zugegeben, gründlich durchmischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine Neutralisationsreaktion durch Zugabe von 230 µl Lösung III und eine Inkubation von 20 min auf Eis. Nach einer Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, RT) wurde der Überstand abgenommen und die DNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol 5 min bei RT gefällt. Nach 20minütiger Zentrifugation (13000 rpm, RT) wurde das Pellet mit 70 % Ethanol (unvergällt) gewaschen, an der Luft getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### **2.2.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit Hilfe des DNA-Plasmid-Qiagen Kits**

Für Sequenzierreaktionen und Klonierungsansätze wurde die Plasmid-DNA aus *E. coli* (Anzucht 2.2.1.1) nach Herstellerangaben mit dem DNA-Plasmid-Qiagen-Kit isoliert.

## 2.2.4 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der nukleinsäurehaltigen Lösungen erfolgte photometrisch. Dazu wurde jeweils die Extinktion vor und nach Zugabe von DNA- bzw. RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei gelten folgende Werte:

- für RNA: 1 OD (260 nm) = 42 µg/ ml
- für DNA: 1 OD (260 nm) = 50 µg/ ml

## 2.2.5 Horizontale Gelelektrophorese

### 2.2.5.1 Überprüfung der Intaktheit der RNA durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese

#### **Running Buffer (10 x) pH 7,0:**

5 mM Natriumacetat; 0,5 mM EDTA; 20 mM MOPS  
pH 7,0; autoklavieren

#### **RNA-Farbmix:**

500 µl Formamid deionisiert; 100 µl RB-Puffer (10 x); 175 µl Formaldehyd; 10 µl Ethidiumbromid-Lösung (5 mg/ ml); 25 µl DNA-Farbmix

Die isolierte RNA wurde in einem einprozentigen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, um die Intaktheit zu überprüfen. Dazu wurde 1 g Agarose mit 10 ml RB-Puffer (10 x) und 72 ml Wasser versetzt und durch kurzes Aufkochen in einem Mikrowellenofen in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 18 ml Formaldehyd und gründlichem Durchmischen wurde das Gel in eine Gelkammer gegossen und mit 1 x RB als Laufpuffer überschichtet. Je 3-5 µg RNA wurden mit Wasser auf ein Volumen von 10 µl verdünnt und mit 15 µl RNA-Farbmix versetzt. Die Proben wurden 15 min bei 65 °C denaturiert, 2 min auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70-120 V für 1-2 Stunden. Durch Bestrahlung mit UV-Licht konnte nun das Bandenmuster intakter RNA sichtbar gemacht und im Anschluss dokumentiert werden (Geldokumentationanlage, MWG).

### 2.2.5.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese

#### **10x DNA-Farbmix:**

100 mM EDTA; pH 8,0; 50 % (w/w) Glycerin; 0,25 % (w/ v) Bromphenolblau;  
0,25 % (w/ v) Xylencyanol

**50x TAE-Puffer:**

242 g Tris  
57,1 ml Eisessig  
100 ml EDTA 0,5 M  
ad 1000 ml pH 8,0

Mit der Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente anhand der unterschiedlichen Größe -und somit verändertem Laufverhalten auf dem Gel- voneinander getrennt und unter UV-Licht durch eine Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Dazu wurden 1-2 % Agarose mit 1 x TAE Puffer versetzt und durch kurzes Aufkochen in einem Mikrowellenofen in Lösung gebracht. Nach kurzem Abkühlen und Zugabe von Ethidiumbromidlösung (1 µg/ 10 ml Gelvolumen) wurde das Gel in die Gelkammer gegossen und mit 1 x TAE als Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 10x DNA-Stopp-Mix versehen und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70-120 V für 1-2 Stunden. Durch Bestrahlung mit UV-Licht konnte nun das Bandenmuster sichtbar gemacht und im Anschluss dokumentiert werden (Geldokumentationsanlage, MWG).

**2.2.6 Transfer von RNA auf Nylonmembranen****2.2.6.1 Transfer von RNA auf Nylonmembranen durch Kapillarkraft ("Northern Blot")****20 x SSC-Puffer:**

0,3 M Natriumcitrat pH 7,0; 3 M Natriumchlorid  
autoklavieren

Nach beendeter Elektrophorese (2.2.5.1) wurde das Agarosegel auf ein Stück Blottingpapier gelegt, dessen Enden in 20 x SSC-Puffer eintauchten. Die Ränder wurden mit Frischhaltefolie abgedeckt und die Fläche des Gels, auf dem die RNA enthalten war, mit Nylonfolie bedeckt. Darauf wurden 3 Lagen angefeuchtetes Blottingpapier und zusätzlich Haushaltspapier gelegt. Darüber hinaus wurde mit einem 1 kg-Gewicht beschwert. Das Blotting erfolgte über einen Zeitraum von 17-20 Stunden. Danach wurde die RNA durch Bestrahlen mit UV-Licht in einem UV-Crosslinker (Techne) kovalent an die Nylonmembran gebunden. Der Filter wurde in Haushaltsfolie eingewickelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **2.2.6.2 Transfer von RNA auf Nylonmembranen durch Unterdruck („Northern Blot“ durch einen Vakuumblotter)**

Um bei größeren Gelen (Probenanzahl größer als 15) einen möglichst guten und gleichmäßigen Übertrag der RNA auf die Nylonfolie zu erzielen, wurde der Vakuumblotter der Firma Hybaid verwendet. Dabei wurde auf den Blotter ein mit 2 x SSC angefeuchtetes Blottingpapier gelegt und darauf die auf Gelgröße zugeschnittene Membran. Die ganze Apparatur wurde mit einer Gummimatte abgedichtet, so dass sich das Gel durch eine Aussparung in der Gummimatte genau auf der Membran befand. Im Anschluss wurde ein leichter Unterdruck angelegt und so über Nacht geblottet. Um zu verhindern, dass das Gel austrocknete, wurde das Gel über Nacht mit Hilfe einer Pumpe mit 10 x SSC betropft. Danach wurde die RNA durch Bestrahlen mit UV-Licht in einem UV-Crosslinker (Techne) kovalent an die Nylonmembran gebunden. Der Filter wurde in Haushaltsfolie eingewickelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

## **2.2.7 Hybridisierungstechniken**

### **2.2.7.1 Herstellung von Lachsspermien-DNA als Blockingreagenz**

#### **TE-Puffer:**

10 mM Tris/ HCl; 1 mM EDTA pH 7,5; autoklavieren

#### **Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)**

#### **Chloroform**

#### **3M Natriumacetatlösung:**

pH 4,8; autoklavieren

#### **Ethanol (96 %, unvergällt)**

#### **Ethanol (70 %, unvergällt)**

250 mg Lachsspermien-DNA wurden in 25 ml TE über Nacht bei 4°C gerührt. Die entstehende Gallerte wurde durch eine 5minütige Ultraschallbehandlung weiter zerkleinert, dann mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und zentrifugiert (20°C, 5000 rpm, 5 min). Im Anschluss wurde der Ansatz mit 1 Volumen Chloroform versetzt, gut durchmischt und erneut zentrifugiert (20°C, 5000 rpm, 5 min). Aus der wässrigen (oberen) Phase wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M

Natriumacetatlösung (pH 4,8) und 3Volumen Ethanol (96 %, unvergällt) 5 min bei RT gefällt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, dann ca. 15 min bei RT getrocknet, in Wasser ausgenommen und im Anschluss einer Konzentrationsbestimmung (2.2.4) unterzogen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 2.2.7.2 Radioaktive Markierung der Sonde durch „Random Priming“

#### **OLB-Puffer (5 x):**

0,5 M Tris/ HCl pH 7,2; 100 mM Magnesiumchlorid; 50 mM DTT; 1 mg/ ml BSA (nukleasefrei); 1,25 mg/ ml Hexanukleotide

Der „Random-Priming“-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 100 ng DNA
- 6 µl OLB-Puffer (5 x)
- 3 µl dNTP-Lösung (dATP, dTTP, dGTP, je 0,2 mM)
- $\alpha$ -<sup>32</sup> PdCTP (15 µCi)
- 6 U Klenow-Fragment
- ad 30 µl mit autoklaviertem Wasser

Die DNA wurde mit Wasser 2 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert und danach 2 min auf Eis abgekühlt. Dann wurden 5 x OLB-Puffer, dNTP-Lösung und  $\alpha$ -<sup>32</sup> PdCTP hinzugefügt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe des Klenow-Fragments. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT inkubiert im Anschluss einer Einbaumessung (2.2.7.6) unterzogen.

### 2.2.7.3 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Die Kinase-Reaktion zur Oligonukleotid-Markierung wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

#### **Reaktionsansatz:**

- 2,5 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl Oligo-DNA (2 pmol)
- 1 µl 0,1M DTT
- 1 µl 10x Kinase-Puffer
- 1 µl T4 Polynukleotid-Kinase
- 1,5 µl  $\gamma$  (32P) ATP ( 15 µCi)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und im Anschluss einer Einbaumessung (2.2.7.6) unterzogen.

#### 2.2.7.4 Markierung der Sonde mit Dig-dUTP durch „Random Priming“

1-3 µg DNA wurden in 16 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, 10 min bei 95°C im Heizblock inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Zu dem Ansatz wurden 4 µl DIG high prime-Puffer (Roche, enthält Klenow-Enzym, Hexanukleotide, Nukleotide, Dig-dUTP und Reaktionspuffer) gegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 37°C und wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA pH 8,0 und/oder Erwärmung 10 min auf 65°C abgestoppt.

#### 2.2.7.5 Markierung der Sonde mit Dig-dUTP mittels PCR

Um eine Dig-markierte Sonde mittels PCR herzustellen, wurde folgender Ansatz gewählt:

5 µl High fidelity buffer (10 x PCR-Puffer aus High Fidelity Kit, Roche)  
4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
0,1-3 µl Template  
25 pmol sense-Oligonukleotid  
25 pmol antisense-Oligonukleotid  
1 µl Taq-Polymerase (2,5U)  
je 1 µl dATP; dCTP; dGTP (jeweils 10 mM)  
0,75 µl dTTP; 0,25 µl dUTP (Dig-markiert, alkalilabil, Roche)  
ad 50 µl mit Wasser

##### PCR-Programm:

80°C 5 min

93°C 5 min Denaturierung

30-40 Zyklen: 93°C 1 min Denaturierung

50-55°C 1 min Anlagerung der Oligonukleotide (Annealing)

72°C 1 min Elongation

72°C 10 min finale Elongation

4°C ∞

Parallel wurde als Kontrolle der gleiche Versuch unter Verwendung von dTTP (statt Dig-dUTP und dTTP) durchgeführt. Im Anschluss an die PCR wurde ein Aliquot auf ein Agarosegel aufgetragen. Es war dabei deutlich zu erkennen, dass sich das Dig-markierte PCR-Produkt im Gel aufgrund seiner größeren Masse langsamer bewegte. Anschließend wurde die ungefähre Einbaurrate wie unter 2.2.7.7 beschrieben ermittelt. Es ist dabei zu beachten, dass die während der PCR nicht eingebauten Dig-markierten dUTP-Moleküle sich im Reaktionsansatz befanden und nicht abgetrennt wurden. Da sie allerdings schlechter als das Dig-markierte PCR-Produkt an den Teststreifen (Roche) banden, wurden sie größtenteils

bei der Einbaumessung von dem Teststreifen abgewaschen, so dass der ermittelte Wert als Richtwert für die Stärke der Markierung dienen konnte.

#### **2.2.7.6 Bestimmung der eingebauten Menge an Radioaktivität in die DNA-Sonde**

##### **TE-Puffer:**

10 mM Tris/ HCl; 1 mM EDTA pH 7,5; autoklavieren

4 g Sephadex G50 (DNA-Grade, Pharmacia) wurden in 150 ml Wasser 1 h auf einem Heizrührer auf 70°C erhitzt, weitere 3 h quellen gelassen und danach autoklaviert. Das so erhaltene Säulenmaterial wurde zweimal mit autoklaviertem Wasser gewaschen und in TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Zur Bestimmung der Einbaurrate bei einer radioaktiven Markierung einer Sonde (vgl. 2.2.7.2 und 2.2.7.3) wurde eine Pasteurpipette mit silikonisierter Glaswolle abgedichtet und mit dem Säulenmaterial gefüllt. Nach dem Absetzen des Säulenmaterials wurde äquilibriert und anschließend der Markierungsansatz (zuvor auf 30 µl verdünnt mit TE-Puffer) auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit 10 x 300 µl TE-Puffer. Ein Aliquot jeder Fraktion wurde auf ein 1cm<sup>2</sup> großes Blottingpapier gegeben und die Cerenkov-Strahlung bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität wurden vereinigt und als DNA-Sonde bei den radioaktiven Hybridisierungen (2.2.7.8 und 2.2.7.9) verwendet.

#### **2.2.7.7 Bestimmung der eingebauten Menge an DIG-dUTP in die DNA Sonde**

1 µl des Markierungsansatzes (vgl. 2.2.7.4 und 2.2.7.5) wurde in unterschiedlichen wässrigen Verdünnungen auf einen Teststreifen der Firma Roche aufgetragen und durch 2minütiges Trocknen und/oder UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker, Techne) fixiert. Danach erfolgte durch eine Farbreaktion mit NBT/BCIP der immunologische Nachweis der mit Dig-dUTP markierten DNA nach Herstellerangaben.

#### **2.2.7.8 Hybridisierung mit radioaktiven Sonden, die über „Random priming“ markiert worden waren**

##### **Denhardts (50 x):**

1 % (w/ v) Ficoll 44; 1 % (w/ v) Polyvinylpyrrolidon; 1 % (w/ v) Rinderserumalbumin wässrige Lösung; sterilfiltrieren

##### **Prähybridisierungslösung:**

3 ml SSC (20 x); 0,6 ml Denhardts (50 x) ad 30 ml mit autoklaviertem Wasser

**Hybridisierungslösung:**

3 ml SSC (20 x); 0,6 ml Denhardts (50 x); 1,5 ml SDS (10 %) ad 30 ml mit autoklaviertem Wasser

Die vorbereiteten Filter (vgl. 2.2.6.1 und 2.2.6.2) wurden mit 30 ml Prähybridisierungslösung 1-2 h in einem Hybridisierungssofen inkubiert (100 µl pro cm<sup>2</sup> Filter). Die radioaktiv markierte Sonde (Tabelle 2.2) wurde 5 min auf 100 °C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde zu der vorgewärmten Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte innerhalb von 16 bis 20 h. Die jeweiligen Prähybridisierungs- bzw. Hybridisierungstemperaturen sind in Tabelle 2.2 angegeben. Dann wurden die Filter zweimal mit je 30 ml 2 x SSC und 30 ml 0,5 x SSC je 15 min gewaschen, um freie, nicht an den Filter gebundene Radioaktivität zu entfernen. Anschließend wurden die Filter in Haushaltsfolie eingeschweißt und mit Hilfe des Instant-Imagers (Canberra Packard, Software Programm: electronic autoradiography, version 2.01 1995, Packard Instrument Co.) ausgewertet.

Sonde, die über „Random-Priming“ markiert wurde	Quelle	Hybridisierungstemperatur
<i>Lhc1*2</i> (cab 1B)	0,55kb HincII/PvuII-Fragment des <i>Lhc1*2</i> -Gens aus <i>Lycopersicon esculentum</i> AC M14443	62-65°C
rRNA	18S/28S rDNA aus <i>Spinacea oleracea</i> 8,7kb HindIII-Fragment im Plasmid pBR322 (pHA2), Jørgensen et al. 1981	50°C
gs	PCR-Fragment aus kodierender Region von Glutaminsynthetasen aus <i>Pinus sylvestris</i> AC X69822, AC 74429	65°C
gus	2,0kb aus kodierender Region des β-Glucoronidase-Gens ( <i>uidA</i> ) aus <i>E. coli</i> AC CV1012T	60°C
<i>rca</i>	2,3kb EcoRI-Fragment des RuBisCO-Aktivase-Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Zhong et al. 1994	55°C
<i>psbA</i>	2,4kb PstI-Fragment des Gens des Q <sub>B</sub> -bindendes Proteins ( <i>psbA</i> ) aus <i>Nicotiana tabacum</i> AC AB 025940	60°C

**Tabelle 2.2 Sonden, die radioaktiv mittels „Random-Priming“ markiert wurden**

### 2.2.7.9 Hybridisierung mit radioaktiven Oligonukleotiden als Sonde

#### 5X P-Puffer

1 % (w/ v) BSA; 1 % (w/ v) PVP 40; 1 % (w/ v) Ficoll 400; 250 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,5% (w/ v) Na-Pyrophosphat; 5 % (w/ v) SDS  
Lagerung bei 4°C

#### Prähybridisierungslösung:

2 ml 5x P-Puffer; 0,8 ml 5 M NaCl; 0,1 ml 10 mg/ ml ssDNA (vor Zugabe 10 min auf 95°C erhitzen); ad 10 ml; sterilfiltrieren

#### Hybridisierungslösung:

2 ml 5x P-Puffer; 0,8 ml 5 M NaCl; 0,1 ml 10 mg/ ml ssDNA (vor Zugabe 10 min auf 95°C erhitzen); ad 10 ml; sterilfiltrieren

Die vorbereiteten Filter (vgl. 2.2.6.1 und 2.2.6.2) wurden mit 10 ml Prähybridisierungslösung 2 h bei 60°C in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Die radioaktiv markierte Oligonukleotidlösung (Tabelle 2.3, Aktivität: 0,1-0,2 MBq) wurde 5 min auf 100 °C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde zu der vorgewärmten Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60 °C. Dann wurden die Filter dreimal bei 50°C mit je 30 ml 0,1 % (w/ v) SDS; 2 x SSC und 30 ml 0,1 % (w/ v) SDS; 0,5x SSC je 15 min gewaschen, um freie, nicht an den Filter gebundene Radioaktivität zu entfernen. Danach wurden die Filter in Haushaltsfolie eingeschweißt und mit Hilfe des Instant-Imagers (Canberra Packard, Software Programm: electronic autoradiography, version 2.01 1995, Packard Instrument Co.) ausgewertet.

Oligonukleotid	Sequenz	Quelle
Pinus_cab	5'-gct ccg cct tgg cct cgg gct cgt cgg cga-3'	Abgeleitete, komplementäre Konsensussequenz aus <i>Lhc</i> - Genen aus <i>Pinus sylvestris</i> AC X14507 AC X14506 AC X14505
Ginkgo_cab	5'-tag tct ccc gga aat tct ccc gtc aga tat-3'	Abgeleitete, komplementäre Sequenz von <i>Lhc</i> aus <i>Ginkgo</i> <i>biloba</i> AC L23107
Pico_3UTR_2	5'-aag aga taa gcc agg ccc g- 3'	Abgeleitete, komplementäre Sequenz von <i>Lhc</i> aus <i>Pinus</i> <i>contorta</i> AC AJ 313013

Tabelle 2.3 Oligonukleotid-Sonden

### 2.2.7.10 Hybridisierung mit Dig-dUTP-markierten Sonden

Die Membran wurde mindestens 1 h in auf 68°C vorgewärmter Prähybridisierungslösung (20 ml pro 100 cm<sup>2</sup> Filterfläche) in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Die markierte DNA-Sonde (Tabelle 2.4, 20-50 ng/ ml) wurde 10 min bei 100°C denaturiert, dann 2 min auf Eis gelagert und zur Hybridisierungslösung (mindestens 2,5 ml pro 100 cm<sup>2</sup> Filterfläche) gegeben.

Die Prähybridisierungslösung wurde gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einem Hybridisierungssofen.

Im Anschluss wurde die Membran bei 68°C in je 25 ml Lösung wie folgt gewaschen:

-2 x 15 min: 2 x SSC, 0,1 % SDS

-2 x 15 min 0,5 x SSC; 0,1 % SDS

-2 x 15 min 0,1 x SSC; 0,1 % SDS

Dann erfolgte der immunologische Nachweis der mRNA bzw. rRNA.

(2.2.7.11)

Sonde	Quelle	Hybridisierungstemperatur
<i>Lhc1*2</i> (cab 1B)	0,55kb HincII/PvuII-Fragment des <i>Lhc1*2</i> (cab1B)-Gens aus <i>Lycopersicon esculentum</i> AC M14443	50°C
rRNA	308bp-PCR-Produkt aus der kodierenden Region der 18S-rRNA von <i>Lycopersicon esculentum</i> AC X51576.1	50°C

**Tabelle 2.4 Sonden, die mittels PCR mit Dig-dUTP markiert wurden**

### 2.2.7.11 Immunologischer Nachweis der mRNA bzw. rRNA

#### Maleinsäurepuffer:

0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl

mit festem NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren

#### 1x Blocking solution:

1 % Blocking reagent (w/v, Roche) in Maleinsäurepuffer

#### Antikörperlösung:

anti-DIG-AP-Konjugat (Fab fragments, Roche) 1:10000 verdünnt in Maleinsäurepuffer, Endkonzentration der alkalischen Phosphatase 75 mU/ ml

**Detektionspuffer:**

0,1 M Tris; 0,1 M NaCl  
pH 9,5; autoklavieren

**Waschpuffer:**

0,3 % (w/ v) Tween in Maleinsäurepuffer

**Färbelösung:**

CSPD (Roche) 1: 100 verdünnt in Detektionspuffer

Die Nylonmembran wurde bei Raumtemperatur 30-60 min in 25 ml 1x Blocking solution, dann 30-60 min in 15 ml Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurde 2x15 min mit 25 ml Waschpuffer gewaschen und die Membran nachfolgend 2-5 min in 20 ml Detektionspuffer äquilibriert. Danach wurde die Membran (mit der Seite, die dem Gel zugewandt war) auf eine Plastikfolie gelegt, und 600-1000 µl der Färbelösung wurden vorsichtig an einer Seite der Membran aufgetragen, dann die Plastikfolie zugeklappt und die Färbelösung gleichmäßig auf der Folie verstrichen. Nach einer 5minütigen Inkubation wurde die Chemilumineszenz, die bei diesem Verfahren proportional zur mRNA bzw. rRNA-Menge ist, mit Hilfe einer CCD-Kamera (Firma Raytest, LAS-1000, Software Programm: Image gauche) gemessen.

## 2.2.8 Klonierungstechniken

### 2.2.8.1 Plasmid-Restriktion

**10 x RNase-Stopp-Mix:**

80 µl DNA-Stopp-Mix

20 µl RNase 10 mg/ ml (zuvor 15 min 100°C, um DNasen zu zerstören)

Für die Restriktion von DNA aus Plasmid-Minipräparationen (2.2.3.4 und 2.2.3.5) wurde folgender Ansatz gewählt:

1-5µg Plasmid-DNA

2 µl 10 x Reaktionspuffer

3 U Restriktionsenzym

ad 20 µl mit Wasser

Die Proben wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, dann mit RNase-Stopp-Mix (Endkonzentration 1x) versetzt und auf einem DNA-Gel analysiert.

### **2.2.8.2 Gelaufreinigung von DNA mit QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen)**

DNA-Fragmente, die durch PCR oder auch Restriktion erhalten worden waren, wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben reisoliert.

### **2.2.8.3 Reinigung von PCR-Produkten**

DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben von den Nukleotiden, Oligonukleotiden und Salzen abgetrennt und in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.2.8.4 Ligation**

Die Ligation des gereinigten DNA-Fragments (2.2.8.3) mit einem zuvor geschnittenen Vektor (2.2.8.1) erfolgte mit T4-DNA-Ligase. Es wurde dabei ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert-DNA von 1:6 bis 1:3 gewählt. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des Rapid Ligation Kits (Roche) bzw. pGEM-T Vector systems Kits (Promega). Die Inkubationszeit betrug 30 min bis 20 h bei RT. Im Anschluss wurden chemokompetente *E. coli*-Zellen wie unter 2.2.9.2 beschrieben transformiert und auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert.

### **2.2.8.5 PCR auf Kolonien von *E. coli* oder *Agrobacterium tumefaciens***

Mit dieser Methode lässt sich schnell beurteilen, ob Klone von *E. coli* oder *Agrobacterium tumefaciens*, die nach einer Transformation auf einer Agarplatte (mit Antibiotika) gewachsen sind, auch tatsächlich das erwartete Plasmid enthalten oder z. B. nur durch eine Spontanmutation zu Wachstum auf Selektionsmedium fähig sind. Dazu wurden die intakten Zellen durch eine verlängerte Denaturierungsphase vor der PCR aufgeschlossen und im Anschluss ein Fragment von der Sequenz des klonierten Plasmids amplifiziert.

Von Kolonien von *Agrobacterium tumefaciens* bzw. *E. coli*, die auf entsprechendem selektivem Medium gewachsen waren, wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers Zellen in den vorbereiteten PCR-Mix gegeben und unmittelbar einer PCR unterzogen:

**PCR-Ansatz:**

5 µl High fidelity buffer (10x PCR-Puffer aus High fidelity Kit, Roche)  
4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
*E.coli*/*A. tumefaciens*- Zellen als Template  
25 pmol sense-Oligonukleotid  
25 pmol antisense-Oligonukleotid  
1 µl dNTP (10 mM)  
1 µl Taq-Polymerase  
ad 50 µl mit Wasser

**PCR-Programm:**

80°C 5 min  
93°C 10 min Denaturierung  
  
30 Zyklen: 93°C 1 min Denaturierung  
50-55°C 1 min Anlagerung der Oligonukleotide (Annealing)  
72°C 1 min Elongation  
  
72°C 10 min finale Elongation  
4°C ∞

**2.2.8.6 DNA-Sequenzierung****Long Run Buffer (10 x TBE):**

1,34 M Tris; 450 mM Borsäure; 25 mM EDTA  
pH 8,3-8,7 bei 50°C

**Long Ranger (FMC Bio Products, USA):**

50 % Acrylamid-Stammlösung

**Oligonukleotide für die Sequenzierung:****USP:**

5'GTA AAA CGA CGG CCA GT-3' (5'IRD-800 markiert)

**RSP:**

5'CAG GAA ACA GCT ATG ACC- 3'(5'IRD-800 markiert)

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (nach Sanger et al. 1977). Dazu wurde die PCR entsprechend einem Kit der Fa. Biozym (SequiTherm Excel II Long-Read DNA Sequencing Kits-LC) mit Infrarotfarbstoff-markierten Oligonukleotiden (IRD 800, MWG-Biotech) durchgeführt. Als Template wurde Plasmid-DNA eingesetzt, die mit dem QIAprep Miniprep Plasmid Kit isoliert worden war. Für den Gellauf wurden 6,5 % (w/ v)ige Harnstoffgele und als Laufpuffer 1 x TBE verwendet. Nach dem Gellauf und der automatischen Analyse mittels der LICOR-Software (DNA Sequencer 4200, MWG-Biotech) wurden Sequenzunsicherheiten überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert.

## 2.2.9 Transformationstechniken

### 2.2.9.1 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

#### Hepes-Puffer:

1 M Hepes

pH 7,5

#### Hepes-Glycerin-Puffer

Hepes-Puffer

10 % Glycerin

Verwendet wurde der Agrobakterienstamm *A. tumefaciens* C58C1 mit dem Helferplasmid pGV 2260.

Eine etwa 2 Tage bei 28°C auf YEB-Agar-Platten (Rif 50, Amp 50) gewachsene Einzelkolonie wurde zum Beimpfen von 15 ml YEB-Medium (zusätzlich 10 mM MgSO<sub>4</sub>, Rif 50, Amp 50) verwendet. Diese Übernachtskultur wurde zum Animpfen von 400 ml YEB-Hauptkultur (zusätzlich 10 mM MgSO<sub>4</sub>) eingesetzt. Nach 4-6 h Wachstum bei 28°C unter Schütteln war eine OD 600 von 0,1 bis 0,5 erreicht worden. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (4°C, 10 min, 10000 g). Das Pellet wurde in 100 ml eiskaltem Hepes-Puffer aufgenommen und erneut zentrifugiert (4°C, 10 min, 10000 g). Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem Hepes-Glycerin-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert (7500 g, 4°C, 10 min) und das so erhaltene Pellet in 800 µl eiskaltem Hepes-Glycerin-Puffer gelöst. Danach wurden die kompetenten *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen als 50 µl-Aliquots bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurden 50 µl elektrokompetente Agrobakterien-Zellen auf Eis aufgetaut, 1-2 µl Plasmid-DNA zugegeben und gut gemischt. Dann wurde die Suspension in eine vorgekühlte Elektrotransformations-Küvette transferiert und unter folgenden Parametern elektrotransformiert: 2,5kV; 25 µF; 200 Ohm; Puls von 5 msec Dauer (Elektroporator, Easyject, Equibio, Boughton, UK). Die Zellen wurden zu 1 ml des auf 28°C vorgewärmten YEB-Mediums (ohne Antibiotika) gegeben, 2 h bei 28°C schüttelnd inkubiert (200 rpm) und dann in verschiedenen Verdünnungen auf YEB-Medium (Km 100, Rif 50, Amp 50)-Agarplatten ausplattiert und 48 h bei 28°C inkubiert. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 28°C stellte sich ein Wachstum großer Kolonien ein. Um zu testen, ob sie auch tatsächlich das transformierte Plasmid enthalten, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt.

### 2.2.9.2 Herstellung und Transformation chemokompetenter *E.coli*-Zellen

**TFB-I:**

15 % (w/ v) Glycerin; 30 mM Kaliumacetat; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>

pH 5,8; sterilfiltrieren; Lagerung bei -20°C

**TFB-II:**

15 % (w/ v) Glycerin; 10 mM MOPS; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM RbCl

pH 7,0; sterilfiltrieren; Lagerung bei -20°C

**ψ-Medium:**

0,5 % (w/ v) Hefeextrakt; 2,0 % (w/ v) Trypton; 0,4 % (w/ v) MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O; 10 mM KCl pH 7,6; autoklavieren

4 ml ψ-Medium wurden mit einer *E.coli* Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) kultiviert. Mit 100 µl dieser ersten Vorkultur wurde 10 ml vorgewärmtes ψ-Medium angeimpft und bis zu einer OD 600 von 0,3 wachsen gelassen (Dauer ca. 3 h). Die Hauptkultur (100 ml ψ-Medium) wurde mit 5 ml der zweiten Vorkultur angeimpft, bis zu einer OD 600 von 0,5 wachsen gelassen (Dauer 3-4 h), auf Eis gekühlt und die Zellen 10 min pelletiert bei 4000 g und 0°C. Die Pellets wurden jeweils in 75 ml vorgekühltem TFB-I-Medium aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4000 g, 0°C) erfolgte die Aufnahme der Zellen in 2 ml vorgekühltem TFB-II-Medium. Die Lagerung der 100 µl-Aliquots erfolgte bei -70°C. Die Kompetenz der Zellen ließ sich mit der Transformationen von 1 bis 0,01 µg eines Plasmids hoher Kopienzahl testen.

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, dann Plasmid-DNA-Lösung zugegeben, gut durchmischt und die Suspension 20 min auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellen 90 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Der Ansatz wurde weitere 2 min auf Eis inkubiert, bevor er mit 400 µl vorgewärmten ψ-Medium 60 min bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) kultiviert wurde. Dann wurden verschiedene Verdünnungen der transformierten *E.coli*-Kultur auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Transformationsrate konnte nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C ermittelt werden.

### 2.2.9.3 Tomatentransformation mittels Agrobakterien (modifiziert nach Filatti et al. 1987)

#### *Lösungen für 2 MS-Medium (Murashige und Skoog 1962):*

**Lösung A:**

19 g/l KNO<sub>3</sub>; 16,5 g/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 5,8 g/l CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O  
autoklavieren; Lagerung bei 4°C

**Lösung B:**

1,7 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3,8 g/l MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O  
autoklavieren; Lagerung bei 4°C

**Lösung C:**

1,24 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 3,38 g/l MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O; 1,72 g/l ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O  
0,166 g/l KJ; 0,05 g/l NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O; 0,005 g CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O; 0,005 g CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O  
sterilfiltrieren; Lagerung bei 4°C

**Lösung D:**

7,46 g/l Na<sub>2</sub>EDTA; 5,57 g/l FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O  
sterilfiltrieren; lichtgeschützte Lagerung bei 4°C

**Lösung E:**

10 g/l Myo-Inosit  
sterilfiltrieren; Lagerung bei 4°C

**Lösung F:**

0,4 g/l Glycin; 0,1 g Nicotinsäure; 0,02 g Vitamin B1 Thiaminhydrochlorid; 0,1 g/l Vitamin B6 Pyridoxalhydrochlorid  
sterilfiltrieren; Lagerung bei 4°C

**2MS-Medium:**

Lösung A, B: 100 ml; Lösung C, D: 5 ml; Lösung E, F: 10 ml; 20 g Saccharose, 7 g Plant Agar

Saccharose und Wasser zusammen autoklavieren, Lösung A und B hinzufügen, nach Abkühlen auf ca. 40°C Lösung C, D, E, F zugeben

**1/3MS-Medium:**

Lösung A, B: 34 ml; Lösung C, D: 1,6 ml; Lösung E, F: 3,2 ml; 7,5 g Saccharose, 7 g Plant Agar

Saccharose und Wasser zusammen autoklavieren, Lösung A und B hinzufügen, nach Abkühlen auf ca. 40°C Lösung C, D, E, F zugeben

**10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung:**

autoklavieren

**Sproßinduktionsmedium:**

Lösung A, B: 100 ml; Lösung C, D: 5 ml; Lösung E, F: 10 ml; 30 g Saccharose, 35 mg Kanamycin, 250 mg Betabactyl, 1 mg Zeatin, 5 g Plant Agar, Wasser ad 1l

Saccharose und Wasser zusammen autoklavieren, Lösung A und B hinzufügen, nach Abkühlen auf ca. 40°C Lösung C, D, E, F, Kanamycin, Betabactyl, Zeatin zugeben

**Kallusinduktionsmedium:**

Lösung A, B: 100 ml; Lösung C, D: 5 ml; Lösung E, F: 10 ml; 30 g Saccharose, 1 mg 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure; 0,2 mg Kinetin; 5 g Plant Agar; Wasser ad 1 l  
Saccharose und Wasser zusammen autoklavieren; Lösung A und B hinzufügen; nach Abkühlen auf ca. 40°C Lösung C, D, E, F, 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure, Kinetin zugeben

**Bewurzelungsmedium:**

Lösung A, B: 50 ml; Lösung C, D: 2,5 ml; Lösung E, F: 5 ml; 30 g Saccharose, 4 g Plant Agar, 100 mg Naphtylelessigsäure, 10 mg Kanamycin, 125 mg Betabactyl  
Wasser ad 1 l  
Saccharose und Wasser zusammen autoklavieren, Lösung A und B hinzufügen, nach Abkühlen auf ca. 40°C Lösung C, D, E, F, Naphtylelessigsäure, Kanamycin, Betabactyl zugeben

Nach Oberflächensterilisation der Samen (2.2.1.5) wurden sie auf 2MS-Medium bei RT 10-14 Tage in Dunkelheit angezogen. Die etiolierten Kotyledonenblätter wurden in 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung von Blattspitze und Blattbasis befreit und auf Kallusinduktionsmedium (Blattunterseite nach oben) 2 Tage bei RT im Dunkeln inkubiert. 15 ml YEB-Medium mit Antibiotika wurden mit einer Einzelkolonie von *Agrobacterium tumefaciens* angeimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln (200 rpm) wachsen gelassen. Nach einer Zentrifugation (3750 rpm, 25 min, RT) wurde das Pellet in 10 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Schließlich wurden die Zellen in 10 ml MgSO<sub>4</sub>-Lösung resuspendiert.

Die Kotyledonen wurden 5 min in dieser Lösung gebadet und erneut auf Kallusinduktionsmedium gelegt und 2 Tage im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden sie auf Sproßinduktionsmedium gebracht und bei 25°C Percival-Schrank (90-150 µmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit) herangezogen. Alle 8-10 Tage wurden sie auf frisches Medium umgesetzt. Nach ca. 2 Monaten entwickelten sich aus den Kalli Sprosse, die dann auf Bewurzelungsmedium gebracht wurden (Achtung: Tomate bildet Fiederblätter, deshalb Spross und Blattstiel nicht verwechseln!). Nach weiteren 2-4 Wochen hatten die transgenen Pflanzen kräftige Wurzeln gebildet und konnten nun aus dem Weckglas in Vermiculite umgesetzt werden. Dazu wurde die Pflanze durch Abspülen vom Medium befreit und in feuchtes Vermiculite gesetzt (Anzucht wie unter 2.2.1.2 beschrieben). Um einen zu starken Turgorverlust der Pflanzen aufgrund der fehlenden Kutikula zu vermeiden, wurden sie mit einer Plastikhaube abgedeckt, die in den weiteren Tagen immer weiter gelüftet wurde. Die Pflanzen wurden zur Blüte gebracht, geselbstet und die Tomatensamen von dem Fruchtfleisch befreit und getrocknet.

## 2.2.10 GUS-Proteinaktivitätsassay

### 2.2.10.1 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

**Bradford-Reagenz** (Coomassie Blue, Ethanol, Phosphorsäure, Wasser; Biorad)

Zur Proteinbestimmung wurde ein Aliquot der Proteinprobe mit entsprechendem Probenpuffer auf ein Volumen von 100 µl gebracht und mit 700 µl Wasser versetzt. Im Anschluss wurde 200 µl Bradford-Reagenz zugegeben, und die Lösung gründlich durchmischt. Nach 5 min wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm des entstehenden Farbkomplexes ermittelt. Als Nullwert diente dabei eine Probe, die 100 µl Probenpuffer, 700 µl Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz enthielt. Um genaue Werte für den Proteingehalt zu bestimmen, war es nötig, eine Eichgerade zu erstellen. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen (1-6 µg/ ml) von Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

### 2.2.10.2 Fluorimetrische Messungen von GUS-Protein (nach Jefferson et al. 1987)

**Extraktionspuffer für *Picea*-Zellen:**

1 mM EDTA

0,1 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

10 % Glyzerin

pH 7,8

vor Extraktion zufügen von 0,5 µl/ ml Mercaptoethanol

**Extraktionspuffer für Blattmaterial (*Lycopersicon esculentum*):**

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

10 mM EDTA

0,1 % N-Laurylsarkosin

0,1 % Triton X100

vor Extraktion zufügen von 10 mM Mercaptoethanol

**Assay-Puffer:**

1 mM MUG (4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid) in Extraktionspuffer

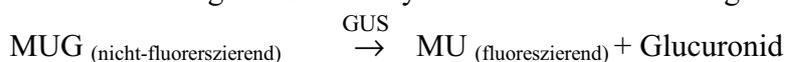
Lagerung bei - 70°C

**Stopp-Puffer:**

0,2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Lagerung bei 4°C

Die Bestimmung der GUS-Enzymaktivität beruht auf folgender Reaktionsgleichung:



MU = 4-Methylumbelliferon, MUG = 4-Methylumbelliferyl β-Glucuronid

Die Fluoreszenz von 4-Methylumbelliferon ist bei niedrigem pH-Wert (mit deprotonierter Hydroxylgruppe) am größten. Zugabe von basischer Lösung wie z. B. Natriumcarbonatlösung stoppt die Reaktion, und die Fluoreszenz, die proportional zur GUS-Aktivität im betrachteten Zeitintervall ist, kann ermittelt werden. Die Anregungswellenlänge beträgt bei der Fluoreszenzmessung 365 nm, die Emissionswellenlänge 455 nm.

Embryonische *Picea abies*-Zellen, die zuvor einem Bombardement (2.2.9.4) ausgesetzt und im Anschluss 48 h in Dunkelheit bei 20°C gelagert worden waren, wurden aus der Mitte der bombardierten Filter (Fläche ca. 2,5cm x 2,5cm) mit einer Pinzette entnommen und mit 200 µl Extraktionspuffer versetzt. Mit einem motorisierten Plastikstößel wurden die Zellen aufgeschlossen und weitere 300 µl Extraktionspuffer zugegeben. Nach einer Zentrifugation (10 min, 12.000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgenommen, bei -70°C zwischengelagert und auf Trockeneis von Schweden nach Deutschland transportiert.

Als Kontrolle zur Bestimmung der GUS-Proteinaktivität wurde auch Blattmaterial aus Tomaten verwendet, die wie folgt aufgearbeitet wurden:

0,5 g Blattmaterial wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser fein zerrieben. 800 µl Extraktionspuffer wurde zugefügt und 15 min unter Schütteln auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (15 min, 12.000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Um im Aktivitätsassay gleiche Proteinmengen einzusetzen, wurde zuerst eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (2.2.10.1). Im Anschluss wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein mit Extraktionspuffer auf ein Volumen von 500 µl verdünnt. Zu diesen Ansätzen wurden je 500 µl Assaypuffer gegeben, gut durchmischt und nach 0 h; 1,25 h und 20 h Inkubation bei 37°C je 2x 150 µl entnommen und in Stopp-Puffer gegeben. Die Bestimmung des gebildeten Methylumbelliferons (dunkel und gekühlt aufbewahren!) erfolgte über eine Fluoreszenzmessung am Fluorimeter (F-4500, Hitachi). Um mit anderen Messungen vergleichbare Werte zu erhalten, war es nötig, eine Eichreihe mit einem chemilumineszierenden Substrat zu erstellen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit Na-Methylumbelliferon-Salz hergestellt (0 bis 1µM MU) und die entsprechende Fluoreszenz gemessen. Diese Werte wurden dann auf die Zeit und die eingesetzte Menge Protein umgerechnet.

### 2.2.11 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)

Aus transgenen *Picea*-Pflanzen (Linie 77-1, 77-17) wurde, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, RNA isoliert. Danach erfolgte ein DNase-Verdau mit dem AMP-D1-Kit (Sigma) nach folgendem Ansatz:

1 µg Gesamt RNA  
1 µl 10x Reaktionspuffer  
DNase (1U)  
H<sub>2</sub>O ad 10 µl

Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Zur Deaktivierung der DNase wurde 1 µl Stopp-Lösung zugegeben und 10 min auf 70°C erwärmt. Um sicher zu gehen, dass die Restriktion der DNA auch vollständig verlaufen war, wurde ein Aliquot von diesem Ansatz (1 µl) in die PCR (s. u.) eingesetzt. Nach der DNase-Behandlung erfolgte die Herstellung der cDNA durch reverse Transkription. Da eine quantitative RT-PCR durchgeführt werden sollte, benötigt man dafür eine „Referenz-RNA“, die als Basis definiert wird. Weil in der DNA im Zellkern sehr viele Kopien für die rRNA vorliegen, die zudem in starkem Maße transkribiert werden und somit einen hohen steady-state-Gehalt aufweisen, werden häufig diese RNA-Spezies als Referenz verwendet. Aus diesem Grund wurde die RT-Reaktion mit einem Gemisch von je 10 pmol rDNA2-Oligonukleotid//gus1-Oligonukleotid bzw. 10 pmol rDNA2-Oligonukleotid//Oligo dT<sub>14</sub>-Oligonukleotid durchgeführt.

#### Reaktionsansatz:

9 µl RNA-Lösung nach DNase-Restriktion  
6 µl Wasser  
1 µl Oligonukleotid 1 (gus1 oder OligodT<sub>14</sub>, 10 pmol)  
1 µl Oligonukleotid 2 rDNA 2 (10 pmol)

Um eventuelle Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, wurde der Ansatz 5 min auf 70°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Dann wurden

6 µl AMV Puffer (5x)  
5 µl dNTP-Mix (10 mM)  
1 µl RNase-Inhibitor (35U, MBI)  
1 µl AMV-RTase (5U/ µl)

H<sub>2</sub>O ad 30 µl

zugegeben und der Ansatz 1 h bei 42°C inkubiert. Die AMV-RTase wurde durch 5minütiges Erhitzen auf 93°C deaktiviert und die Proben bei -20°C oder 4°C gelagert. Mit je 3 µl dieses cDNA/RNA-Ansatzes wurde anschließend eine erste PCR nach unten angegebenem

Reaktionsansatz durchgeführt und auf einem DNA-Agarosegel (2.2.5.2) analysiert. Im Anschluss daran wurde mit einen 3 µl-Aliquot des ersten PCR-Ansatzes eine weitere PCR unter gleichen Parametern durchgeführt.

**Reaktionsansatz:**

25 µl Master Mix Qiagen Master Kit (enthält Reaktionspuffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Taq-Polymerase)

25 pmol sense-Oligonukleotid (Tabelle 2.5)

25 pmol antisense-Oligonukleotid (Tabelle 2.5)

3 µl cDNA/RNA-Gemisch als Template

ad 50 µl mit Wasser

**PCR-Programm:**

80°C 5 min

93°C 5 min Denaturierung

30-40 Zyklen: 93°C 1 min Denaturierung

50-55°C 1 min Anlagerung der Oligonukleotide (Annealing)

72°C 1 min Elongation

72°C 10 min finale Elongation

4°C ∞

Name des Oligonukleotids	Sequenz	Quelle
ol-gus1	5'-atg tta cgt cct gta gaa ac- 3'	kodierender Region des <i>uidA</i> -Gen (β-Glucoronidase) aus <i>E. coli</i> antisense-Oligonukleotid AC CV1012T
gus4	5'-atg tta cgt cct gta gaa ac-3'	kodierender Region des <i>uidA</i> -Gens (β-Glucoronidase) sense-Oligonukleotid AC CV1012T
Pa_rDNA1	5'-ggg cgc aag gct gaa act t-3'	Konsensus-Sequenz aus kodierender Region von 18S-rRNA aus <i>Picea abies</i> und <i>Lycopersicon esculentum</i> sense-Oligonukleotid AC X51576.1
Pa_rDNA2	5'-tta ttg cct caa act tcc-3'	Konsensus-Sequenz aus kodierender Region von 18S-rRNA <i>Picea abies</i> und <i>Lycopersicon esculentum</i> AC X51576.1 antisense-Oligonukleotid

Fortsetzung nächste Seite

Name des Oligonukleotids	Sequenz	Quelle
MD11	5'-cag cat gac tcg gtt gga a-3'	Abgeleitete Sequenz aus kodierender Region des Phytochromgens aus <i>Picea abies</i> AC U60264
MD12	5'-cct gcc gaa tgt atg cta-3'	Abgeleitete, komplementäre Sequenz aus kodierender Region des Phytochromgens aus <i>Picea abies</i> AC U60264
Pico_5'utr	5'-tccccgggaggccagaagagaactggtac 3'	Abgeleitete Sequenz aus der 5'untranslatierten Region des <i>Lhcb</i> -Gens aus <i>Pinus contorta</i> AC AJ313013
Pico_3'utr	5'-ggaattccccaaaagttcacaatacaa-3'	Abgeleitete, komplementäre Sequenz aus der 3'untranslatierten Region des <i>Lhcb</i> -Gens aus <i>Pinus contorta</i> AC AJ313013
Gs2	5'-gcaccattccagtccccctcaattggcttg-3'	Abgeleitete Sequenz aus kodierenden Regionen der Glutaminsynthetasen aus <i>Pinus sylvestris</i> AC X69822, AC 74429
Gs3	5'-atcttcggtgatccatttcg-3'	Abgeleitete, komplementäre Sequenz aus kodierenden Regionen der Glutaminsynthetasen aus <i>Pinus sylvestris</i> AC X69822, AC 74429
Oligodt <sub>14</sub>	5'-ttt ttt ttt tt-3'	-

Tabelle 2.5 In PCR-Reaktionen verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid-Kombinationen	Größe des erwarteten PCR-Produkts von der cDNA
ol-gus 1, gus4	486 bp
Pa_rDNA1, Pa_rDNA2	305/ 308 bp ( <i>Lycopersicon esculentum</i> / <i>Picea abies</i> )
MD11, MD12	709 bp
gs2, gs3	556bp

Tabelle 2.6 Größe der PCR-Produkte bei verschiedenen Oligonukleotidkombinationen

### 2.2.12 Blattbewegungen

Die Apparatur zur Messung von Blattbewegungen (Abb. 2.3) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Wolfgang Engelmann, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt. Es wurde wie folgt verfahren:

Auf dem zu untersuchenden Blatt wurde mit weißer Farbe oder durch Ankleben von Styropor ein weißer Punkt angebracht. Mit Hilfe einer Schwarzweiß-Kamera war es nun möglich, die Bewegung dieses weißen Punktes im Dauerlicht (Lichtintensität  $75 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ , Temperatur konstant  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) auf dem dunklen Hintergrund zu verfolgen. Die Daten wurden durch einen Digitizer aufgenommen und an einen Rechner übertragen. Für die Detektion und Auswertung wurden dabei die OXalis-Programme (Schuster und Engelmann 1990) verwendet. Mit dem Programm OXALDIFI wurden mittels einer digitale Filterung der Daten die Maxima und Minima der Schwingungen und somit die Periodenlängen ermittelt. Bei Messungen, deren Werte eine starke Trendbewegung zeigten, konnte das Programm OXALDIFI nicht eingesetzt werden. In diesen Fällen wurde über das Programm POLYAPP eine Polynome Approximation vorgenommen und der Trend von den Originaldaten abgezogen. Die so erhaltenen Werte wurden einer Spektralanalyse unterzogen, um die Periodenlängen zu bestimmen.

Untersuchungen zur Detektion der Blattbewegung wurden mit *Araucaria angustifolia*, *Araucaria heterophylla*, *Taxus baccata*, *Picea abies*, *Pinus sylvestris*, *Ginkgo biloba*, *Lycopersicon esculentum* und *Nicotiana tabacum* durchgeführt.

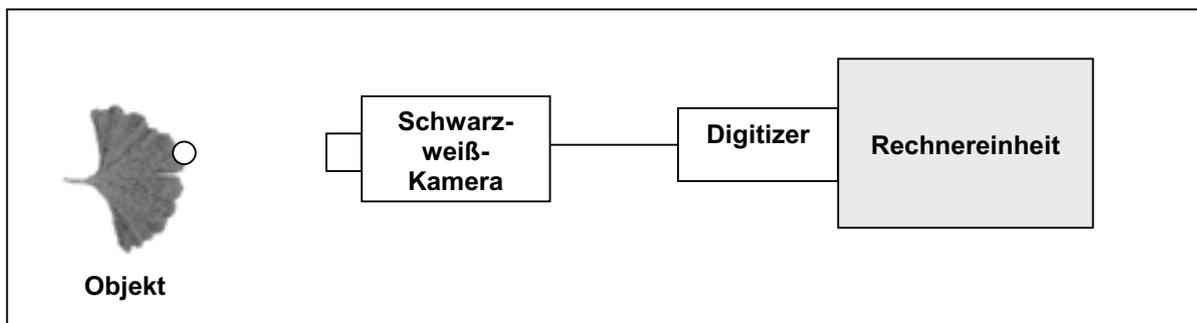
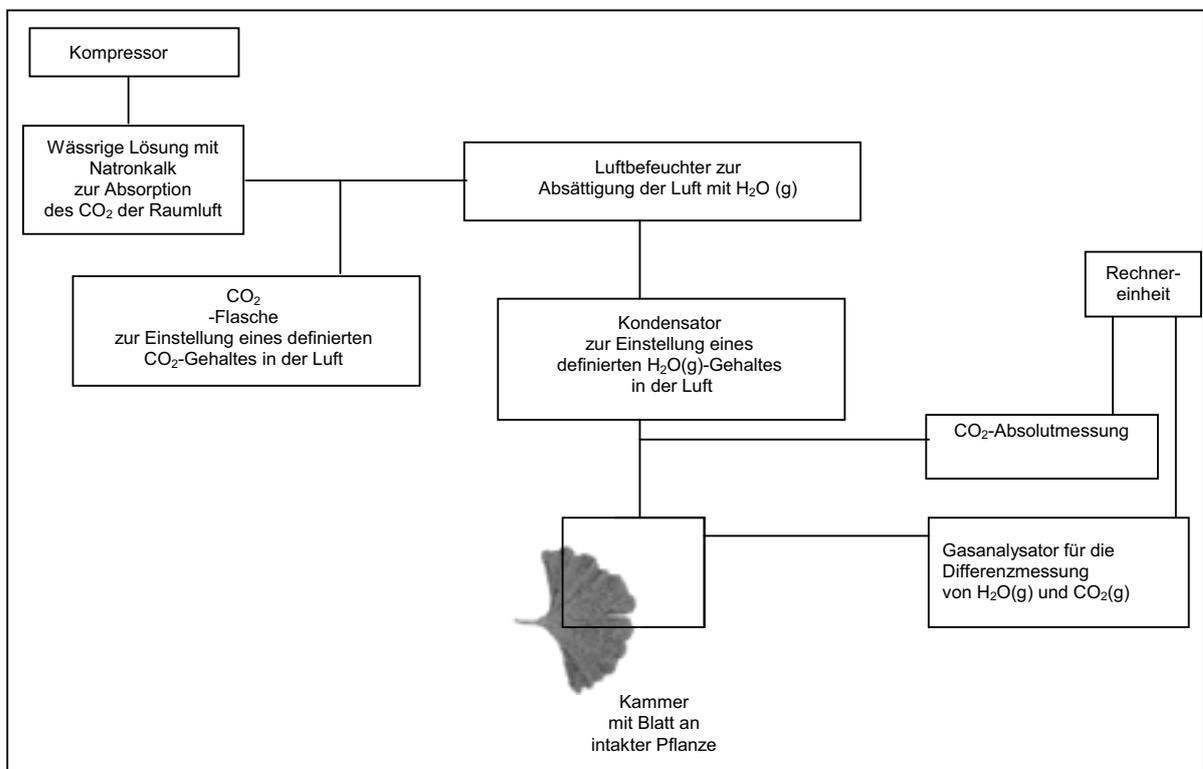


Abb. 2.3 Apparatur zur Detektion von Blattbewegungen

### 2.2.13 Gaswechsellmessungen

Zur Bestimmung der Stomataleitfähigkeit wurde freundlicherweise eine Gasanalyseapparatur (Abb. 2.4) von Prof. Dr. Klaus Raschke, Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt. Dabei wurden Blätter intakter Pflanzen von *Ginkgo biloba* bzw. *Nicotiana tabacum* in eine

Blattkammer eingespannt und von oben mit einer Xenonleuchte (geringe Lichtintensitäten:  $40\text{-}140 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , hohe Lichtintensitäten:  $500\text{-}900 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) bestrahlt. Mit Hilfe eines Thermoelements wurde die Blatttemperatur an der Blattunterseite bestimmt. Durch einen Kompressor wurde ein Luftstrom erzeugt (Strömungsrate  $52 \text{ l/h}$ ), aus dem durch Absorption in einem Natronkalkturm jegliches  $\text{CO}_2$  entfernt wurde, um so einen definierten  $\text{CO}_2$ -Partialdruck einstellen zu können. Der Gasstrom wurde durch einen Luftbefeuchter mit Wasserdampf gesättigt und in einem Kondensator auf den gewünschten Taupunkt gebracht. Die Konzentrationen an  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  wurden mit Hilfe von Infrarotgasanalysatoren vor und nach Durchtritt durch die Blattkammer bestimmt. Alle Messdaten wurden an einen Rechner übertragen (HP9000\*217, Hewlett Packard), und mit Hilfe eines Auswertungsprogramms (F. Tiefenau 1981) wurden aus den ermittelten Werten die stomatäre Leitfähigkeit errechnet. (Genaugenommen stellt die errechnete Größe den reziproken Wert des Gesamtwiderstandes für Wasserdampf dar, der sich aus der Addition der Diffusionswiderstände der Stomata und der aerodynamischen Grenzschicht am Blatt ergibt. Da der Widerstand der aerodynamischen Grenzschicht am Blatt vernachlässigt werden kann, wird im Weiteren von stomatären Leitfähigkeiten gesprochen werden.) Alle Messwerte wurden ausgedruckt, dann per Hand in ein Statistikprogramm (Excel, Microsoft) eingegeben und die entsprechenden Graphen erstellt.



**Abb. 2.4** Apparatur zur Messung der stomatären Leitfähigkeit und Assimilation

### 2.2.14 EM-Bilder

Blattmaterial von *Ginkgo biloba* bzw. *Nicotiana tabacum* (Anzucht vgl. 2.2.1.4 und 2.2.1.2) wurde um 12.00 Uhr bzw. 0.00 Uhr im LD-Rhythmus und unter Dauerdunkelbedingungen (Lichtphase: 6-22 Uhr,  $75\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $23^\circ\text{C}$  konstant) geerntet, sofort mit einer Rasierklinge in ca.  $1\text{cm}^2$  große Stücke zerschnitten und zur Fixierung in Glutaraldehyd (4 % gepuffert in 0,1M Na-Phoshatpuffer) gegeben. Die Trocknung der Proben erfolgte durch Kritische-Punkt-Trocknung (Critical point dryer K850 der Firma EMITECH). Im Anschluss wurden die Blattproben im Vakuum mit einer 15-50 nm dünnen Goldschicht bedampft (Sputter-Coater SCD 004, Fa BAL-TEC) und unter dem Rasterelektronenmikroskop (Fa Zeiss, Oberkochen) betrachtet.

### 2.2.15 Untersuchungen zur RNA-Stabilität

#### 2.2.15.1 Kinetische Grundlagen für die Bestimmung von Halbwertszeiten mit Hilfe von Actinomycin D

Actinomycin D interkaliert in die DNA und hemmt die Transkription, somit auch die Bildung von mRNA. Wird keine neue mRNA mehr produziert, lässt sich der Abbau der zum Zeitpunkt Null (= vollständige Blockierung der Transkription) vorhandenen RNA-Konzentration verfolgen. In erster Näherung wird dabei üblicherweise von einer Reaktion erster Ordnung ausgegangen. Es gelten damit folgende Annahmen:

- Die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Konzentration des Edukts (der mRNA), es gibt keine weiteren Reaktionspartner beim geschwindigkeitsbestimmenden Schritt.
- Die Reaktionsgeschwindigkeit ist unabhängig vom Tageszeitpunkt.

Wenn man die Geschwindigkeit für eine Reaktion erster Ordnung  $A \rightarrow B$

anhand der Abnahme der Ausgangssubstanz A verfolgt, lautet das Geschwindigkeitsgesetz:

$$\frac{dA}{dt} = -k A$$

$k$  = Geschwindigkeitskonstante

$$\int_{A_0}^A \frac{dA}{A} = \int_0^t -k dt$$

$$\ln A - \ln A_0 = \ln (A / A_0) = -k t$$

Daraus lässt sich folgern:

Wird in einem Diagramm  $\ln A$  gegen  $t$  aufgetragen, ergibt sich eine Gerade, aus deren Steigung die Geschwindigkeitskonstante  $k$  ermittelt werden kann. Aus der integrierten Gleichung ist ferner ersichtlich, dass man zur Bestimmung von  $k$  nicht unbedingt die absolute Konzentration von  $A$ , sondern nur eine ihr proportionale Größe messen muss.

Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  gibt die Zeitspanne an, in der die Konzentration einer an der Reaktion beteiligten Substanz auf die Hälfte ihres Anfangswertes absinkt ( $A = A_0/2$ ). Bei einer Reaktion erster Ordnung ergibt sich somit aus obiger Gleichung:

$$\ln A_0/2 - \ln A_0 = \ln ((A_0/2)/A_0) = \ln 1/2 = -\ln 2 = -k t_{1/2}$$

Daraus folgt:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k$$

Die Halbwertszeit einer Reaktion erster Ordnung ist folglich unabhängig von der Ausgangskonzentration und kann damit durch die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante  $k$  nach obiger Gleichung ermittelt werden.

### 2.2.15.2 Untersuchungen zur Stabilität der Transkripte verschiedener Gene in *Lycopersicon esculentum*, *Pinus sylvestris*, *Nicotiana tabacum* und *Ginkgo biloba*

#### Stabilitätspuffer:

15 mM Saccharose

1 mM KCL

1 mM Pipes

1 mM Natriumcitrat

Actinomycin D (200 – 300  $\mu\text{g} / \text{ml}$ )

pH 6,5

(Holtorf et al. 1998)

Alle Stabilitätsuntersuchungen wurden nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Die Pflanzenteile (Spross bei *Lycopersicon esculentum*, *Pinus sylvestris* und *Nicotiana tabacum*, Blätter bei *Ginkgo biloba*, einzelne Fiedern der Fiederblätter bei transgenen Tomatenpflanzen (Moneymaker) mit dem Konstrukt 35S-Promotor::*Pinus contorta Lhcb*, Blattscheiben bei *Nicotiana tabacum*) wurden unter Wasser mit einem scharfen Skalpell abgeschnitten bzw. mit einem scharfen Korkbohrer ausgestochen, um den Transpirationsstrom nicht zu unterbrechen. Im Anschluss wurden sie in Stabilitätspuffer (mit Actinomycin D) gestellt. Um vergleichen zu können, ob und wie sich der steady-state-

mRNA-Gehalt in den Proben auch ohne Zugabe von Actinomycin D ändert, wurde ein Kontrollansatz gewählt, bei dem die Pflanzenteile im Stabilitätspuffer ohne Actinomycin D inkubiert wurden. Nach verschiedenen Inkubationszeiten erfolgte eine Ernte des Pflanzenmaterials, die Gesamt-RNA wurde wie unter 2.2.2 beschrieben isoliert, in einem denaturierenden RNA-Gel aufgetrennt (2.2.5.1), auf eine Nylonfolie geblottet (2.2.6) und mit entsprechenden Sonden hybridisiert (2.2.7). Mit Hilfe der so erhaltenen Daten wurde der Quotient mRNA/rRNA bestimmt, dann der größte Wert gleich 100 % gesetzt und die jeweiligen Prozentwerte errechnet. Alternativ zur Bestimmung der rRNA wurde die Schwärzung der Gesamt-RNA auf den Fotos der mit Ethidiumbromid angefärbten Gele mit Hilfe des NIH-Image-Programmes (Quelle: [www.nih.gov](http://www.nih.gov)) ermittelt und im Anschluss die relativen mRNA-Gehalte berechnet. Zur Bestimmung der Halbwertszeiten wurde der natürliche Logarithmus dieser Prozentangaben kalkuliert und in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen. Durch eine lineare Regression, bei der jeder Messpunkt gleiche Wertigkeit besaß, ergab sich eine Gerade, aus der sich wie in 2.2.15.1 beschrieben die Halbwertszeit errechnen ließ.

### 2.2.15.3 Überprüfung des Transportes von radioaktiven Substanzen in Gymnospermen

Actinomycin D interkaliert in DNA und hemmt dort die Transkription. Um zu testen, ob dieses recht große Molekül (im Vergleich zu hydratisierten Salzen) im Transpirationssog auch transportiert wird und somit theoretisch alle Zellen erreichen kann, wurden folgende Versuche durchgeführt: Ein anderes großes Molekül (dCTP ( $\alpha$ -P<sup>32</sup> markiert) wurde dem Stabilitätspuffer (ohne Actinomycin D) zugegeben und die Ausbreitung der Radioaktivität im Blattmaterial von *Ginkgo biloba* und *Pinus sylvestris* verfolgt.

### 2.2.15.4 Überprüfung der Wirkung von Actinomycin D

Um zu überprüfen, ob Actinomycin in *Pinus sylvestris* einen hemmenden Einfluss auf die Transkription ausübt, wurden folgende Versuchsansätze gewählt:

Sprosse von *Pinus sylvestris*-Keimlingen wurden unter Wasser mit einem scharfen Skalpell abgeschnitten und in Wasser (mit bzw. ohne Actinomycin D) gestellt. Nach 4 h Inkubation in den entsprechenden Lösungen wurde je 2,5 mCi radioaktives Phosphat (P<sup>32</sup> markiert) zugegeben. Jegliche ab diesem Zeitpunkt transkribierte RNA sollte nun radioaktiv markiert sein. Die Ansätze wurden nach 7,5 h bzw. 24 h nach Zugabe von PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und auf ein denaturierendes Gel aufgetragen.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden Sprosse von *Pinus sylvestris*-Keimlingen unter Wasser mit einem scharfen Skalpell abgeschnitten und in radioaktive Phosphatlösung (mit bzw. ohne Actinomycin D) gestellt, die Gesamt-RNA isoliert und auf ein denaturierendes Gel aufgetragen.

### **2.2.15.5 Berechnungen zur Vorhersage der Sekundärstrukturen verschiedener *Lhc*-RNA-Spezies**

Die Berechnungen nach Schmitz und Steger (1992) zur Vorhersage der Sekundärstrukturen verschiedener *Lhc*-RNA-Spezies wurden freundlicherweise von Frau Dr. Petra Klaff, Universität Düsseldorf, durchgeführt.

Grundlage für die Berechnung von mRNA-Strukturen sind empirisch bestimmte Energiebeiträge, die entweder eine stabilisierende oder destabilisierende Wirkung auf die Sekundärstruktur einer mRNA besitzen. Stabilisierende Beiträge liefern dabei die Wechselwirkungen zwischen Basenpaaren, destabilisierende Beiträge kommen durch von Schleifenstrukturen (loops) innerhalb der Struktur einer mRNA zustande. Mit Hilfe eines Computerprogramms wurde für jede mRNA-Sequenz aus allen rechnerisch möglichen Basenpaar/Loop-Kombinationen die Sekundärstruktur mit der geringsten freien Enthalpie unter Anwendung der Gibbs-Gleichung bestimmt:

$$\Delta G = \Delta H - R \cdot T \cdot \Delta S$$

mit: G = freie Energie, H = Enthalpie, S = Entropie,  
R = allgemeine Gaskonstante  $8,314 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , T = Temperatur

Dabei wurde angenommen, dass die Bedingungen in einer Pflanzenzelle bei einer Ionenstärke von 100 mM bis 150 mM NaCl und einer Temperatur von 25°C liegen. Die numerischen Werte, die notwendig sind, um die Energiebeiträge für Helices und Loops auszurechnen, wurden im Vorfeld experimentell bestimmt und auf eine Ionenstärke von 1 M NaCl normiert. Um den physiologischen Bedingungen Nahezukommen, war somit eine Kompensation notwendig. Aus der ebenfalls empirisch bestimmten Korrelation

$$\Delta T / \log(\text{NaCl-Konzentration}) = 13,5 \text{ } ^\circ\text{C}$$

ergab sich daraus ein für die Rechnungen verwendeter Wert ca. 40°C für die Temperatur. Die Resultate dieser Kalkulationen sind im Ergebnisteil dargestellt.

### 2.2.9 Zur Auswertung der Experimente

Die für diese Arbeit erstellten "Northern Blots" wurden mit Hilfe der Software des Instant-Imagers der Firma Packard bzw. der CCD-Kamera der Firma Raytest ausgewertet. Die Exponierzeit wurde dabei je nach Stärke der Hybridisierung variiert. Im Anschluss wurden die Transkript-Hybridisierungssignale auf die Signale der rRNA-Hybridisierung bezogen und der höchste Wert auf dem Filter als 100 % gesetzt. Im Ergebnisteil wurde in den Graphen die Standardabweichung der Werte (in linearen Auftragungen) oder die Maximal- bzw. Minimalwerte (in halblogarithmischen Auftragungen) angegeben. Die Standardabweichung wurde dabei nach folgender Formel berechnet:

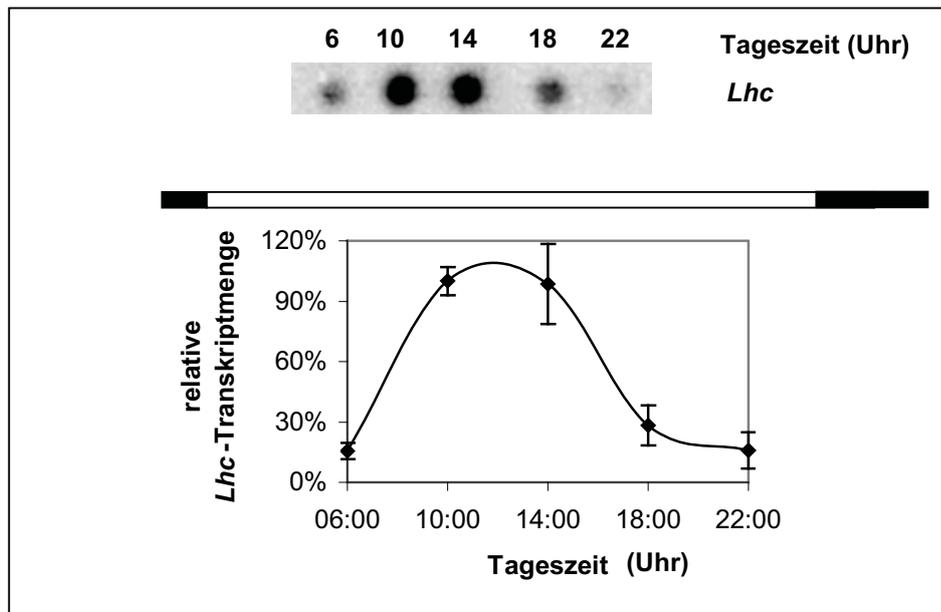
$$\text{Standardabweichung (s) : } s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Genexpression in Gymnospermen und Angiospermen

##### 3.1.1 *Lhc*-Genexpression im Licht-Dunkelwechsel

Eine diurnale Kontrolle der Expression ist für viele Gene in Angiospermen gut dokumentiert, während bei Gymnospermen, einer anderen Untergruppe der Samenpflanzen, dieses Phänomen nur unzureichend untersucht wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus diesem Grund die *Lhc*-Transkriptmenge im Tagesverlauf verschiedener Pflanzenspezies im Licht-Dunkel-Wechsel detektiert. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Gruppe der Gymnospermen, von denen Vertreter unterschiedlicher Klassen (*Pinus sylvestris*, *Pinus contorta* und *Ginkgo biloba*) betrachtet wurden. Zum Vergleich wurde exemplarisch eine Angiosperme der Familie der Asteraceen *Helianthus annuus* verwendet.



**Abb. 3.1 *Lhc*-Transkriptverteilung in *Helianthus annuus* im Licht-Dunkelwechsel**

Oben: Autoradiogramm eines Dot Blots, hybridisiert mit einer radioaktiv markierten 0,55kb *Lhc*-Sonde aus *Lycopersicon esculentum*.

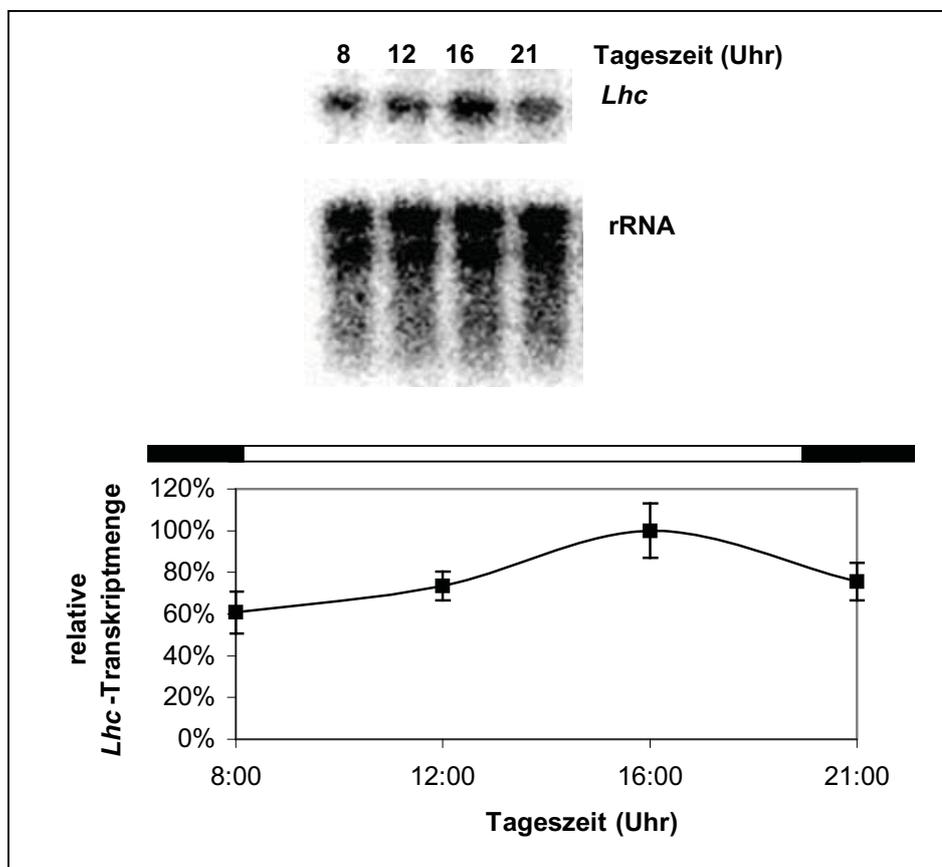
Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase. Die Punkte markieren den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten, die wiederum je aus 1-2 Einzelmesspunkten bestanden.

(Anzuchtbedingungen: Temperatur: 21-23°C Tag, 18°C Nacht, Lichtphase 5-21 Uhr bei  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

*Helianthus annuus* ist eine typische Sonnenpflanze (Starklichtpflanze), die helle Standorte wie z. B. Wiesen bevorzugt. Sie gehört damit zu einer Gruppe von Angiospermen, über die bislang wenige Informationen bezüglich des *Lhc*-mRNA-Gehaltes im Tagesverlauf existierten. Wie aus Abb. 3.1 ersichtlich, folgte die *Lhc*-Transkript-Menge bei *Helianthus annuus* einem für Angiospermen typischem diurnalen Verlauf mit Maximum zur Mittagszeit

(12 Uhr). Die Amplitude dieser Schwingung reichte von 14% bis 100%. Damit errechnet sich ein Quotient von 7 zwischen Maximum und Minimum.

Als Vertreter der Klasse der Pinopsida wurden *Pinus sylvestris* und *Pinus contorta* gewählt. *Pinus sylvestris* wurde für die Untersuchungen eingesetzt, weil diese Gymnospermenart die am besten untersuchte Art in der Gruppe der Pinopsida darstellt. Außerdem ist sie in Europa und Asien heimisch und es konnten somit ohne Probleme ausreichende Mengen an Samen im Fachhandel erworben werden. Da bei weiterführenden Experimenten ein *Lhc*-Gen von *Pinus contorta* eingesetzt werden sollte, war es darüber hinaus unerlässlich, den *Lhc*-Transkriptgehalt im Tagesverlauf bei dieser Gymnospermenart zu untersuchen.



**Abb. 3.2** *Lhc*-Transkriptverteilung in *Pinus sylvestris* im Licht-Dunkelwechsel

Oben: Autoradiogramm eines Northern Blots, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Lhc*-Sequenz von *Pinus sylvestris* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Die relative *Lhc*-Transkriptmenge ergibt sich aus dem Quotienten *Lhc*/ *rRNA*. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase.

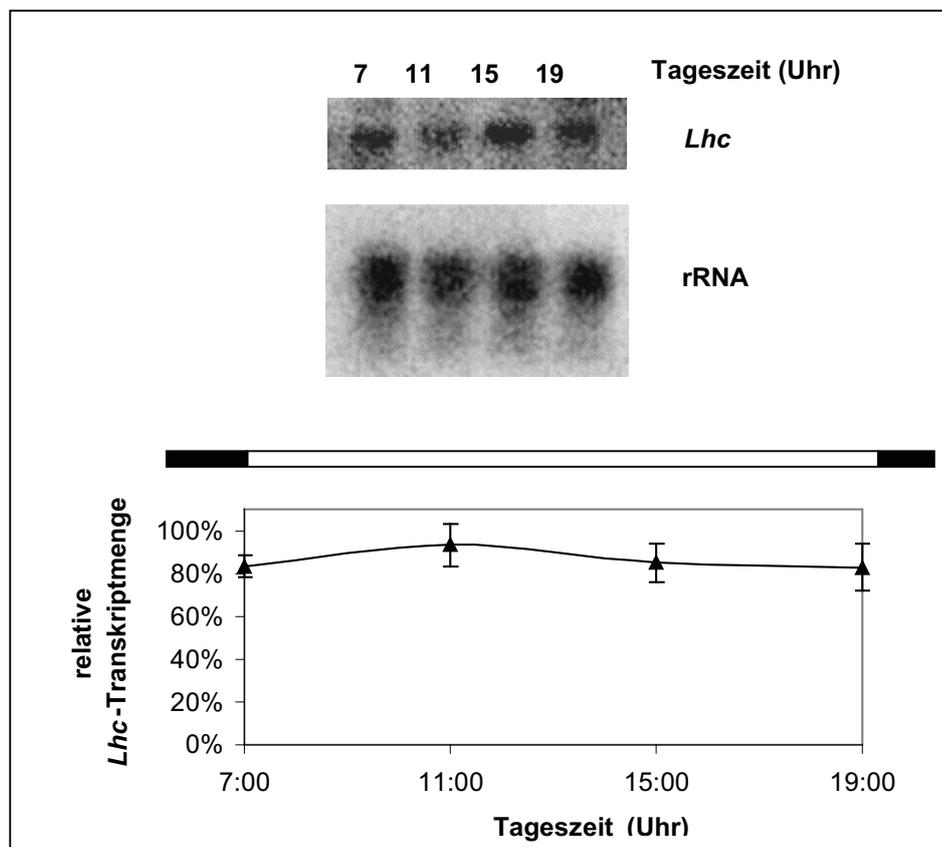
Die Punkte markieren die Mittelwerte aus 3 Einzelmesspunkten eines Experimentes.

(Anzuchtbedingungen: Temperatur: 18°C konstant, Lichtphase 8-20 Uhr bei  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Ernte 10 Wochen nach Aussaat, Anzucht auf Erde)

Wie in Abb. 3.2 zu erkennen, trat bei *Pinus sylvestris* eine leichte Schwankung des *Lhc*-Transkriptgehaltes mit einer Amplitude von etwa 30% auf, deren Maximum am Nachmittag gegen 16 Uhr lag. Starke diurnale Schwankungen der *Lhc*-mRNA-Menge mit Maximum zur

Mittagszeit wie bei *Helianthus annuus* konnten jedoch nicht detektiert werden. Der Quotient der *Lhc*-mRNA-Mengen von Maximum zu Minimum betrug 1,6.

In Abb. 3.3 sind die Ergebnisse der Messungen für *Pinus contorta* dargestellt. Wie sich daraus ersehen lässt, blieb hier die Menge an *Lhc*-Transkript im Tagesverlauf nahezu konstant. Die Schwankungen waren gegenüber dem Vertreter der gleichen Gattung *Pinus sylvestris* geringer ausgeprägt (Amplitude von 10%). Der Quotient aus den *Lhc*-mRNA-Mengen von Maximum zu Minimum betrug 1,1. Diese Schwankungen liegen durchaus im Bereich der eingesetzten Northern-Blot-Technik, so dass auch hier von einem deutlich veränderten Expressionsmuster im Vergleich zu Angiospermen wie z. B. *Helianthus annuus* (Abb. 3.1) ausgegangen werden kann.



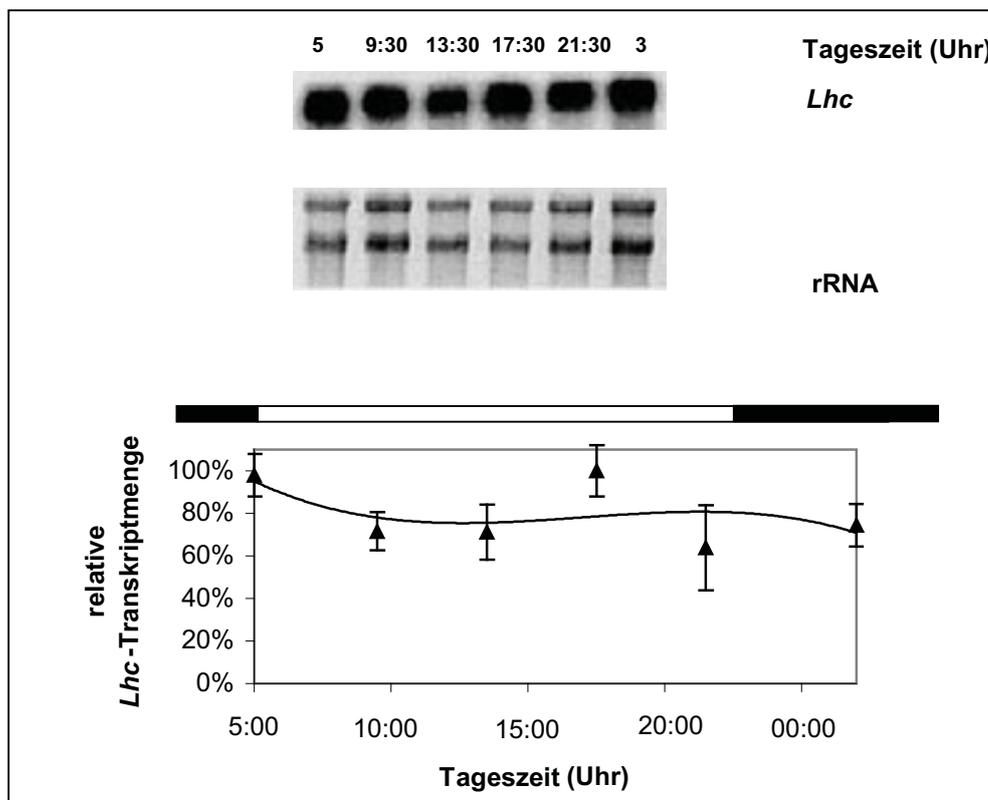
**Abb. 3.3 *Lhc*-Transkriptverteilung in *Pinus contorta* im Licht-Dunkelwechsel**

Oben: Autoradiogramm eines Northern Blots, hybridisiert mit einer radioaktiven 1,2kb *Lhc*-Sonde aus *Pinus contorta* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Die relative *Lhc*-Transkriptmenge ergibt sich aus dem Quotienten *Lhc*/ *rRNA*. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase. Die Punkte markieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die wiederum je aus 2-3 Einzelmesspunkten bestanden.

(Anzuchtbedingungen: Ernte 8-14 Wochen nach Aussaat, Anzucht auf Erde, Temperatur: 24°C konstant, Lichtphase 7-19 Uhr bei  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Um eine weitere Klasse der Gymnospermen hinsichtlich der *Lhc*-mRNA-Akkumulation im Tagesverlauf zu untersuchen, wurde *Ginkgo biloba* als einzig lebender Vertreter der Ginkgoopsida gewählt. Wie in Abb. 3.4 zu erkennen, traten bei *Ginkgo biloba* zwei Maxima in der *Lhc*-Transkriptakkumulation auf. Das erste konnte am frühen Morgen um 5 Uhr, das zweite am Nachmittag gegen 17:30 Uhr detektiert werden. Die Amplitude betrug in beiden Fällen  $\pm 30\%$  und war somit sehr gering ausgeprägt. Diurnale Fluktuationen der *Lhc*-mRNA-Menge wie bei *Helianthus annuus* (Abb. 3.1) konnten nicht detektiert werden. Setzt man die Werte der *Lhc*-Gehalte von Maxima und Minima in Relation, so ergibt sich ein Faktor von 1,6.



**Abb. 3.4 *Lhc*-Transkriptverteilung in *Ginkgo biloba* im Licht-Dunkelwechsel**

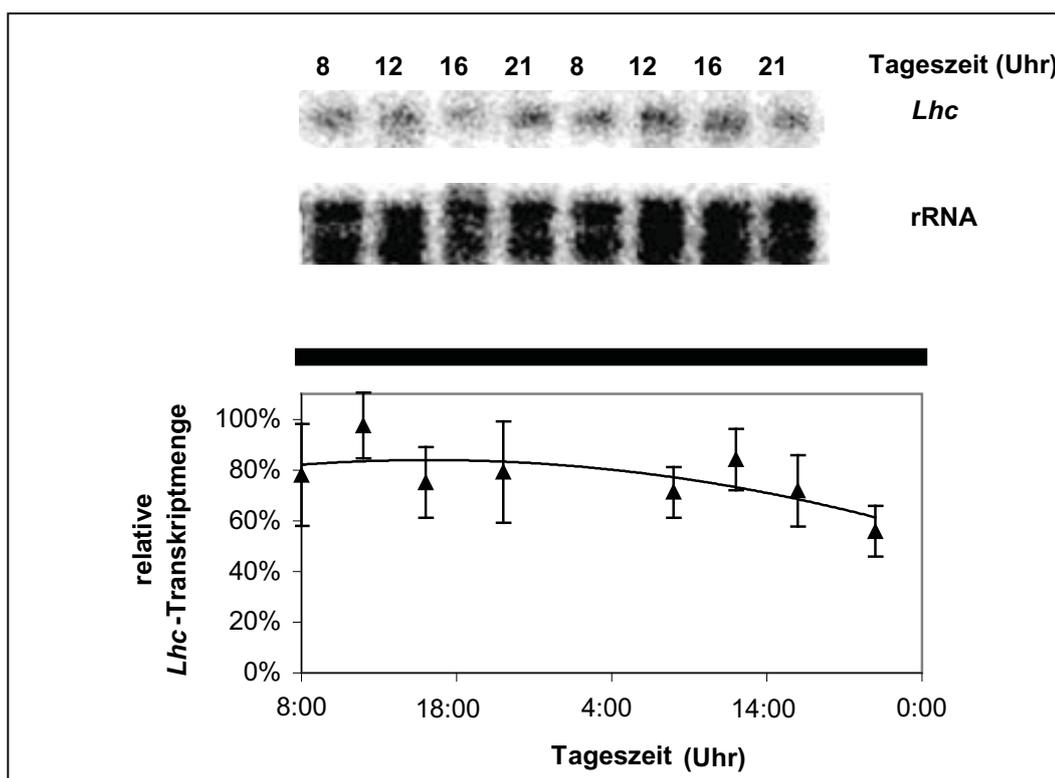
Oben: Autoradiogramm eines Northern Blots, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Lhc*-Sequenz aus *Ginkgo biloba*. Unter dem Autoradiogramm ist das Gelfoto des mit Ethidiumbromid angefärbten Gels dargestellt. Die Menge der *rRNA* wurde mit Hilfe des NIH-Image-Programms (Quelle: [www.nih.gov](http://www.nih.gov)) ermittelt.

Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Die relative *Lhc*-Transkriptmenge ergibt sich aus dem Quotienten *Lhc*/ *rRNA*. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase. Die Punkte markieren die Mittelwerte aus 3 Einzelmesspunkten eines Experimentes.

(Anzuchtbedingungen: natürliche Licht- und Temperaturverhältnisse, April, *Ginkgo*-Baum Botanisches Institut der Universität Rostock, Doberaner Str.)

### 3.1.2 *Lhc*-Genexpression im Dauerdunkel bei *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba*

Wie unter 3.1.1 beschrieben, folgten die *Lhc*-Transkriptgehalte im Licht-Dunkelwechsel weder bei *Pinus sylvestris* noch bei *Ginkgo biloba* einem diurnalen Rhythmus. Um zu ermitteln, ob der Verlauf dieser Transkriptakkumulation auch unter anderen Bedingungen bestehen bleibt, wurden die beiden Arten als Vertreter unterschiedlicher Klassen der Gymnospermen bei konstanter Temperatur ins Dauerdunkel gebracht und nach einigen Tagen zu verschiedenen Zeiten Proben geerntet.



**Abb. 3.5** *Lhc*-Transkriptverteilung am ersten und zweiten Tag im Dauerdunkel in *Pinus sylvestris*

Die Anzucht des Pflanzenmaterials erfolgte auf Erde.

Oben: Autoradiogramm eines Northern Blots, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Lhc*-Sequenz aus *Pinus sylvestris* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

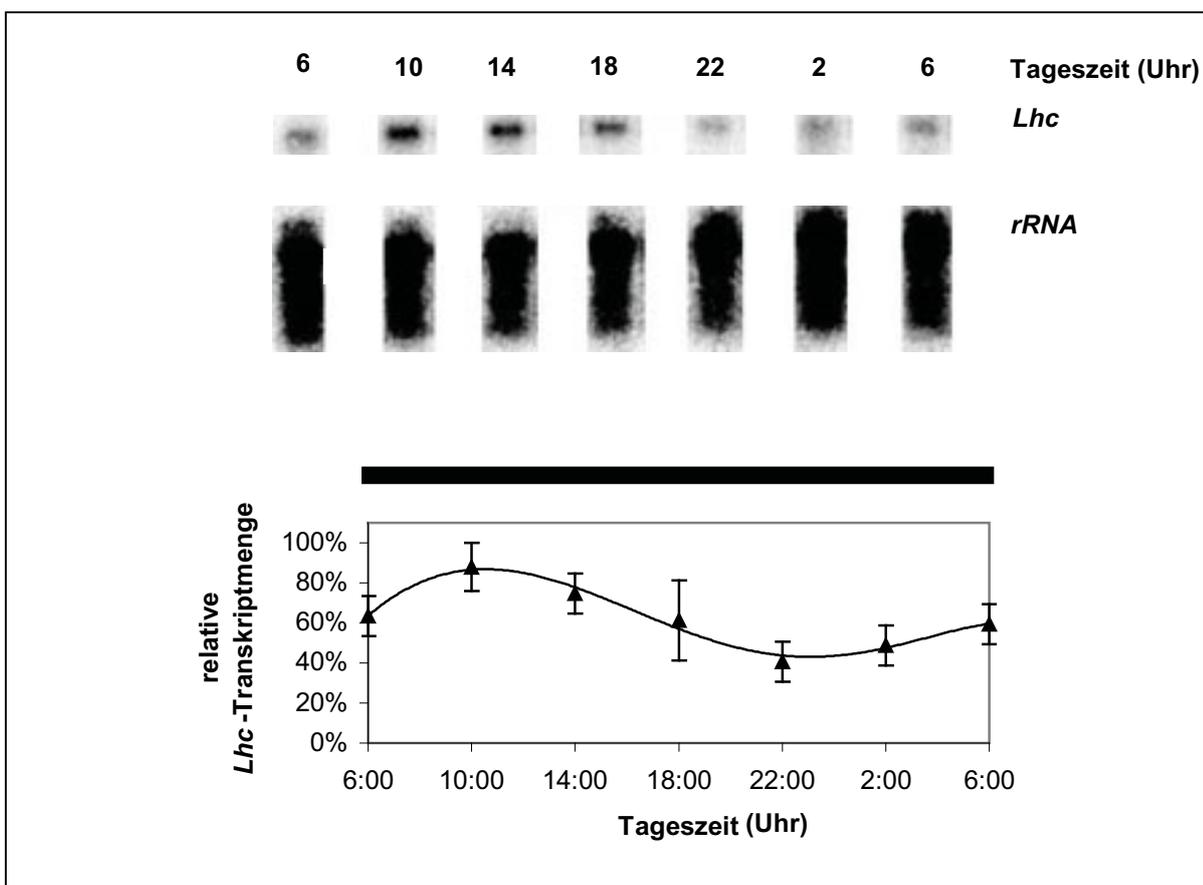
Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Die relative *Lhc*-Transkriptmenge ergibt sich aus dem Quotienten *Lhc*/*rRNA*. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Dunkelphase. Die Punkte markieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die wiederum je aus 1-2 Einzelmesspunkten bestanden.

(Anzuchtbedingungen: Ernte 10-14 Wochen nach Aussaat, Temperatur: 18°C Tag konstant, Lichtphase vor Dauerdunkel 8-20 Uhr bei 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Bei der Anzucht von *Pinus sylvestris*-Pflanzen auf Erde waren am ersten und zweiten Tag im Dauerdunkel nur geringe Unterschiede im *Lhc*-Transkriptgehalt detektierbar (Abb. 3.5). Allenfalls ließ sich eine leichte Schwingung mit einer Amplitude von 10% mit einem Maximum um 12 Uhr beschreiben. Diese Unterschiede liegen aber im Fehlerbereich der

verwendeten Northern-Blot-Technik, so dass dieses Ergebnis mit Hilfe einer anderen Methode (z. B. der quantitativen RT-PCR) kontrolliert werden sollte.

Auch bei *Pinus sylvestris*-Pflanzen, die auf Erde angezogen und für 5 Tage im Dauerdunkel inkubiert worden waren, wurde im Anschluss die *Lhc*-Transkriptmenge im Tagesverlauf ermittelt. Deutlich liess sich eine circadiane Oszillation mit einer Amplitude von 50% detektieren, deren Periodenlänge bei etwa 24 h lag. Das Maximum wurde dabei wie bei Angiospermen zur Mittagszeit (11 Uhr) bestimmt (Abb. 3.6). Der Quotient der *Lhc*-mRNA-Mengen von Maximum zu Minimum betrug 2,7 und war somit deutlich größer als unter Licht-Dunkel-Bedingungen (Faktor 1,6 vgl. 3.1.1).



**Abb. 3.6** *Lhc*-Transkriptverteilung am sechsten Tag im Dauerdunkel in *Pinus sylvestris* bei Anzucht auf Erde

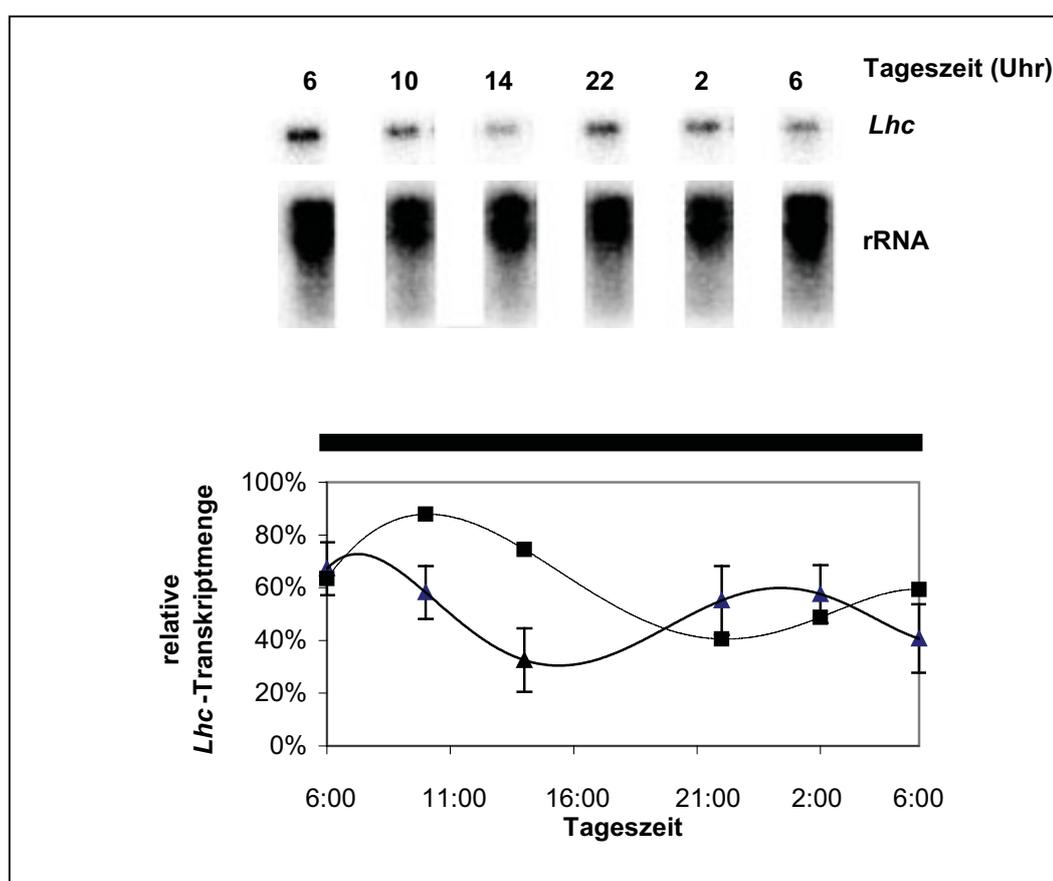
Oben: Autoradiogramm eines Northern Blots, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Lhc*-Sequenz aus *Pinus sylvestris* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

Unten: Densitometrische Auswertung

der Autoradiogramme. Die relative *Lhc*-Transkriptmenge ergibt sich aus dem Quotienten *Lhc*/*rRNA*. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Dunkelphase. Die Punkte markieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die wiederum je aus 2-3 Einzelmesspunkten bestanden.

(Anzuchtbedingungen: Ernte 10-16 Wochen nach Aussaat, Temperatur: 18°C bzw. 20°C konstant, Lichtphase vor Dauerdunkel 8-20 Uhr bei 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

In einem weiteren Versuchsansatz wurden *Pinus sylvestris*-Samen in Sterilkultur auf 1/3 MS-Medium herangezogen. 18 Wochen nach der Aussaat wurden die jungen Pflanzen ins Dauerdunkel gebracht und zu verschiedenen Tageszeiten die Menge an *Lhc*-Transkript bestimmt. Wie bei der Anzucht auf Erde war eine circadiane Oszillation sichtbar, die gesamte Schwingung schien allerdings phasenverschoben zu sein, so dass die Maxima um 7 Uhr morgens und um Mitternacht 0 Uhr lagen. Der Quotient der *Lhc*-mRNA-Mengen von Maxima zu Minima betrug bei diesen Messungen 2,1 und unterschied sich damit kaum von den Ergebnissen bei der Anzucht auf Erde (Faktor 1,6 vgl. 3.1.1). Weiterhin lässt sich sagen, dass die Periode mit 18 h kleiner war als die bei *Pinus sylvestris*-Pflanzen, die auf Erde angezogen worden waren (Abb. 3.7).



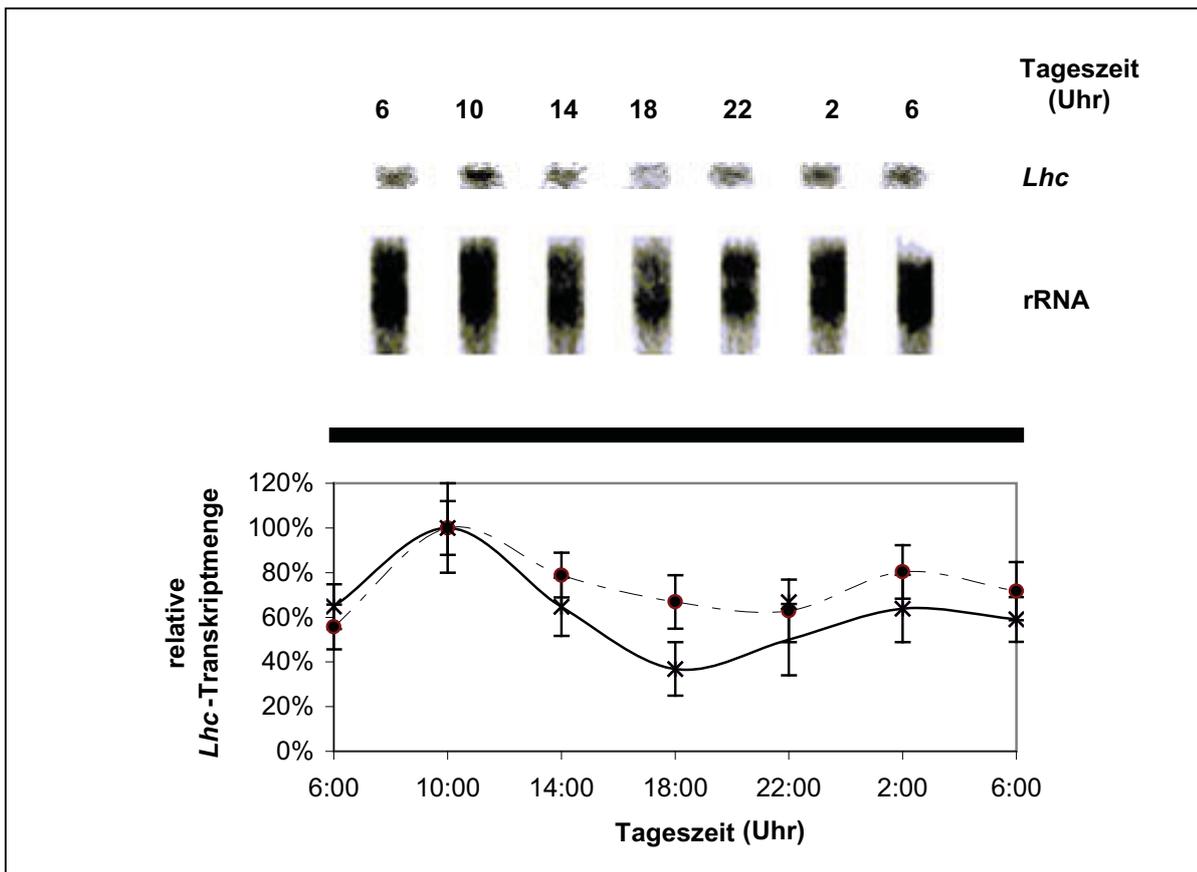
**Abb. 3.7 *Lhc*-Transkriptverteilung am sechsten Tag im Dauerdunkel in *Pinus sylvestris* bei Anzucht in Sterilkultur**

Oben: Autoradiogramm eines Northern Blots, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Lhc*-Sequenz aus *Pinus sylvestris* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

Unten: Die durchgezogene Linie markiert den Mittelwert eines Experiments, das aus 3 Einzelmesspunkten bestand. Die gestrichelte Linie gibt die Auswertung der Autoradiogramme aus Abb. 3.6 wieder, bei der die Anzucht auf Erde erfolgte. Die relative *Lhc*-Transkriptmenge ergibt sich aus dem Quotienten *Lhc*/ *rRNA*. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Dunkelphase.

(Anzuchtbedingungen: Ernte 18 Wochen nach Aussaat, Temperatur: 23°C konstant, Lichtphase vor Dauerdunkel 6-20 Uhr bei  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Auch bei *Ginkgo biloba* konnten sowohl am 4. wie auch am 6. Tag im Dauerdunkel circadiane Fluktuationen entdeckt werden (Abb. 3.8). Die Maxima dieser Schwingungen mit einer Periodenlänge von 24 h lagen am Vormittag bei 10-11 Uhr, die Minima bei 22-23 Uhr abends. Die Amplitude der Fluktuationen war am 4. Tag im Dauerdunkel besser sichtbar als 6. Tag. Die Quotienten aus den *Lhc*-mRNA-Mengen von Maximum zu Minimum betragen 2,7 (4. Tag Dauerdunkel) bzw. 1,6 (6. Tag Dauerdunkel).



**Abb. 3.8** *Lhc*-Transkriptverteilung am vierten und sechsten Tag im Dauerdunkel in *Ginkgo biloba*

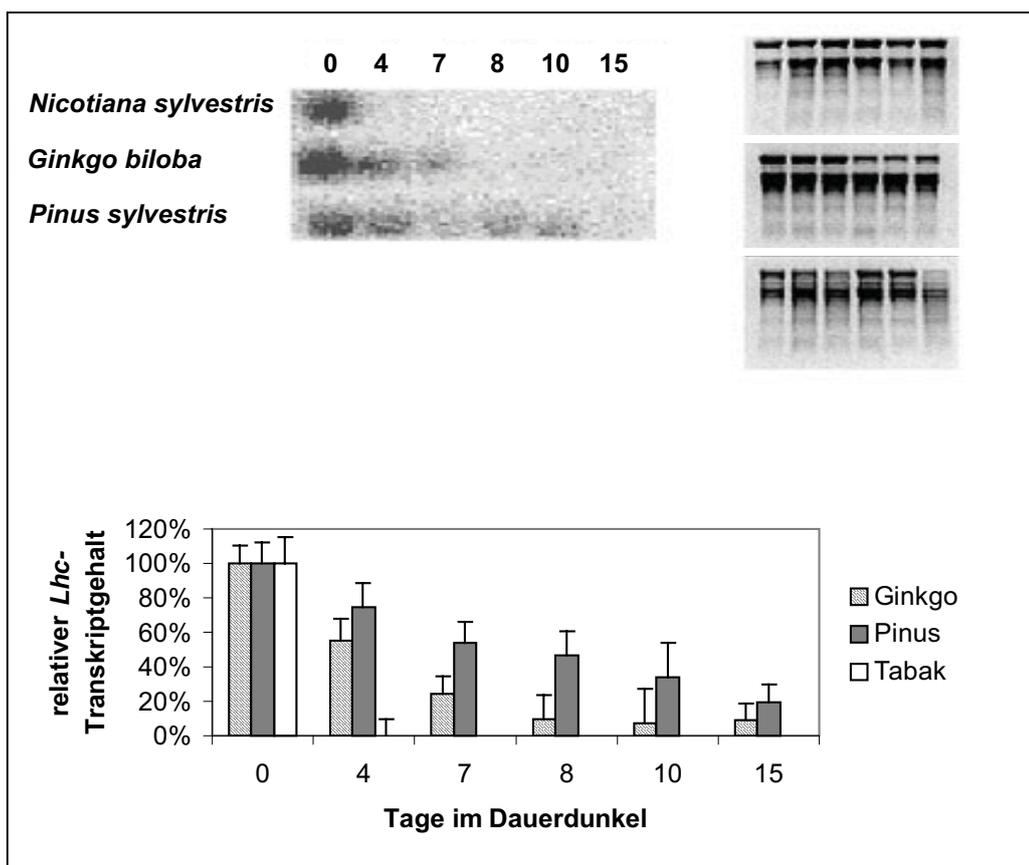
Oben: Autoradiogramm eines Northern Blots am 4. Tag im Dauerdunkel, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Lhc*-Sequenz aus *Ginkgo biloba* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde aus 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Die durchgezogene Linie stellt die densitometrische Auswertung der Autoradiogramme des vierten Tages dar, die gestrichelte die der des sechsten Tages.

Die relative *Lhc*-Transkriptmenge ergibt sich aus dem Quotienten *Lhc*/ *rRNA*. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert Dunkelphase. Die Punkte markieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die wiederum je aus 3 Einzelmesspunkten bestanden.

(Anzuchtbedingungen: Pflanzenalter 2 Jahre, Temperatur: 20°C- 21°C konstant, Lichtphase vor Dauerdunkel 7-19 Uhr bei 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in beiden untersuchten Gymnospermen (*Ginkgo biloba* und *Pinus sylvestris*) nur im Dauerdunkel, nicht aber im Licht-Dunkelwechsel Schwankungen in der *Lhc*-Transkriptmenge im Tagesverlauf festgestellt werden konnten.



**Abb. 3.9** *Lhc*-Transkriptgehalt um 12 Uhr mittags im Dauerdunkel in *Ginkgo biloba*, *Pinus sylvestris* und *Nicotiana sylvestris*

Oben links: Autoradiogramme der Northern Blots, hybridisiert mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden aus *Lhc*-Sequenzen von *Ginkgo biloba* oder *Pinus sylvestris* bzw. einer radioaktiv markierten 0,55kb *Lhc*-Sonde aus *Lycopersicon esculentum*.

Oben rechts: Fotos der mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegele vor dem Blotten.

Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme.

Jeder Messpunkt markiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten, die wiederum je aus 2-3 Einzelmesspunkten bestanden.

(Anzuchtbedingungen:

*Pinus sylvestris*: 4 Wochen alte Pflanzen, Anzucht auf Erde

*Ginkgo biloba*: Pflanzen 4 Monate alt

*Nicotiana sylvestris*: 8 Wochen alte Pflanzen, Anzucht auf Vermiculite

Kultivierungsbedingungen: 20°C konstant, 120µmol/ms, Lichtphase von 6-20 Uhr

Versuchsbedingungen: 20°C konstant, Dauerdunkel)

Die oben beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass auch nach 6 Tagen im Dauerdunkel in den Gymnospermen *Ginkgo biloba* und *Pinus sylvestris* noch *Lhc*-Transkript nachweisbar ist. Um zu prüfen, ob diese Transkripte auch über diesen Zeitraum hinaus noch nachweisbar sind und diese Ergebnisse mit der Gruppe der Angiospermen vergleichen zu können, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

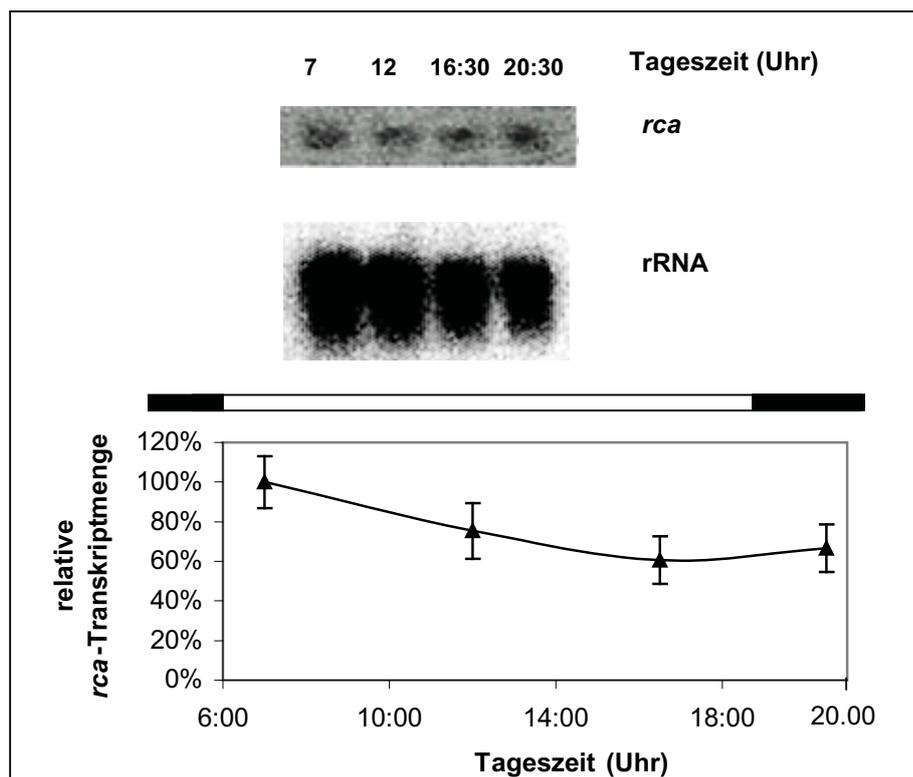
Die Angiosperme *Nicotiana sylvestris* und die Gymnospermen *Ginkgo biloba* und *Pinus sylvestris* wurden für einige Tage im Dauerdunkel kultiviert und jeweils am 4., 7., 8., 10. und 15.Tag um 12 Uhr mittags Blattmaterial geerntet. In den beiden Gymnospermen *Pinus sylvestris* und in *Ginkgo biloba* ließ sich an allen untersuchten Zeitpunkten *Lhc*-mRNA

nachweisen. Selbst nach 15 Tagen im Dauerdunkel konnte über Northern-Blot-Analysen *Lhc*-Transkript detektiert werden (Abb. 3.9). Die *Lhc*-mRNA-Konzentrationen sanken dabei im Laufe der Zeit deutlich ab (Abb. 3.9). In der Angiosperme *Nicotiana sylvestris* konnte im Unterschied dazu schon am zweiten Erntezeitpunkt, d. h. nach vier Tagen in Dauerdunkel, kein *Lhc*-Transkript mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.9).

### 3.1.3 Expressionsmuster anderer Gene in Angiospermen und Gymnospermen

In dieser Arbeit sollten die Transkriptmengen anderer Gene im Tagesverlauf bestimmt werden, um zu untersuchen, ob neben *Lhc* weitere Gene zwar in Angiospermen, nicht aber in Gymnospermen diurnal/circadian reguliert sind. Leider existieren nur wenige Sequenzinformationen über Gene aus Gymnospermen, deren Transkriptmengen in Angiospermen einem diurnalen bzw. circadianen Verlauf folgen. Deshalb wurde versucht, mit heterologen Sonden spezifisch sequenzähnliche und damit homologe Transkripte zu detektieren. Für die Untersuchungen wurden Blätter der Gymnospermen von *Ginkgo biloba* und *Gnetum gnemon* bzw. 10-16 Wochen alte Pflanzen von *Pinus sylvestris* und *Picea abies* im Tagesverlauf geerntet, Gesamt-RNA isoliert und Transkriptanalysen mittels Northern Blot durchgeführt. Die Filter wurden dazu radioaktiv mit vier verschiedenen heterologen bzw. homologen Sonden hybridisiert:

1. RuBisCO-Aktivase (circadian exprimiert in *Arabidopsis thaliana*; Liu et al. 1996)
2. Glutaminsynthetase (diurnal exprimiert in *Lycopersicon esculentum*; Becker et al. 1992)
3. Katalase (circadian exprimiert in *Arabidopsis thaliana*, Zhong et al. 1997)
4. Glycin reiches Protein (circadian exprimiert in *Arabidopsis thaliana*, Heinzen et al. 1997)



**Abb. 3.10** *rca*-Transkriptverteilung in *Gnetum gnemon* im Licht-Dunkelwechsel

Oben: Autoradiogramm eines Northern Blots, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten 2,3kb EcoRI-Fragments des *rca*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde aus 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

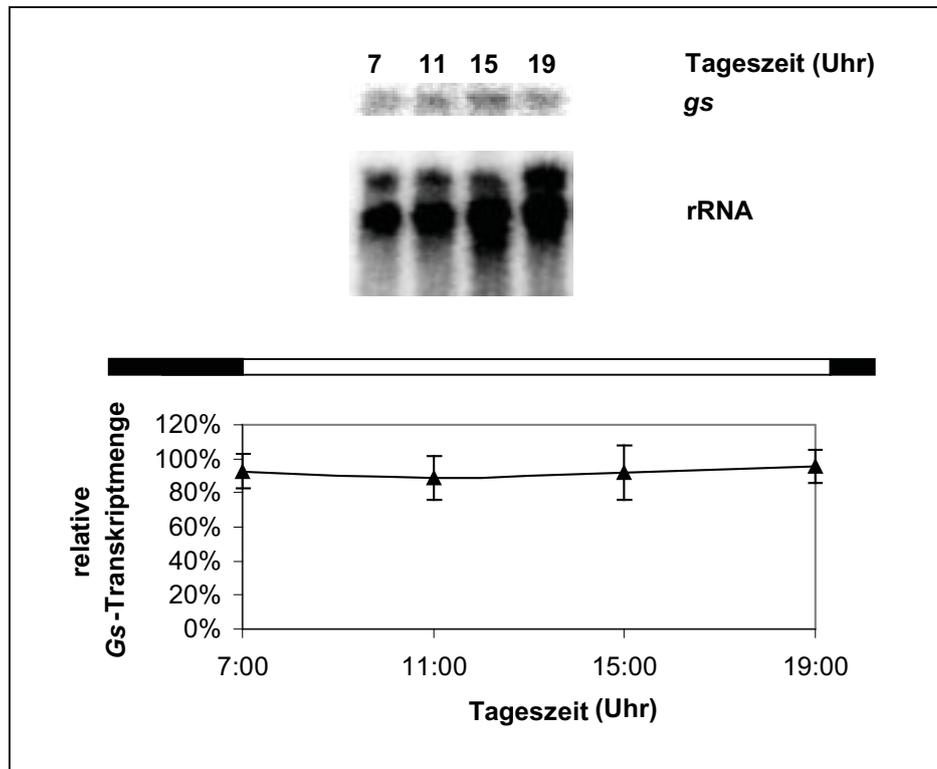
Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase. Die Punkte markieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

(Anzuchtbedingungen: natürliche Temperatur und Lichtverhältnisse, Mai bzw. August)

Nach der Hybridisierung von RNA aus Pflanzenmaterial von *Gnetum gnemon* lies sich ein nicht diurnaler Verlauf der Transkriptakkumulation der RuBisCO-Aktivase (*rca*) (Abb. 3.10) beschreiben. Das bei verschiedenen Angiospermen deutlich ausgeprägte detektierte Maximum am frühen Morgen konnte zwar bei *Gnetum gnemon* ansatzweise auch erfasst werden, allerdings sank die Menge an *rca*-Transkript von 100% im Tagesverlauf nur auf etwa 60%. Das Verhältnis von Maximum zu Minimum betrug somit nur 1,7 und war somit deutlich geringer als bei Angiospermen.

Für die Hybridisierung von RNA aus *Pinus sylvestris* konnte eine homologe Sonde verwendet werden. Dazu wurde ein 556 bp-Fragment der Glutaminsynthetase mit Hilfe der PCR-Technik aus genomischer DNA amplifiziert, kloniert und sequenziert. Dieses so erhaltene Fragment aus der Glutaminsynthetase (*gs*) aus *Pinus sylvestris* wurde radioaktiv markiert und für die Hybridisierung eingesetzt. In Abb. 3.11 ist erkennbar, dass die *gs*-Transkriptakkumulation in *Pinus sylvestris* keine diurnalen Schwankungen durchlief. Die *gs*-

mRNA-Konzentration änderte sich nicht im Tagesverlauf und konnte somit als konstant beschrieben werden.



**Abb. 3.11 gs-Transkriptverteilung in *Pinus sylvestris* im Licht-Dunkelwechsel**

Oben: Autoradiogramm eines Northern Blots, hybridisiert mit einer radioaktiv markierten Sonde der Glutaminsynthetase aus *Pinus sylvestris* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase. Die Punkte markieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die wiederum je aus 2 Einzelmesspunkten bestanden.

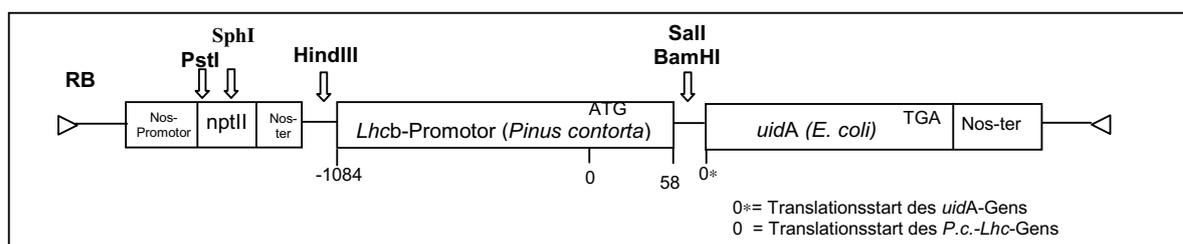
(Anzuchtbedingungen: Temperatur: 18°C konstant, Lichtphase 8-20 Uhr bei  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Die Hybridisierungen mit den Sonden *cat* und *grp* ergaben keine auswertbaren Ergebnisse. Entweder traten keine Hybridisierungssignale auf oder aber die markierte Sonde erkannte unspezifisch alle auf dem Blot vorhandenen RNA-Spezies.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neben *Lhc* mindestens zwei weitere Gene (*rca* in *Gnetum gnemon*, *gs* in *Pinus sylvestris*) in Gymnospermen nicht diurnal schwankende Transkriptlevel aufwiesen, die in Angiospermen rhythmisch circadian/diurnal sind.

### 3.1.4 Expression von Reporter genen unter der Kontrolle verschiedener Promotoren in Angiospermen und Gymnospermen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gymnospermenarten *Pinus sylvestris*, *Ginkgo biloba* und *Pinus contorta* zeigten sich im Licht-Dunkelwechsel keine diurnalen Schwankungen im *Lhc*-Transkriptgehalt im Tagesverlauf (3.1.1). Aus der Literatur ist bekannt, dass der Promotor eines Gens maßgeblich zur Ausprägung der Expression beitragen kann. Deshalb wurden in dieser Arbeit vergleichende Promotorstudien durchgeführt. So sollte in einem ersten Ansatz ermittelt werden, ob in Gymnospermen Trans-Faktoren fehlen, die eine durch den Promotor vermittelte diurnale Genexpression verursachen oder aber Transkriptionsfaktoren vorhanden sind, die die Transkription mit immer gleicher Rate ablaufen lassen. In beiden Fällen würden die *Lhc*-Gene in Gymnospermen konstitutiv exprimiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das in Abb. 3.12 skizzierte Konstrukt (p*Lhcb*::*uidA*::*nos*, Jäschke 1996) mit einem Gymnospermen-*Lhc*-Promotor und einem Reporter gen in eine Angiosperme eingeführt und der Transkriptgehalt des Reporter gens ermittelt.



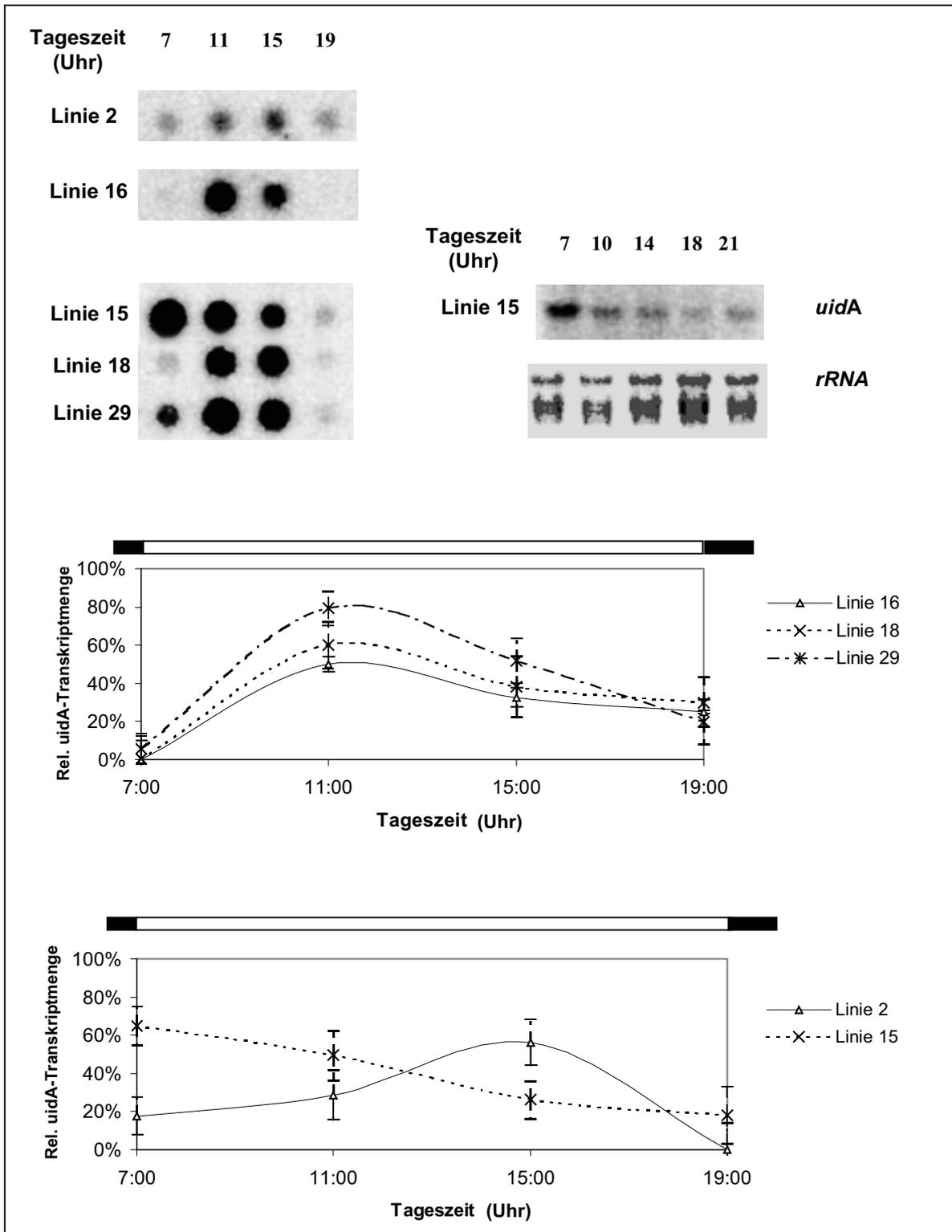
**Abb. 3.12 Promotor::Reporter gen-Konstrukt (p*Lhcb*::*uidA*::*nos*)**

Ein 1,1 kb großes Promotorfragment des *Lhcb*-Gens aus *Pinus contorta* wurde stromaufwärts vor ein Reporter gen (*uidA*, kodiert für Beta-Glucuronidase) kloniert und über *Agrobacterium tumefaciens* in die Angiosperme *Nicotiana tabacum* transferiert. Im Verlauf dieser Arbeit wurde von 5 verschiedenen Linien Blattmaterial im Tagesverlauf geerntet, Gesamt-RNA isoliert und die *uidA*-Transkriptmenge über Dot Blot- und Northern Blot-Technik bestimmt. In mehreren unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die *uidA*-Transkriptmenge in den Linien 16, 18 und 29 einem diurnalen Rhythmus folgte, bei dem das Maximum zur Mittagszeit (11 Uhr) erreicht wurde (Abb. 3.13). Diese Beobachtung entspricht der erwarteten *Lhc*-Transkriptakkumulation in einer Angiosperme wie z. B. *Helianthus annuus* (Abb. 3.1). Die Ausprägung der Schwingung unterschied sich in den einzelnen Linien. Die Amplitude reicht von 55%, 65%, 83% Unterschied zwischen Maximum und Minimum.

Die *uidA*-Transkriptakkumulationen in Linie 2 und 15 zeigten ebenfalls einen diurnalen Rhythmus, deren Maxima allerdings in den Nachmittag (15 Uhr, Linie 2) bzw. in den frühen Morgen (7 Uhr, Linie 15) verschoben waren.

Diese Experimente wurden mit Pflanzen der F0-Generation durchgeführt. Um zu überprüfen, ob diese Resultate aufgrund einer stabilen Integration des Transgens auftreten, wurden gleiche Messungen auch in der F1-Generation vorgenommen. Die Expression des Reportergens war bei diesen Experimenten sehr viel geringer als in der F0-Generation. Trotzdem konnten tendenziell diurnale Schwankungen festgestellt werden, wenn auch mit deutlich kleinerer Amplitude. Für die statistische Auswertung wurden aber aufgrund der geringen Expression nur die Daten der F0-Generation verwendet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in allen transgenen Linien diurnale Schwingungen der Reportergentranskriptmenge gemessen werden konnten, deren Maxima aber nicht immer um die gleiche Tageszeit lagen. Daraus folgt, dass die Transkription des Reportergens *uidA* unter der Kontrolle des *Lhc*-Gymnospermenpromotors in der Angiosperme in jeder transgenen Linie diurnal erfolgte.



**Abb. 3.13 *uidA*-Transkriptverteilung in transgenen Tabakpflanzen *pLHCb::uidA::nos* der F0-Generation im Licht-Dunkelwechsel**

Oben links: Autoradiogramm der Dot Blots, hybridisiert mit einer radioaktiv markierten Sonde aus dem *uidA*-Gen  
 Oben rechts: Autoradiogramm eines Northern Blots der Linie 15, hybridisiert mit einer radioaktiv markierten Sonde aus dem *uidA*-Gen, darunter Foto des Gels, das für den Northern Blot verwendet wurde.

Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase. Die Punkte markieren die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten, die wiederum je aus 1-3 Einzelmesspunkten bestanden.

(Anzuchtbedingungen: Temperatur: 20-22°C Tag, 18°C Nacht, Lichtphase 7-19 Uhr bei 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

In der Literatur sind einige cis-regulatorische Elemente beschrieben, die eine tageszeitabhängige Promotoraktivität erzeugen können. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Untersuchung der Sequenz des verwendeten *Lhcb*-Promotorbereiches aus den oben dargestellten Experimenten auf die Anwesenheit solcher Motive dargestellt:

Motiv	Anzahl im p <i>Lhcb</i> -Promotor
CAA(N) <sub>4</sub> ATC	0
CAA(N) <sub>10</sub> ATC	1
GATA-BOX	12
GT1	12
I-BOX	3
REALPHALGLHCB21	1

**Tabelle 3.1 cis-regulatorische Motive im *Lhcb*-Promotorbereich aus *Pinus contorta***

(AC No. X 67714, 1141bp = -1140 bis 0, 0 = Translationsstart), ermittelt mit Hilfe der Datenbank PLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE>))

CAA(N)<sub>4</sub>ATC = Element in vielen Tomaten *Lhc*-Promotoren, deren Expression circadian erfolgt

CCA1-Bindestelle, CCA1 interagiert mit *Lhcb1\*3*-Promotor aus *Arabidopsis thaliana*

GATA-BOX = drei Wiederholungen wurden im *Lhc*-Promotor aus *Petunia* gefunden, nötig für hohe Expression, Lichtregulation und Gewebespezifität, konserviert in allen LHCII Typ I Genen

GT-1 = GT-1-Bindestelle in vielen lichtregulierten Genen

I-BOX = konservierte Region in Promotoren von lichtregulierten Genen in Monokotyledonen und Dikotyledonen

REALPHALGLHCB21 = REalpha, Element aus *Lemna gibba* *Lhc21*-Promotor, benötigt für Phytochrom-Regulation

Die Sequenz des *Lhcb*-Promotors von *Pinus contorta* enthielt konservierte Sequenzen wie GATA-BOX, GT1, I-BOX oder REALPHALGLHCB21 (Tabelle 3.3). Diese Elemente wurden bei dem Vergleich verschiedener Promotorregionen lichtregulierter Gene aus Angiospermen ermittelt. Darüber hinaus existiert das Motiv CAA(N)<sub>4</sub>ATC, das in 81% aller bekannten *Lhc*-Promotorsequenzen in Angiospermen vorkommt (Piechulla et al. 1998). In einer modifizierten Form CAA(N)<sub>10</sub>ATC war es auch in dem betrachteten *Lhcb*-Promotor vorhanden. Wird ein Reporter gen unter der Kontrolle des beschriebenen *Lhc*-Gymnospermenpromotors in der Angiosperme exprimiert, lassen sich diurnale Schwankungen detektieren (Abb. 3.13). Diese Beobachtung könnte für eine korrekte Erkennung zumindest eines Teils der oben beschriebenen Sequenzelemente durch die Transkriptionsmaschinerie der Angiosperme Tabak sprechen.

In einem weiteren Ansatz sollte untersucht werden, ob ein Angiospermen-*Lhc*-Promotor in der Lage ist, in einer Gymnosperme eine rhythmische Genexpression zu bewerkstelligen. Deshalb wurden transgene Gymnospermen erzeugt, die ein Reporter gen-Konstrukt mit einem Promotor enthielten, dessen diurnale bzw. circadiane Genregulation in Angiospermen

nachgewiesen worden war. Dazu fanden in dieser Versuchsreihe die beiden folgenden Konstrukte Verwendung (Merforth 1996):

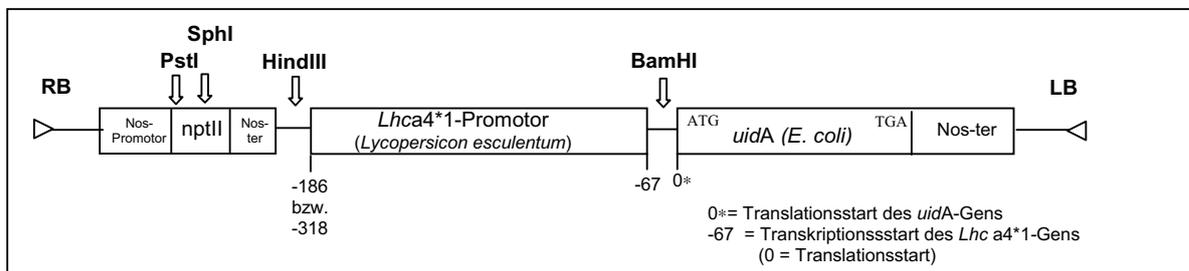
Zwei unterschiedlich lange Abschnitte des *Lhc4\*1*-Promotors aus *Lycopersicon esculentum* wurden stromaufwärts vor ein Reporterogen (*uidA*, kodiert für Beta-Glucuronidase) kloniert:

1. ein Fragment der Länge 119bp :

$\Delta 119$  (-186 bis -67; 0 = Translationsstart) der 5'-Region des *Lhc4\*1*-Gens (*cab11*) aus *Lycopersicon esculentum* bzw.

2. ein Fragment der Länge 251bp :

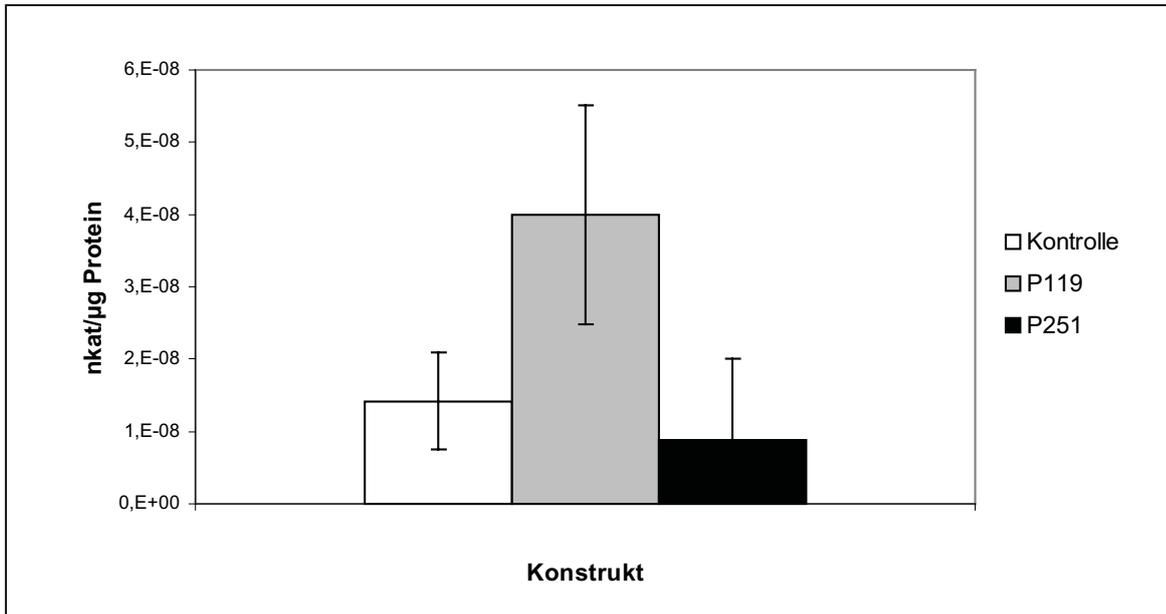
$\Delta 251$  (-318 bis -67; 0 = Translationsstart) der 5'-Region des *Lhc4\*1*-Gens (*cab11*) aus *Lycopersicon esculentum*



**Abb. 3.14 Promotor::Reportergen-Konstrukte ( $\Delta 119::uidA::nos$ ,  $\Delta 251::uidA::nos$ )**

Im Anschluss wurden beide Konstrukte  $\Delta 119::uidA::nos$  und  $\Delta 251::uidA::nos$  durch die Partikelbombardement-Technik in embryonische *Picea abies*-Zellen transferiert. Apel und Klopstech (1978) sowie Karlin-Neumann et al. (1988) haben beschrieben, dass *Lhc*-Transkripte nur in grünen Gewebeteilen zu finden sind. Gilt dieser Sachverhalt auch für den hier verwendeten *Lhc4\*1*-Promotor, so wäre eine Expression des Reportertranskripts in den farblosen embryonischen Zellen von *Picea abies* nicht zu erwarten. Um die transiente Expression der Konstrukte in den bombardierten Gymnospermen-Zellen zu ermitteln, wurde Gesamt-Protein aus den Zellen isoliert und mit einem Puffer versetzt, in dem sich bei Anwesenheit von GUS-Protein quantitativ MU (4-Methylumbelliferon) aus MUG (4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid) bildete. Nach 20 h wurde diese Reaktion gestoppt und die Fluoreszenz der Proben im Fluorimeter gemessen. Um mit anderen Messungen vergleichbare Werte zu erhalten, wurde eine Eichgerade erstellt, bei der die Fluoreszenz verschiedener MU Konzentrationen ermittelt werden konnte. Daraus ließen sich die Enzymaktivität in nkat/ $\mu$ g Protein errechnen. Wie aus Abb. 3.15 ersichtlich ist, konnte bei dem längeren  $\Delta 251$ -*Lhc4\*1*-Promotorfragment wie erwartet keine transiente Expression im

Vergleich zur Kontrolle (nicht bombardierte *Picea abies*-Zellen) gemessen werden. Das kürzere  $\Delta 119$ -Promotorfragment zeigte jedoch eine transiente Expression des GUS-Proteins.



**Abb. 3.15 Fluoreszenzmessungen von embryonischen *Picea abies*-Zellen nach Bombardement mit Promotor-Reportergenkonstrukten.**

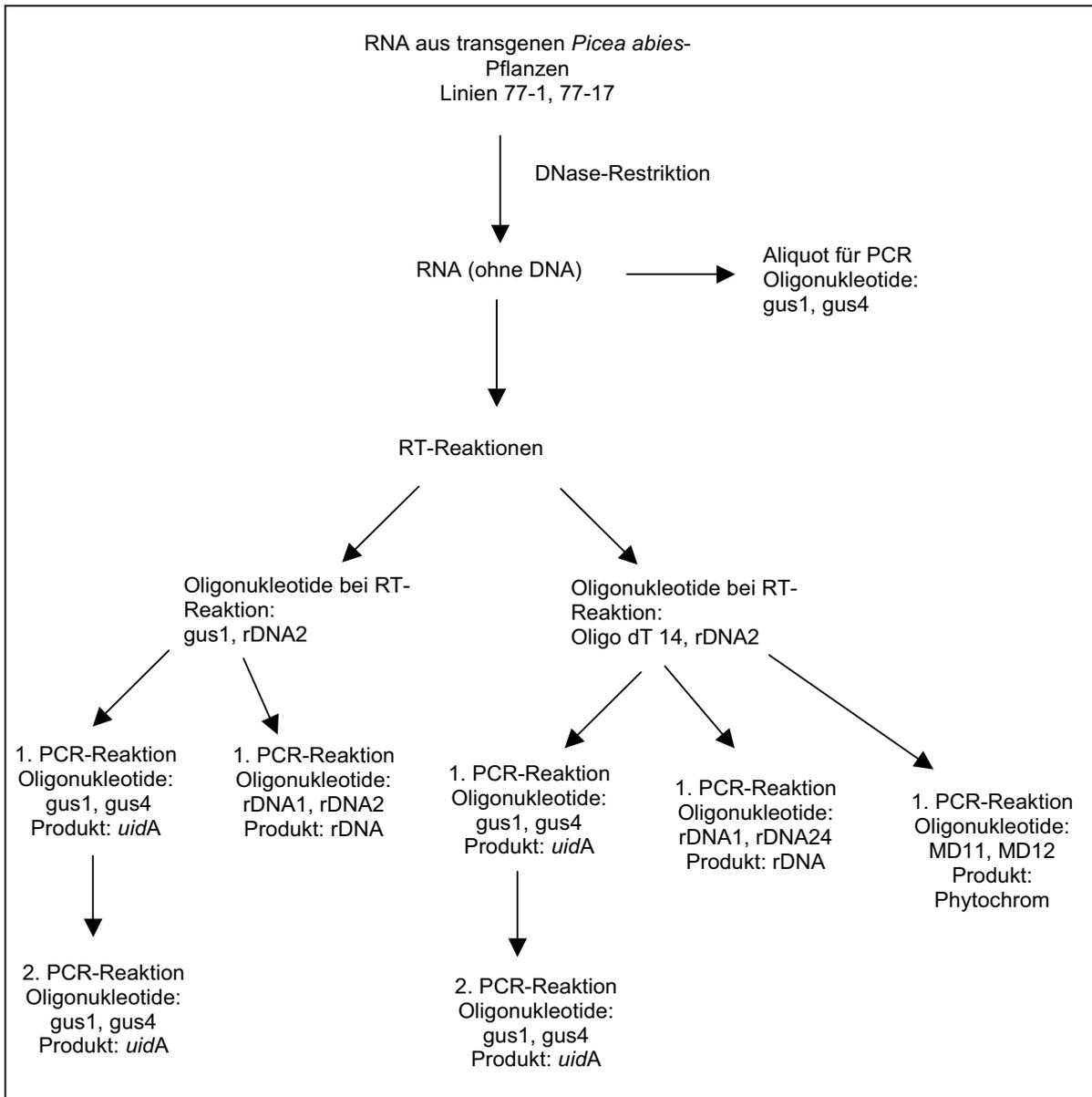
Gemessen wurde die Menge an fluoreszierendem MU (4-Methylumbelliferon), das durch die Aktivität von GUS-Protein aus MUG (4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid) umgesetzt wurde.

An den mit den Promotorkonstrukten bombardierten Zellen wurden in einem weiteren Ansatz histochemische Färbungen vorgenommen, bei denen x-Gluc in Anwesenheit von GUS-Protein in einen Indolfarbstoff umgesetzt wurde. In diesen Ansätzen konnte aber keine Farbreaktion detektiert werden, da vermutlich die Expression des GUS-Proteins in diesen Ansätzen zu gering ist (persönliche Mitteilung von Dr. David Clapham, Universität Uppsala, Schweden).

Nach Apel und Kloppstech (1978) sowie Karlin-Neumann et al. (1988) sollten beide Fragmente des *Lhc4\*1*-Promotors in grünen Gewebeteilen, wie z. B. den Wirteln einer regenerierten transgenen *Picea abies*-Pflanze, aktiv sein. Ob diese Hypothese zutrifft, ließ sich durch die Erzeugung transgener *Picea abies*-Pflanzen und der Expression in dem grünen Gewebe überprüfen. Im Januar 1999 wurden die Bombardements mit den verschiedenen langen *Lhc4\*1*-Promotor-Fragmenten ( $\Delta 119::uidA::nos$ ,  $\Delta 251::uidA::nos$  vgl. Abb. 3.14) durchgeführt. Leider konnten bis zum Dezember 2001 nur Pflanzen mit dem  $\Delta 251$ -Fragment (das keine transiente Expression in bombardierten embryonischen *Picea abies*-Zellen zeigte, Abb. 3.15) untersucht werden, denn nur diese wurden erfolgreich regeneriert und weiter angezogen. An der Universität Uppsala werden aber momentan auch Linien regeneriert, die das kürzere  $\Delta 119$ -Promotor-Reportergenkonstrukt tragen. Aufgrund der langen Dauer der

Regenerations- und Wachstumsprozesse der transgenen *Picea abies*-Pflanzen können weitere Untersuchungen frühestens im Herbst 2002 durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, ausreichend Material von zwei verschiedenen Linien (77-1, 77-17) transgener *Picea abies*-Pflanzen mit dem Konstrukt  $\Delta 251::uidA::nos$  im Tagesverlauf zu ernten. Im Anschluss sollte mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR die Menge an *uidA*-Transkript bestimmt werden. Dazu wurde wie in Abb. 3.16 schematisch skizziert verfahren.



**Abb. 3.16 Untersuchungen zur Bestimmung der Expression eines stabil integrierten Transgens in *Picea abies* über reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)**

Die Methode der quantitativen RT-PCR wurde aus verschiedenen Gründen gewählt:

1. Über die Expression des Transgens in *Picea abies* mit Hilfe von *Lhc*-Promotoren aus Angiospermen ist nichts bekannt. Die Methode der RT-PCR wird in der Literatur als sehr viel sensitiver im Vergleich zur Northern Blot-Technik beschrieben. Aus diesem Grund sollte es möglich sein, auch bei einer geringen Expression des Transgens noch quantifizierbare Signale zu erhalten.
2. Da der Regenerationsprozess und das Wachstum transgener *Picea abies*-Pflanzen langsam erfolgt, wäre eine Detektion des *uidA*-Transkriptes mittels Northern Blot Analysen und deren statistische Auswertung auch aufgrund der geringen RNA-Mengen nur schwer möglich gewesen.

Bei einer quantitativen RT-PCR wird eine Basisgröße benötigt, auf die die detektierten Transkriptmengen bezogen werden können. In Pflanzen unterliegt der Transkriptgehalt der rRNA nur sehr geringen Schwankungen (K. Apel, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund konnte die Menge dieses Transkripts als konstanter Parameter in allen Proben angesehen werden und sollte als Nivellierungsgröße dienen. Da die rRNA aber im Gegensatz zur mRNA kein Poly-A-Ende trägt, wurde die zugehörige cDNA unter Verwendung eines rRNA-spezifischen Oligonukleotids (rDNA2) gebildet.

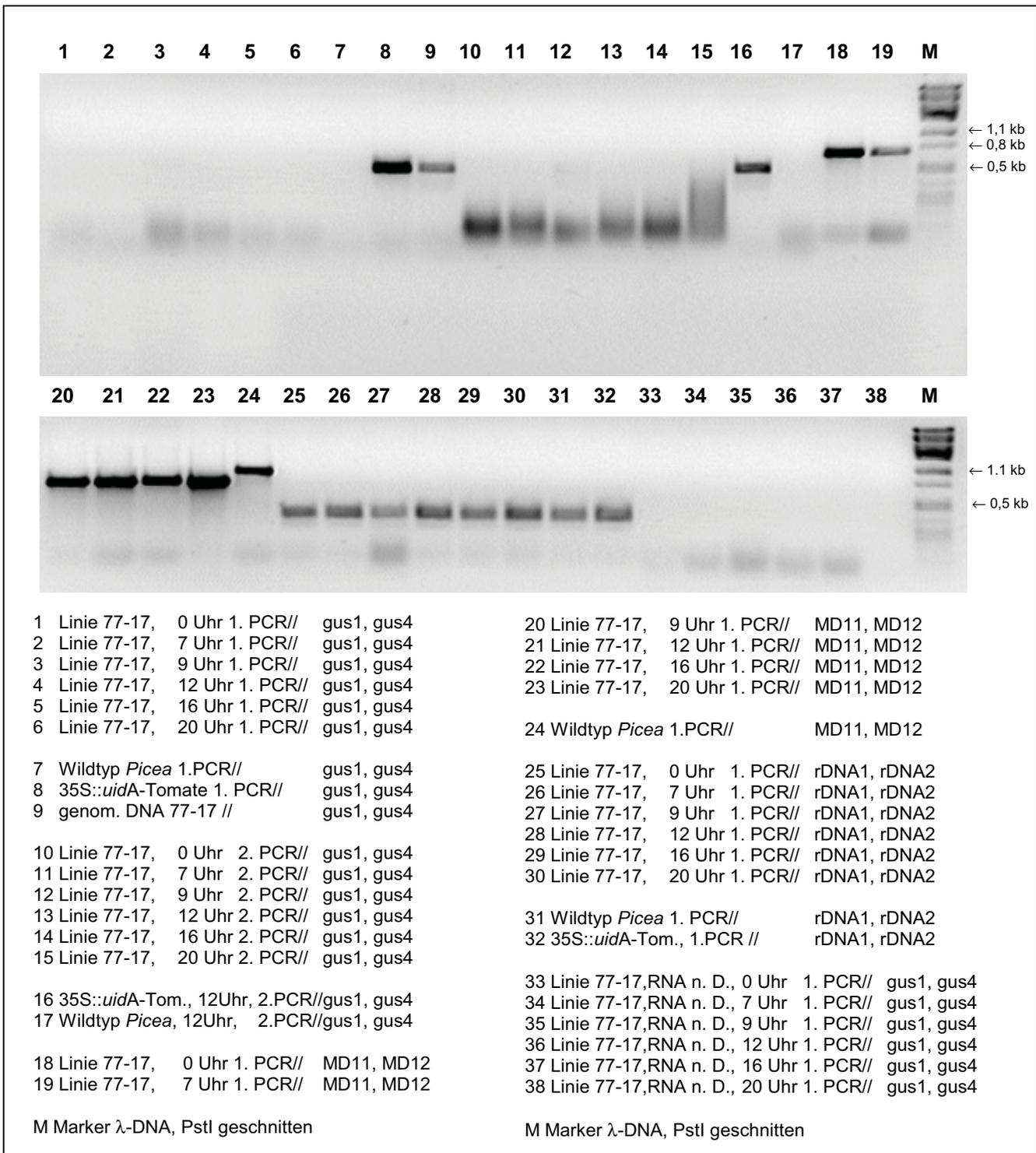
Aus dem geernteten Pflanzenmaterial wurde genomische DNA und die Gesamt-RNA isoliert. Mit der DNA der transgenen Pflanzen der Linien 77-1 und 77-17 wurde eine PCR mit *uidA*-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Auf einem Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung war das erwartete Fragment von 486bp sichtbar (Spur 9, Abb. 3.17). Somit konnte gezeigt werden, dass das Transgen  $\Delta 251::uidA::nos$  stabil ins Genom von *Picea abies* integriert war. Bei einer Probe, die genomische DNA des Wildtyps von *Picea abies* enthielt, wurde das Fragment wie erwartet nicht erhalten (Spur 17, Abb. 3.17).

In weiteren Untersuchungen wurde die Gesamt-RNA aus beiden transgenen Linien (77-1, 77-11) einer DNA-Restriktion unterworfen, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Da die Ergebnisse für beide Linien identisch waren, werden im Folgenden exemplarisch die Ergebnisse für Linie 77-17 gezeigt. Um sicher zu gehen, dass die DNA-Restriktion vollständig verlaufen war, wurde ohne vorherige RT-Reaktion auf einem Aliquot dieser RNA eine PCR mit den *uidA*-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Das Fehlen einer Bande, die aber bei Verwendung von genomischer DNA oder RNA ohne DNA-Restriktion auftauchte, stellte sicher, dass alle erhaltenen Produkte von der über reverse Transkription produzierten cDNA stammten (Spuren 33 bis 38, Abb. 3.17).

Nach der Beseitigung der DNA-Kontaminationen wurden in zwei verschiedenen Versuchsansätzen reverse Transkriptionen mit Hilfe der AMV-RTase durchgeführt:

1. Reverse Transkription in Anwesenheit eines rRNA-spezifischen Oligonukleotids (rDNA2) und eines Oligo-dT-Oligonukleotids
2. Reverse Transkription in Anwesenheit eines rRNA-spezifischen Oligonukleotids (rDNA2) und eines *uidA*-spezifischen Oligonukleotids (*gus1*)

Wird wie im ersten Versuchsansatz eine Reverse Transkription in Anwesenheit eines rRNA-spezifischen Oligonukleotids (rDNA2) und eines Oligo-dT-Oligonukleotids durchgeführt, so sollte die cDNA aus komplementären Sequenzen der rRNA und dem vollständigen Pool aller mRNAs bestehen. Im Anschluss wurden PCR-Reaktionen mit rDNA und *uidA* spezifischen Oligonukleotiden (rDNA1, rDNA2// *gus1*, *gus4* in getrennten Ansätzen) durchgeführt. Das erwartete Fragment für die rDNA mit einer Länge von 305bp konnte mit Hilfe eines Agarosegels mit anschließender Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht werden (Spuren 25-30, Abb. 3.17). In den Ansätzen mit beiden *uidA*-Primern tauchten keine Banden mit einer Größe von 486bp auf (Spuren 1-6, Abb. 3.17). Um sicher zu gehen, dass in der Tat kein *uidA*-Produkt vorlag (und nicht eine zu geringe Konzentration für die visuelle Wahrnehmung), wurde mit einem Aliquot des 1. PCR-Ansatzes eine zweite PCR-Reaktion mit den *gus1/gus4*-Oligonukleotiden durchgeführt. Auch nach Analyse dieser Ansätze konnte kein Produkt in erwarteter Größe (486bp) detektiert werden (Spuren 10-15, Abb. 3.17). Um zu überprüfen, ob die Reaktion mit dem Oligo-dT-Primer den Erwartungen entsprechend verlaufen war (also der komplette Pool an mRNA in cDNA umgeschrieben vorlag), sollte zusätzlich nach der reversen Transkription ein weiteres Transkript (Phytochrom) nachgewiesen werden. Nach der PCR-Reaktion mit für Phytochrom spezifischen Oligonukleotiden (MD11, MD12) konnten auf einem Agarosegel die erwarteten Fragmente einer Länge von 709bp (Spuren 18-23, Abb. 3.17) detektiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die reverse Transkription der RNA-Proben der transgenen *Picea abies*-Pflanzen mit dem Oligo-dT-Primer erfolgreich abgelaufen war.



### Abb. 3.17 RT-PCR-Produkte der Linie 77-17

In der Legende wurde jeweils angegeben:

Quelle der DNA-Vorlage, Erntezeitpunkt der Probe, 1. oder 2. PCR-Reaktion, Oligonukleotidkombination .

n. D. = nach DNA-Restriktion

weitere Erläuterungen siehe Text

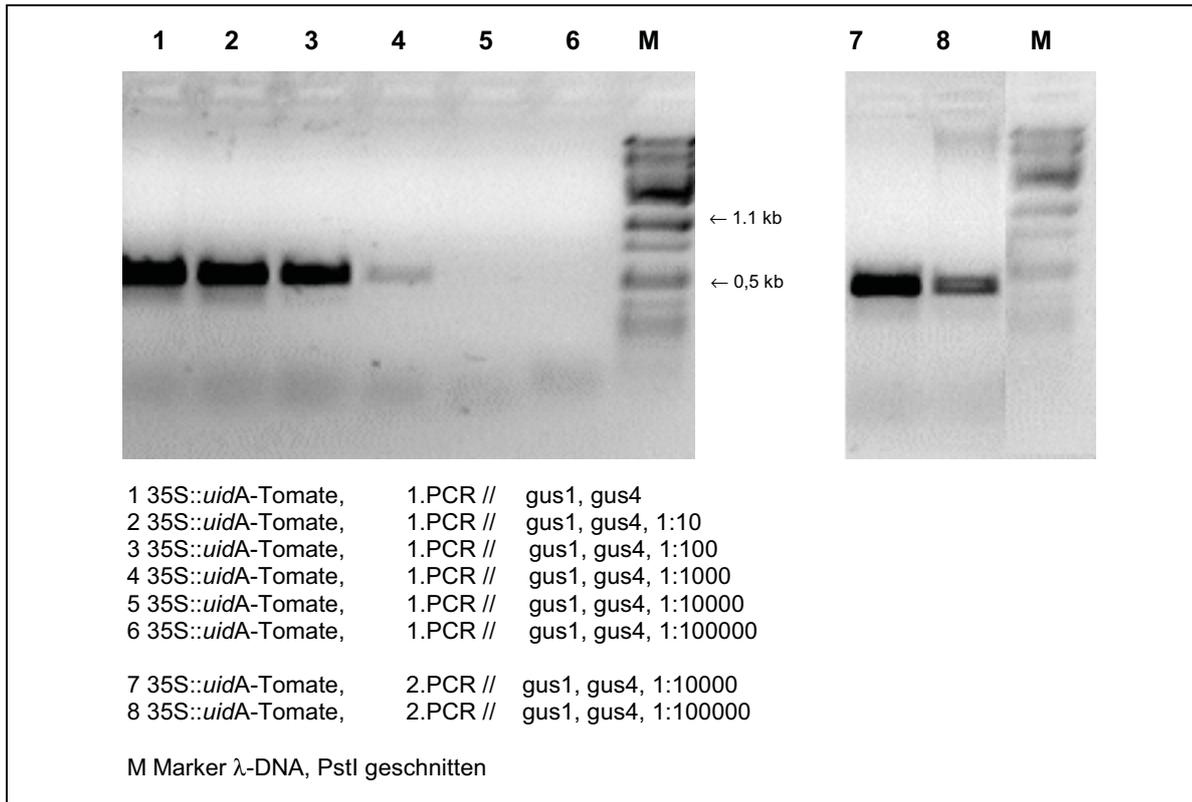
In einem zweiten Versuchsansatz wurde eine Reverse Transkription in Anwesenheit eines rRNA-spezifischen Oligonukleotids (rDNA2) und eines *uidA*-spezifischen Oligonukleotids (*gus1*) durchgeführt. In diesem Fall sollte die cDNA ausschließlich aus komplementären Sequenzen der rRNA und *uidA* bestehen. Nach der reversen Transkription wurde eine erste PCR mit rDNA und *uidA* spezifischen Oligonukleotiden (rDNA1, rDNA2// *gus1*, *gus4*) durchgeführt. Das erwartete Fragment für die rDNA mit einer Länge von 305bp konnte mit Hilfe eines Agarosegels mit anschließender Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht werden. In den Ansätzen mit beiden *uidA*-Primern tauchten keine Banden auf.

Wie im ersten Versuchsansatz wurde mit einem Aliquot des 1. PCR-Ansatzes eine zweite PCR-Reaktion mit den *gus1/gus4*-Oligonukleotiden durchgeführt. Auch nach Analyse dieser Ansätze konnte kein Produkt in erwarteter Größe (486bp) detektiert werden.

Es lässt sich somit festhalten, dass weder in der transgenen Linie 77-1 noch in der Linie 77-17 *uidA*-Transkript mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte.

Bei allen Experimenten wurde als Positivkontrolle RNA aus einer transgenen Tomatenpflanze, die das Konstrukt 35S-Promotor::*uidA*::nos enthielt, verwendet. Bei Einsatz dieser RNA konnten nach Reversen Transkription und der ersten PCR sowohl die kalkulierten Fragmente für *uidA* (486 bp, Spur 8, Abb. 3.18) als auch rDNA (308 bp, Spur 32, Abb. 3.18) auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden.

Zusätzlich wurde diese mittels Reverser Transkription hergestellte cDNA für die PCR in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Nach der ersten PCR mit *uidA*-spezifischen Oligonukleotiden war bei Verdünnung 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10000 ein entsprechendes Produkt (Spur 1-4, Abb. 3.18) erkennbar. Bei höheren Verdünnungen von 1:100.000 und 1:1.000.000 konnten *uidA*-spezifische Produkte erst nach einer zweiten PCR mit einem Aliquot des ersten Ansatzes detektiert werden (Spur 5, 6 nach erster PCR / Spur 7, 8 nach zweiter PCR). Somit lässt sich folgern, dass die RNA aus den transgenen *Picea abies*-Pflanzen weniger als den 1.000.000 Teil einer RNA-Probe aus einer transgenen Tomatenpflanze mit dem Konstrukt 35S-Promotor::*uidA*::nos enthalten muss.



**Abb. 3.18 RT-PCR-Produkte einer RNA-Probe einer 35S::uidA-Tomate (Erntezeitpunkt 12 Uhr)**

In der Legende wurde jeweils angegeben:

Spur auf dem Gel, Quelle der DNA-Vorlage, 1. oder 2. PCR-Reaktion, Oligonukleotidkombination.

n. D. = nach DNA-Restriktion

weitere Erläuterungen siehe Text

Mit Hilfe der folgenden Kalkulation kann berechnet werden, welche Menge an cDNA vom *uidA*-Transkript vor Start der 1. PCR mindestens hätte vorliegen müssen, wenn eine Bande auf dem Gel zu sehen gewesen wäre.

Bei einer ideal ablaufenden PCR-Reaktion gilt:

Die Teilchenanzahl  $N$  am Ende der Reaktion ergibt sich aus:

$$N = N_0 * 2^n$$

$N_0$  = Teilchenzahl vor Reaktionsstart

$n$  = Zyklenanzahl (in allen Experimenten = 30)

Daraus folgt

$$N_0 = N / 2^n$$

Wird davon ausgegangen, dass die Nachweisgrenze bei einem Agarosegel einer sichtbaren Bande auf dem Gel etwa bei 100ng ds DNA liegt, entspricht dies bei einer Größe des PCR-Produktes von 0,5 kb etwa 0,33 pmol. Mit Hilfe dieser Angabe kann errechnet werden,

welche Menge an cDNA des *uidA*-Transkript vor der zweiten PCR im Ansatz gewesen wäre, wenn eine sichtbare Bande detektiert worden wäre:

Nach der zweiten PCR wurden 15µl eines 100µl Gesamtansatzes auf das Gel aufgetragen.

Befänden sich in diesen 15µl 100ng (0,33 pmol), so wären in den 100µl des 2.PCR-Ansatz nach 2.PCR

$100\mu\text{l} / 15\mu\text{l} * 0,33 = 2,2 \text{ pmol Teilchen.}$

Mit  $N_0 = N / 2^n$  und  $1\text{mol} = 6,023 * 10^{23}$  Teilchen ergibt sich für die Ausgangsmenge vor der zweiten PCR:

$$N_{\text{vor 2. PCR}} = 2,2 \text{ pmol} / 2^{30} = (2,2 * 10^{-12} * 6,023 * 10^{23} \text{ Teilchen}) / 2^{30} \\ = 13,3 * 10^{11} / 10^9 \text{ Teilchen} = 1,3 * 10^3 \text{ Teilchen} = 1300 \text{ Teilchen}$$

Es müssten also vor der zweiten PCR mindestens  $1,3 * 10^3$  Teilchen cDNA des *uidA*-Transkript vorhanden sein, um eine Bande auf einem Agarosegel nach Färbung mit Ethidiumbromid zu detektieren. Somit lässt sich kalkulieren, welche Menge an cDNA vom *uidA*-Transkript vor Start der 1. PCR nötig wären, um ein Signal auf dem Gel sehen zu können.

$1,3 * 10^3$  Teilchen würden sich mindestens bei Sichtbarwerden einer Bande auf dem Gel im 2. PCR-Ansatz vor der 2. PCR-Reaktion befinden. Dieser war beim Übergang von der ersten zur zweiten PCR 1:33 verdünnt worden. Berechnet man diesen Verdünnungsfaktor mit ein, folgt:

$33 * 1,3 * 10^3 \text{ Teilchen} = 42,9 * 10^3 = 4,3 * 10^4 \text{ Teilchen}$  befänden sich im 1. PCR-Ansatz nach der ersten PCR-Reaktion.

Mit  $N_0 = N / 2^n$  ergibt sich daraus:

$$N_{\text{vor 1. PCR}} = 4,3 * 10^4 \text{ Teilchen} / 2^{30} = 4,3 * 10^4 \text{ Teilchen} / 10^9 = 4,3 * 10^{-5} \text{ Teilchen}$$

Die Zahl  $4,3 * 10^{-5}$  Teilchen entspricht

$$4,3 * 10^{-5} / 6,023 * 10^{23} \text{ mol} = 7 * 10^{-29} \text{ mol} = 7 * 10^{-14} \text{ fmol}$$

Daraus lässt sich folgendes ableiten: Wenn mindestens  $7 * 10^{-14}$  fmol an cDNA vom *uidA*-Transkript im Ansatz vor der ersten PCR und somit nach der reversen Transkription vorhanden wären, würde auf dem Gel eine Bande erscheinen. Da die Menge an cDNA des *uidA*-Transkript unter der Nachweisgrenze liegt (es ist keine Bande sichtbar), müssen weniger als  $7 * 10^{-14}$  fmol vorhanden sein. Dieser Wert kann mit Literaturdaten in Relation gesetzt werden:

In der Untersuchung von Kellmann et al. (1993) wurden mit der Primer-Extension-Technik die Transkriptmengen für 13 verschiedene *Lhc*-Gene aus Tomate in fmol pro mg Gesamt-RNA bestimmt. Es ergaben sich Werte von minimal 2,5 fmol *Lhcb1\*3* (*cab3C*)-Transkript

pro mg Gesamt-RNA bis maximal 100 fmol *Lhc1\*2*-Transkript pro mg Gesamt-RNA (Ernte zur Mittagszeit). In einem 1 µg Gesamt-RNA-Ansatz wären diesen Angaben zufolge  $2,5 \cdot 10^{-3}$  fmol *Lhcb1\*3* (*cab3C*)-Transkript vorhanden.

Laut Herstellerangaben (Clontech) erhält man bei einer reversen Transkription mit Hilfe der MMLV-RTase unter Einsatz von 1 µg PolyA-RNA und einem Oligo-dT-Primer etwa 300ng cDNA. Das entspricht einer Effizienz der reversen Transkriptase von ca. 30%.

Wenn bei der reversen Transkription ca. 30% des vorhandenen *Lhcb1\*3* (*cab3C*)-Transkriptes zu cDNA umgesetzt werden, erhält man eine cDNA-Konzentration von ca.  $10^{-3}$  fmol / µg. Dieser Wert ist um fast zwölf Zehnerpotenzen höher als die Nachweisgrenze von  $7 \cdot 10^{-14}$  fmol / µg RNA, die für die transgenen *Picea abies*-Pflanzen berechnet wurde. Das am geringsten konzentrierte *Lhc*-Transkript (*Lhcb1\*3*, *cab3C*) in der Tomate ließe sich ohne weiteres durch die hier verwendete sehr empfindliche Methode der RT-PCR nachweisen. Daraus kann gefolgert werden, dass in den transgenen *Picea*-Pflanzen nahezu keine Expression des *uidA*-Gens erfolgt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der stabil im Genom von *Picea abies* integrierter  $\Delta 251$ -*Lhc4\*1*-Promotor keine Expression eines Reportergens bewerkstelligt. Dieses Ergebnis korrespondiert mit dem des transienten Assays (Abb. 3.15) in den farblosen embryonischen *Picea abies*-Zellen. Ein kürzeres Fragment dieses Promotors ( $\Delta 119$ -*Lhc4\*1*) kann dagegen für eine transiente Expression eines Reportergens sorgen (Abb. 3.15); die Ergebnisse für eine Transkriptakkumulation dieses Promotors bei stabiler Integration in *Picea abies* stehen noch aus.

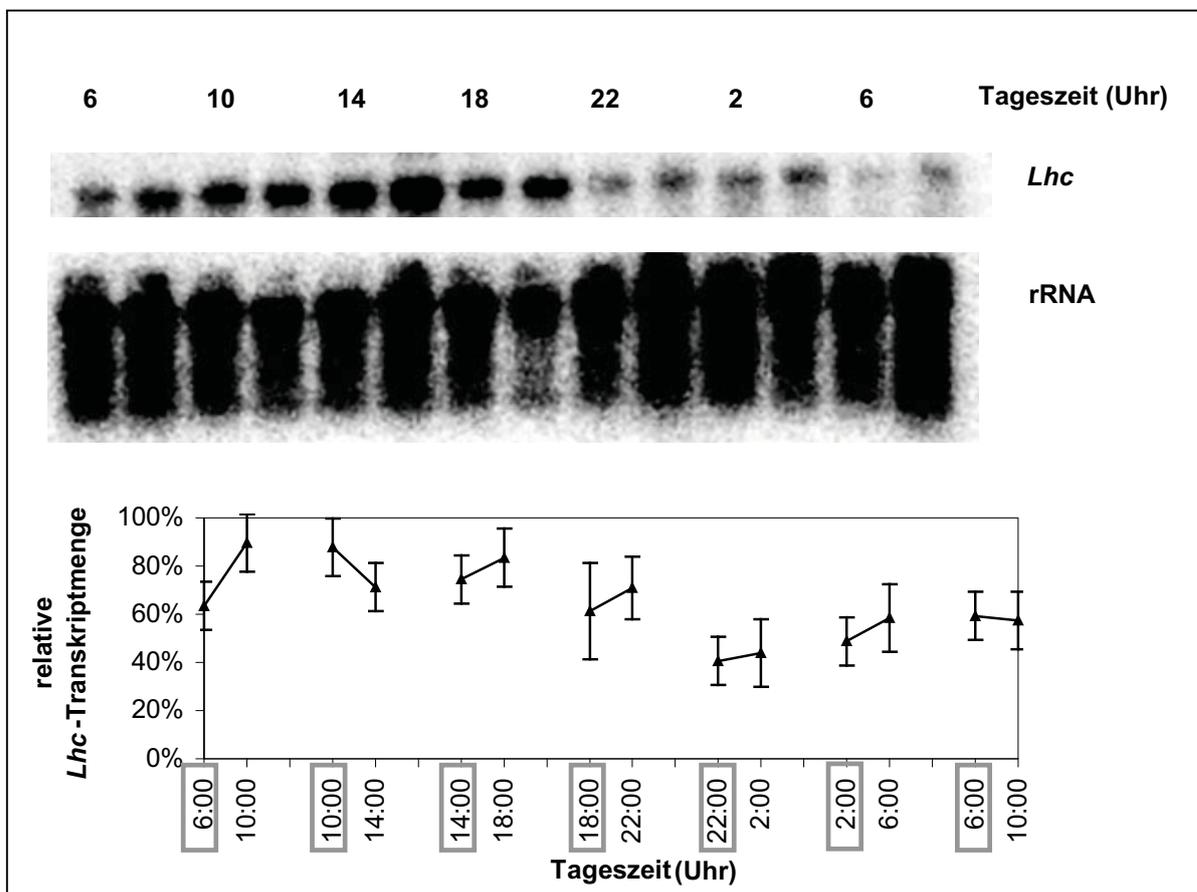
### **3.1.5 Reaktionen der *Lhc*-Transkriptmenge auf Lichteinstrahlung in *Ginkgo biloba* und *Pinus sylvestris* nach einigen Tagen im Dauerdunkel**

Licht ist ein wichtiger Faktor, der den Transkriptgehalt von Photosynthesegenen in einer Zelle beeinflussen kann. Die Expression eines *Lhc*-Promotor::Reportergen-Transkriptes (bzw. des zugehörigen Proteins) wurde in *Arabidopsis thaliana* nach Millar et al. (1996) durch drei Faktoren beeinflusst:

1. Beeinflussung durch einen circadianen Oszillator
2. Beeinflussung durch Licht
3. Beeinflussung durch weitere Faktoren wie z. B. die vorherigen Anzuchtbedingungen (Licht- bzw. Dunkelphase im LD-Zyklus)

Kann ein Effekt des Lichtes direkt oder nach kurzer Zeit im Anschluss an eine Bestrahlung detektiert werden, wird von einer akuten Antwort („acute“ response to light, Anderson und

Kay 1995) gesprochen. Das Ziel der folgenden Experimente war es, zu untersuchen, ob und wie die drei genannten Faktoren in Gymnospermen auf die *Lhc*-Genexpression miteinander wechselwirken. Dabei sollte ermittelt werden, in welchem Maß die Wirkung eines Lichtimpulses von der Tageszeit abhängig, die akute Antwort auf den Lichtreiz also zeitlich reguliert ist. Gleichzeitig wurden die Anzuchtbedingungen verändert, um einen möglichen Effekt dieser Größe detektieren zu können. Für die Untersuchungen wurden *Pinus sylvestris*-Keimlinge und *Ginkgo biloba*-Pflanzen verwendet. *Pinus sylvestris* wurde dabei entweder auf Erde oder in Sterilkultur angezogen, bei *Ginkgo biloba* erfolgte die Anzucht auf Erde. Das Pflanzenmaterial wurde für 3-5 Tage ins Dauerdunkel transferiert, dann zu verschiedenen Tageszeiten eine vierstündige Belichtung mit Weißlicht vorgenommen, Blattmaterial abgeerntet und die *Lhc*-Transkriptmenge bestimmt.



**Abb. 3.19** *Lhc*-Transkriptverteilung in *Pinus sylvestris* vor und nach 4 h Belichtung bei Anzucht auf Erde

Die Zeitpunkte der Ernte für die Werte der *Lhc*-Genexpression nach Dauerdunkel wurden dunkel umrandet. oben: Autoradiogramm eines Northern Blots, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Lhc*-Sequenz von *Pinus sylvestris* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

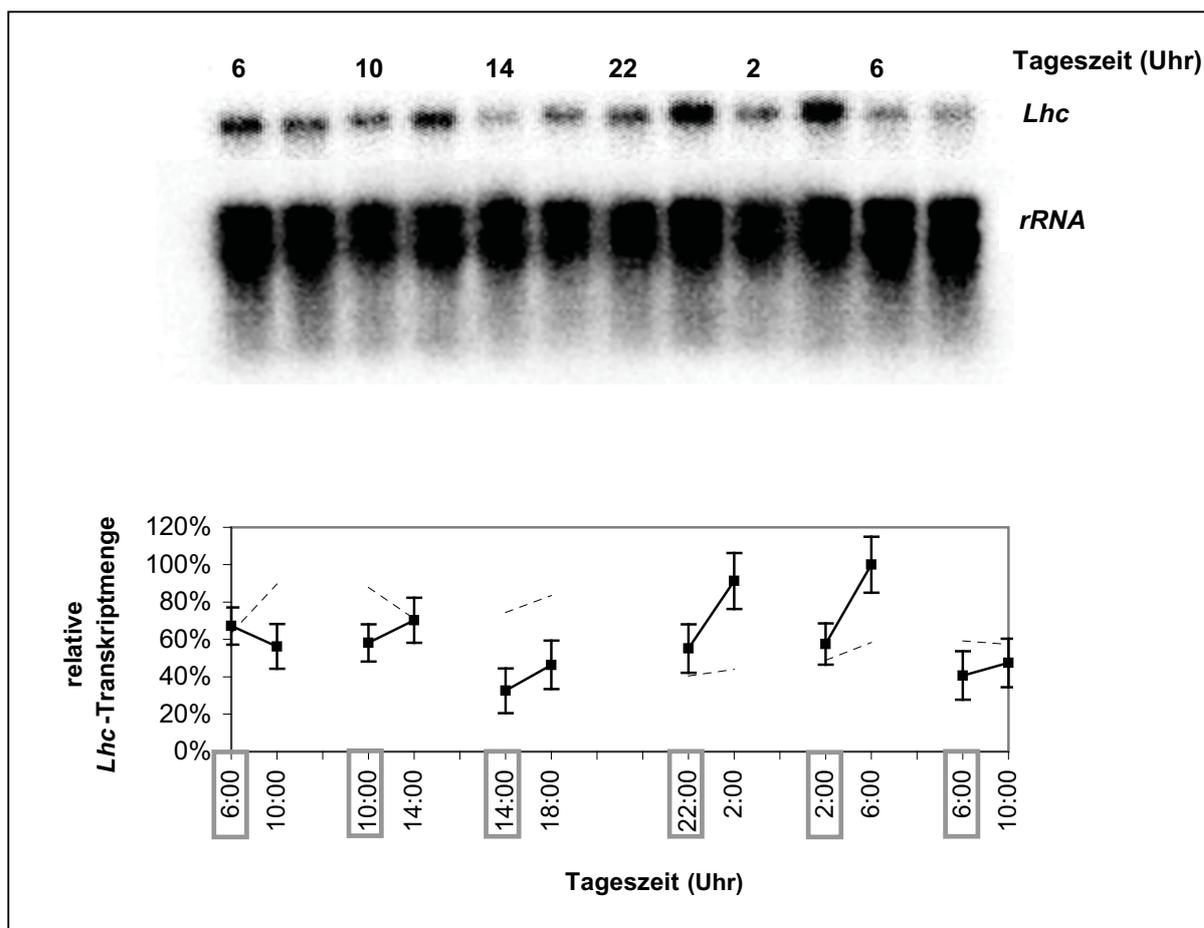
Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Die relative *Lhc*-Transkriptmenge ergibt sich aus dem Quotienten *Lhc*/ *rRNA*. Die Punkte markieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die wiederum je aus 3-5 Einzelmesspunkten bestanden.

(Anzuchtbedingungen: Ernte 8-12 Wochen nach Aussaat, Anzucht auf Erde, Temperatur: 15-22°C, unter natürlichen Lichtverhältnissen im Gewächshaus)

Für *Pinus sylvestris*-Pflanzen, die auf Erde angezogen wurden, konnten folgende Daten gemessen werden: Nur in den frühen Morgenstunden des 6. Tages (6.00 Uhr) wurde eine Zunahme (von 65% auf 90%) der *Lhc*-Transkriptmenge im Vergleich zu den im Dunkel verbliebenen Pflanzen ermittelt. An allen anderen Tageszeitpunkten erfolgte keine oder nur eine sehr schwache Erhöhung der *Lhc*-mRNA-Menge durch die Beleuchtung (Erhöhung von maximal 10%). Die Sensitivität gegenüber Licht variierte folglich bei der Gymnosperme *Pinus sylvestris* im Tagesverlauf. Die *Lhc*-Transkriptmenge wurde in *Pinus sylvestris* bei der Anzucht auf Erde ähnlich wie bei *Arabidopsis* durch eine innere Uhr gesteuert und gleichzeitig positiv vom Licht beeinflusst. Vergleicht man den *Lhc*-mRNA-Gehalt bei Anzucht auf Erde im Tagesverlauf (Abb. 3.2) in *Pinus sylvestris* mit den hier ermittelten Daten (Abb. 3.19 und Abb. 3.20), fällt auf, dass das Maximum in der *Lhc*-Transkriptmenge im Dauerdunkel bei ca. 11 Uhr (sechster Tag Dauerdunkel) lag. Die größte Erhöhung der *Lhc*-Transkriptmenge durch Lichtbestrahlung ließ sich aber um 6 Uhr (sechster Tag Dauerdunkel), zeitlich gesehen also vorher, bewirken.

Bei der Wiederholung des gleichen Experimentes mit *Pinus sylvestris*-Pflanzen, bei denen die Anzuchtbedingungen verändert worden waren durch Aussaat und Wachstum in Sterilkultur, ergab sich ein anderes Bild:

Die größte Zunahme in der *Lhc*-Transkriptmenge durch Lichtbestrahlung erfolgte um 22 Uhr bzw. 2 Uhr. Die Amplitude war mit 50% bzw. 40% größer als bei der Anzucht auf Erde. Um 6 Uhr, 10 Uhr und 14 Uhr erfolgte keine Erhöhung der *Lhc*-mRNA-Menge. Die Wirkung des Lichtes war demnach wie bei der Anzucht auf Erde von der Tageszeit abhängig. Allerdings war die Phase zeitlich verschoben. Es lassen sich weitere Unterschiede aufzeigen: Bei Anzucht in Sterilkultur lag ein Maximum der Schwankung im Dauerdunkel bei 22 Uhr (Abb. 20). Unter diesen Anzuchtbedingungen fielen das Maximum der Lichtinduzierbarkeit und das der Schwingung im Dauerdunkel zeitlich zusammen. Allerdings fand sich ein zweites Maximum der Schwingung im Dauerdunkel um 6 Uhr. Um diese Tageszeit erfolgte aber keine Zunahme der *Lhc*-Transkriptmenge durch Lichtbestrahlung. Es muss deshalb gefolgert werden, dass die *Lhc*-mRNA-Menge neben der circadianen Uhr und dem Licht auch durch weitere Faktoren wie z. B. die Anzuchtbedingungen beeinflusst wurde.



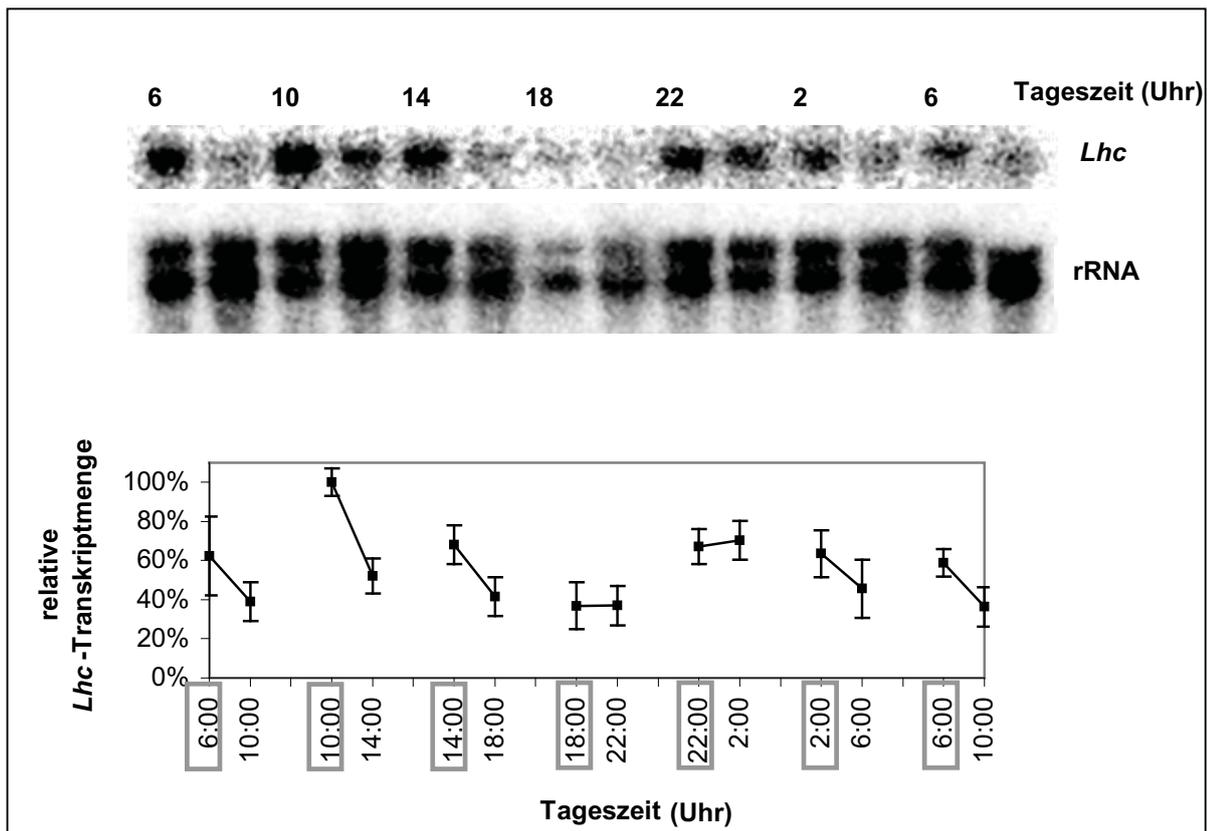
**Abb. 3.20** *Lhc*-Transkriptverteilung in *Pinus sylvestris* vor und nach 4 h Belichtung bei Anzucht in Sterilkultur

Die Zeitpunkte der Ernte für die Werte der *Lhc*-Genexpression nach Dauerdunkel wurden dunkel umrandet.

oben: Autoradiogramm eines Northern Blots, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Lhc*-Sequenz von *Pinus sylvestris* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Die durchgezogenen Linien stellen die Auswertung der Autoradiogramme dar, die gestrichelten Linien zeigen die Werte der Pflanzen, deren Anzucht auf Erde erfolgte (Abb. 3.19). Die relative *Lhc*-Transkriptmenge ergibt sich aus dem Quotienten *Lhc*/ *rRNA*. Die Punkte markieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die wiederum je aus 2 Einzelmesspunkten bestanden.

(Anzuchtbedingungen: Ernte 10-15 Wochen nach Aussaat, Anzucht in Sterilkultur, Temperatur: 24°C konstant, Lichtphase 7-19 Uhr bei  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )



**Abb. 3.21** *Lhc*-Transkriptverteilung in *Ginkgo biloba* vor und nach 4 h Belichtung.

Die Zeitpunkte der Ernte für die Werte der *Lhc*-Genexpression nach Dauerdunkel wurden dunkel umrandet.

oben: Autoradiogramm eines Northern Blots, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Lhc*-Sequenz von *Ginkgo biloba* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

Unten: Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Die relative *Lhc*-Transkriptmenge ergibt sich aus dem Quotienten *Lhc*/*rRNA*. Die Punkte markieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die wiederum je aus 2-3 Einzelmesspunkten bestanden.

(Anzuchtbedingungen: Ernte 8-14 Wochen nach Aussaat, Anzucht auf Erde, Temperatur: 24°C konstant, Lichtphase 7-19 Uhr bei 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Auch mit der Gymnosperme *Ginkgo biloba* wurden ähnliche Versuche durchgeführt. Wie in Abb. 3.21 erkennbar ist, erfolgte bei *Ginkgo biloba* keine Erhöhung des *Lhc*-Transkriptgehaltes durch Licht. Die relative *Lhc*-mRNA-Menge wurde durch die Belichtung am frühen Morgen bzw. bis mittags (2 Uhr, 6.00 Uhr, 10 Uhr, 14 Uhr) reduziert. Diese Wirkung war um 10 Uhr morgens maximal. Erfolgte die Bestrahlung um 18 Uhr oder 22 Uhr, ließen sich keine Effekte auf die relative *Lhc*-Transkriptmenge messen. Wie bei *Pinus sylvestris* lag auch somit hier eine tageszeitliche Regulation vor. Da Licht in *Ginkgo biloba* demnach keine oder eine reduzierende Wirkung auf die *Lhc*-Transkriptmenge ausübt im Gegensatz zu *Pinus sylvestris*, lässt sich folgern, dass die Regulation der *Lhc*-mRNA-Menge in *Ginkgo biloba* vermutlich anders erfolgt als bei *Pinus sylvestris* oder *Arabidopsis*.

Zusammenfassend kann man aber sagen, dass die Regulation im Dauerdunkel und bei der Reaktion auf Licht bei beiden Gymnospermen *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba* wie bei der

Angiosperme *Arabidopsis thaliana* tageszeitabhängig erfolgt. Die *Lhc*-Transkriptmenge wurde dabei durch eine innere Uhr gesteuert und vom Licht beeinflusst, wobei Licht eine Zunahme oder Abnahme der *Lhc*-mRNA-Menge bewirkte, also einen positiven (*Pinus sylvestris*) bzw. negativen (*Ginkgo biloba*) Effekt aufwies. Auch die Anzuchtbedingungen, unter denen die Versuchsreihen durchgeführt wurden, spielten eine Rolle bei der Einstellung der *Lhc*-Transkriptmenge im Gewebe von *Pinus sylvestris*-Keimlingen.

### 3.2 Untersuchungen zur RNA-Stabilität

Die *Lhc*-Transkriptgehalte in vielen Gymnospermen weisen nur leichte Schwankungen im Tagesverlauf auf und sind nicht diurnal bzw. circadian ausgeprägt. Die Regulation dieser Transkriptgehalte könnte auf transkriptionaler oder posttranskriptionaler Ebene erfolgen. Zur Unterscheidung dieser zwei Ebenen wurden im Folgenden die posttranskriptionalen Prozesse näher betrachtet. Dabei sollte durch den Einsatz von Actinomycin D die Transkription unterbrochen und wie in 2.2.15.1 beschrieben die Halbwertszeit kalkuliert werden (Klaff und Gruissem 1991). Weil in der Literatur keine Experimente mit Gymnospermen zur Bestimmung von Transkripthalbwertszeiten unter Verwendung von Actinomycin D beschrieben sind, wurde zunächst der Transport von Stoffen im Transpirationsstrom und die Wirkung dieses Hemmstoffes in dieser Gruppe der Spermatophyta überprüft (3.2.1-2). Im Weiteren wurden die Halbwertszeiten unterschiedlicher Transkripte in verschiedenen Pflanzenspezies bestimmt (3.2.3).

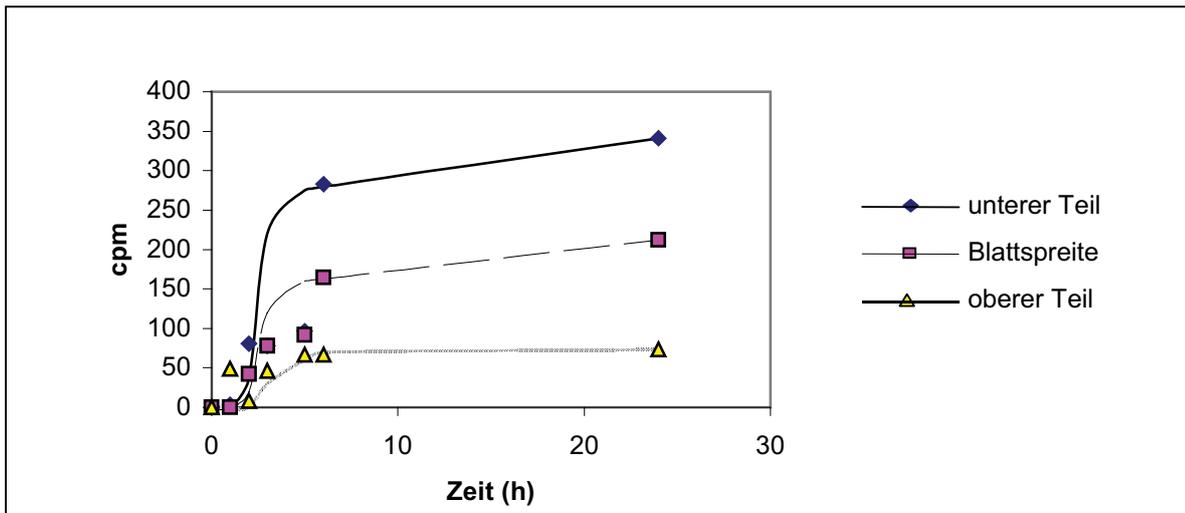
#### 3.2.1 Transport von radioaktiv markierten Molekülen in *Ginkgo biloba* und *Pinus sylvestris*

Bei der Bestimmung von mRNA-Stabilitäten durch die Zugabe eines Hemmstoffes muss sichergestellt sein, dass sich die zugesetzte Chemikalie im ganzen Gewebe verteilt. In Pflanzen erfolgt aufgrund des Wasserpotenzialgefälles ein ständiger Strom von Wasser aus den Wurzeln durch das Röhrensystems des Xylems in die Blätter, der als Transpirationsstrom bezeichnet wird. Neben dem Wasser werden auch Ionen wie z. B. Nitrat oder Kaliumionen transportiert. Zunächst sollte untersucht werden, ob durch diesen Mechanismus auch im Vergleich zu diesen Ionen größere Moleküle (wie Actinomycin D) in Gymnospermen wie z. B. *Ginkgo biloba* oder *Pinus sylvestris* verteilt werden können. Da radioaktiv markiertes Actinomycin nicht zur Verfügung stand, wurden als radioaktiv markierte Moleküle ein Oligonukleotid bzw. ein Nukleotid (dCTP) verwendet, deren Transport in den Gymnospermen *Ginkgo biloba* bzw. *Pinus sylvestris* untersucht wurde. Dazu wurden von 3

Jahre alten *Ginkgo biloba*- Pflanzen Blätter abgeschnitten und sofort in Wasser gestellt, das ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid (Länge: 20 Nukleotide) enthielt. Nach verschiedenen Zeiträumen wurden Blätter geerntet, das Blatt in 3 Teile unterteilt:

1. oberer Teil der Blattspreite
2. Blattspreite
3. unterer Teil der Blattspreite und Stiel

und die Radioaktivität in den einzelnen Blattteilen mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt.

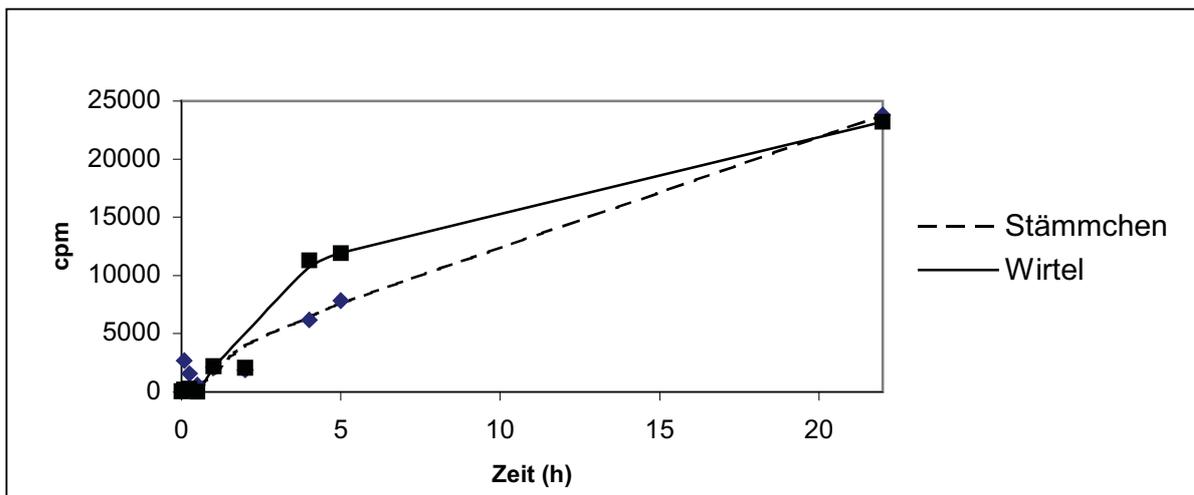


**Abb. 3.22** Verteilung der Radioaktivität eines P32-markierten Oligonukleotids (Länge: 20 Nukleotide) in unterschiedlichen Blattteilen von *Ginkgo biloba*

(Alter der Pflanzen: 2 Jahre, junge Blätter)

Versuchsbedingungen; 25°C konstant, Dauerlicht 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ )

Wie aus Abb. 3.22 ersichtlich, verteilte sich das radioaktiv markierte Oligonukleotid im gesamten Blatt. Nach etwa 5 h erreichte die Radioaktivität einen Sättigungsbereich, der für jeden Blattteil auf einem anderen Niveau lag. Dies lässt sich durch die unterschiedliche Flächeninhalte der einzelnen Teile und die Angabe der Radioaktivität in cpm (Counts per minute, also ohne Bezug auf die Fläche) erklären. Es kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass auch recht große Moleküle wie z. B. ein Oligonukleotid mit einer Länge von 20 Nukleotiden mit dem Transpirationstrom in einem Zeitraum von maximal 5 h vollständig in einem *Ginkgo biloba*-Blatt verteilt werden.



**Abb. 3.23** Verteilung der Radioaktivität eines  $P^{32}$ -markierten Nukleotids (dCTP) in unterschiedlichen Teilen von *Pinus sylvestris*

(Alter der Pflanzen: 9 Wochen, Anzucht auf Erde im Gewächshaus  
Versuchsbedingungen; 22°C konstant, Dauerlicht  $100\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ )

Mit *Pinus sylvestris*-Keimlingen wurde analog eine weitere Untersuchung durchgeführt. Die Pflanzen wurden dazu ohne Wurzeln in Wasser gestellt, das mit einem radioaktiv markiertem Nukleotid (dCTP) versetzt war. Im Anschluss wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Pflanzenmaterial geerntet, nach Stämmchen und Wirtel aufgeteilt, und die Radioaktivität mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt.

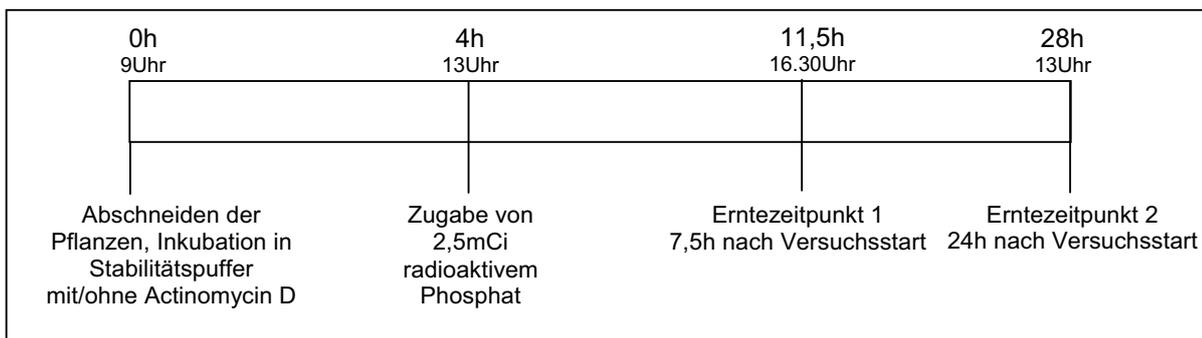
Wie aus der Verteilung der Radioaktivität in Abb. 3.23 zu entnehmen ist, wurde das dCTP-Molekül durch die gesamte *Pinus sylvestris*-Pflanze transportiert. Nach 4-5 h Inkubation wurde ein Sättigungsbereich erreicht, der als komplette Durchsetzung des Gewebes mit radioaktiv markiertem dCTP gedeutet werden kann. Da dCTP-Moleküle natürlicherweise in der Pflanze vorkommen, kann davon ausgegangen werden, dass auch das radioaktive Molekül prozessiert wird. Verlaufen diese Reaktionen langsam, so würde die Menge an Radioaktivität in der Pflanze nach Absättigung des Gewebes mit dCTP nur in geringem Maß weiter steigen. Diese Annahme könnte den geringen Anstieg der Radioaktivität nach 5 h in Abb. 3.23 erklären. Alternativ kann postuliert werden, dass der Transpirationsstrom, der zu Beginn der Messungen auftrat, nach 4-5 h Inkubation abnimmt. Dadurch würde das radioaktive Molekül im Zeitraum von 0 h bis zu 5 h Inkubation schneller transportiert als im weiteren Verlauf der Untersuchungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass radioaktiv markierte Moleküle wie dCTP oder ein Oligonukleotid in den Gymnospermen *Pinus sylvestris* bzw. *Ginkgo biloba* transportiert werden. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass auch Actinomycin D in diesen Pflanzen mit Hilfe des Transpirationsstroms verteilt werden kann.

### 3.2.2 Wirkung von Actinomycin D in *Pinus sylvestris*

Ziel der folgenden Versuche war es zu ermitteln, ob Actinomycin D in der Pflanze sofort verstoffwechselt wird oder die erwartete Wirkung zeigt, die in der Hemmung der Transkription durch Interkalierung in die DNA liegt. Dazu wurden zwei Versuche durchgeführt.

In einem ersten Teilversuch wurden 5 Wochen alte *Pinus sylvestris*-Pflanzen oberhalb der Wurzel abgeschnitten und in Wasser mit bzw. ohne Actinomycin D (Endkonzentration 230 µg/ml) für 4 h inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 2,5 mCi P<sup>32</sup>-markiertes Phosphat zu jedem Ansatz gegeben. Innerhalb dieser 4 h sollte sich das Actinomycin D in der gesamten Pflanze verteilen und die Transkription blockieren. Bei Zugabe von radioaktivem Phosphat in Gegenwart von Actinomycin D sollte sich aus diesem Grund keine neue radioaktiv markierte RNA bilden. Ohne Actinomycin D sollte die Transkription ohne Beeinträchtigung weiter ablaufen und radioaktiv markierte RNA produziert werden. 7,5 h und 24 h nach Zugabe der Radioaktivität wurde Blattmaterial geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Der Versuchsablauf ist als Schema in Abb. 3.24 wiedergegeben.



**Abb. 3.24 Schema des ersten Versuchsaufbaus zum Testen der Wirkung in *Pinus sylvestris***

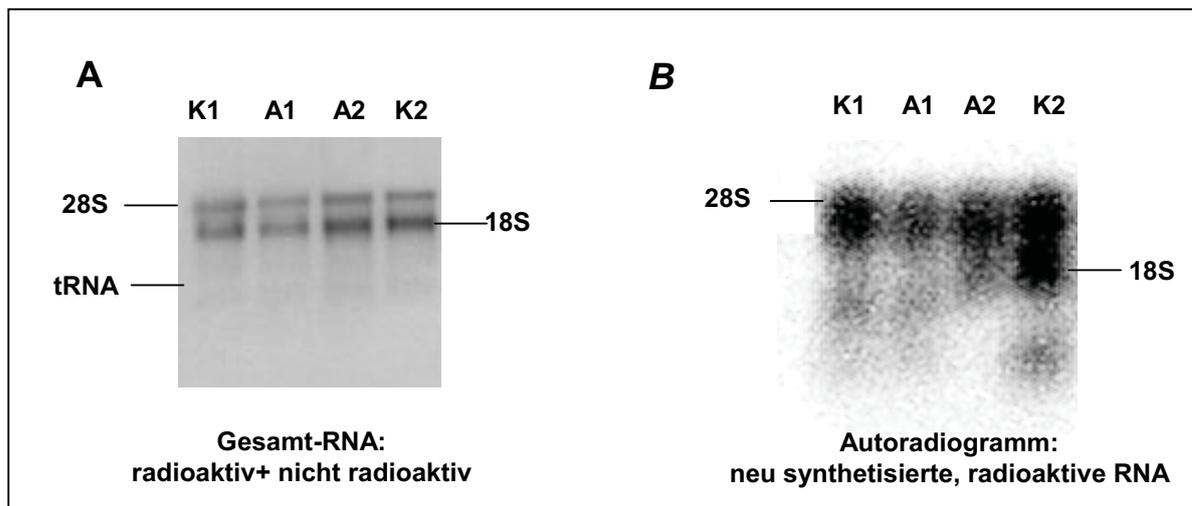
(Alter der Pflanzen: 10 Wochen, Anzucht auf Erde im Gewächshaus  
Versuchsbedingungen; 22°C konstant, Dauerlicht 100 µmol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>)

Um spezifisch die Produktion der neu gebildeten radioaktiv markierten *Lhc*-mRNA detektieren zu können, wurde auf einer Nylonmembran eine für *Pinus-Lhc*-spezifische DNA-Sonde (*Lhcb* aus *Pinus contorta*) fixiert und dieser Filter mit dem Hauptanteil der isolierten RNA hybridisiert. Auf diese Art und Weise konnten allerdings keine auswertbaren Daten erhalten werden. Gründe hierfür können in der zu geringen Konzentration der neu gebildeten und somit radioaktiv markierten *Lhc*-mRNA oder in den gewählten Hybridisierungsbedingungen liegen. Von einer Wiederholung dieses Versuches in größerem Maßstab wurde aufgrund der hohen Strahlenbelastung jedoch abgesehen.

Eine Differenzierung der Wirkung des eingesetzten Actinomycins auf die Transkription einzelner mRNA-Spezies war somit nicht möglich. Um den Effekt des Hemmstoffes auf die

Produktion der Gesamt-RNA festzustellen, wurde mit dem Anteil der isolierten RNA, der nicht für die Hybridisierungen verwendet worden war, eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 3.25 A). Von diesem Agarosegel wurde im Anschluss mit Hilfe des Instant Imagers (Packard) ein Autoradiogramm erstellt (Abb. 3.25 B).

Auf Abb. 3.25 A lässt sich erkennen, dass auf allen Spuren des Agarosegels etwa gleiche Mengen an intakter Gesamt-RNA aufgetragen wurden. Die Anteile an neu gebildeter radioaktiver Gesamt-RNA waren in den Proben, denen Actinomycin D zugesetzt worden war (A1 bzw. A2 in Abb. 3.25 B), jedoch geringer als in der jeweiligen Kontrolle (Proben ohne Actinomycin K1 bzw. K2 in Abb. 3.25 B). Dieser Effekt auf die neu gebildete radioaktive Gesamt-RNA erhöhte sich mit der Inkubationszeit und war nach 24 h (K2 im Vergleich zu A2, Hemmung von 60%) deutlicher ausgeprägt als nach 7,5 h (K1 im Vergleich zu A1, Hemmung von 30%). Es kann daraus geschlossen werden, dass Actinomycin D einen hemmenden Einfluss auf die Transkription der Gesamt-RNA ausübte, der sich mit Verlängerung der Inkubationszeit verstärkte.



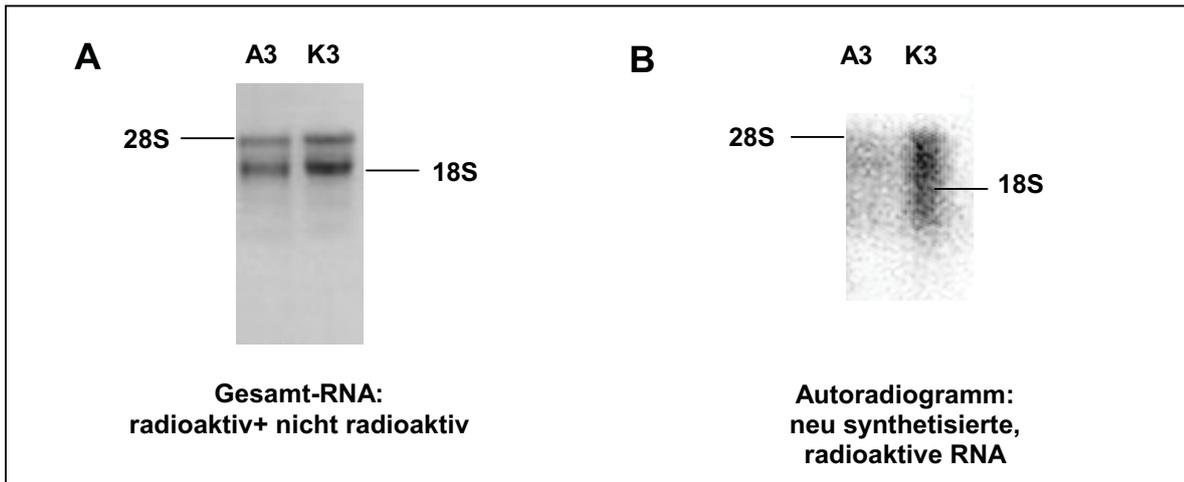
**Abb. 3.25 Erster Versuch zur Testung der Wirkung von Actinomycin D in *Pinus sylvestris***

A: RNA auf denaturierendem 1%igem Agarosegel.

B: Autoradiogramm des links abgebildeten Gels.

Nähere Erläuterungen siehe Text.

In einem zweiten Versuch wurden 5 Wochen alte *Pinus sylvestris*-Pflanzen abgeschnitten und in Wasser inkubiert, das zeitgleich mit bzw. ohne Actinomycin D und radioaktivem Phosphat versetzt wurde. Die Pflanzen wurden für 6 h in diesen Lösungen belassen, dann abgerntet und die Gesamt-RNA isoliert.



**Abb. 3.26 Zweiter Versuch zur Testung der Wirkung von Actinomycin D in *Pinus sylvestris***

A: RNA auf denaturierendem 1%igem Agarosegel.

B: Autoradiogramm des links abgebildeten Gels.

Nähere Erläuterungen siehe Text.

Analog zu dem ersten oben beschriebenen Versuch wurde eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt und von diesem Gel ein Autoradiogramm erstellt (Abb. 3.26). Obwohl sich auf dem Gel gleiche Mengen an Gesamt-RNA befanden (Abb. 3.26 A), war der Anteil an neu gebildeter radioaktiver RNA (Abb. 3.26 B, K3 im Vergleich zu A3, Hemmung von 65%) bei Inkubation in Anwesenheit von Actinomycin D sehr viel geringer als in der Kontrolle. Dies bedeutet, dass die Zugabe von Actinomycin D auch in diesem Versuch die Transkription wie erwartet in starker Weise unterdrückte.

Zusammenfassend für beide Versuche lässt sich feststellen, dass Actinomycin D eine Hemmung der Transkription bewirkt, die allerdings nicht zu 100% erfolgt. Um eine Halbwertszeit bei einer Reaktion erster Ordnung zu bestimmen, ist es aber ausreichend, eine zur absoluten Konzentration proportionale Größe zu ermitteln (vgl. 2.2.15.1). Dieses Kriterium wurde erfüllt. Somit konnte die Hemmung der Transkription durch Actinomycin D als eine geeignete Methode zur Determination von Transkriptionshalbwertszeiten in *Pinus sylvestris* angewendet werden.

### 3.2.3 Bestimmung von Transkriptstabilitäten in verschiedenen Pflanzen

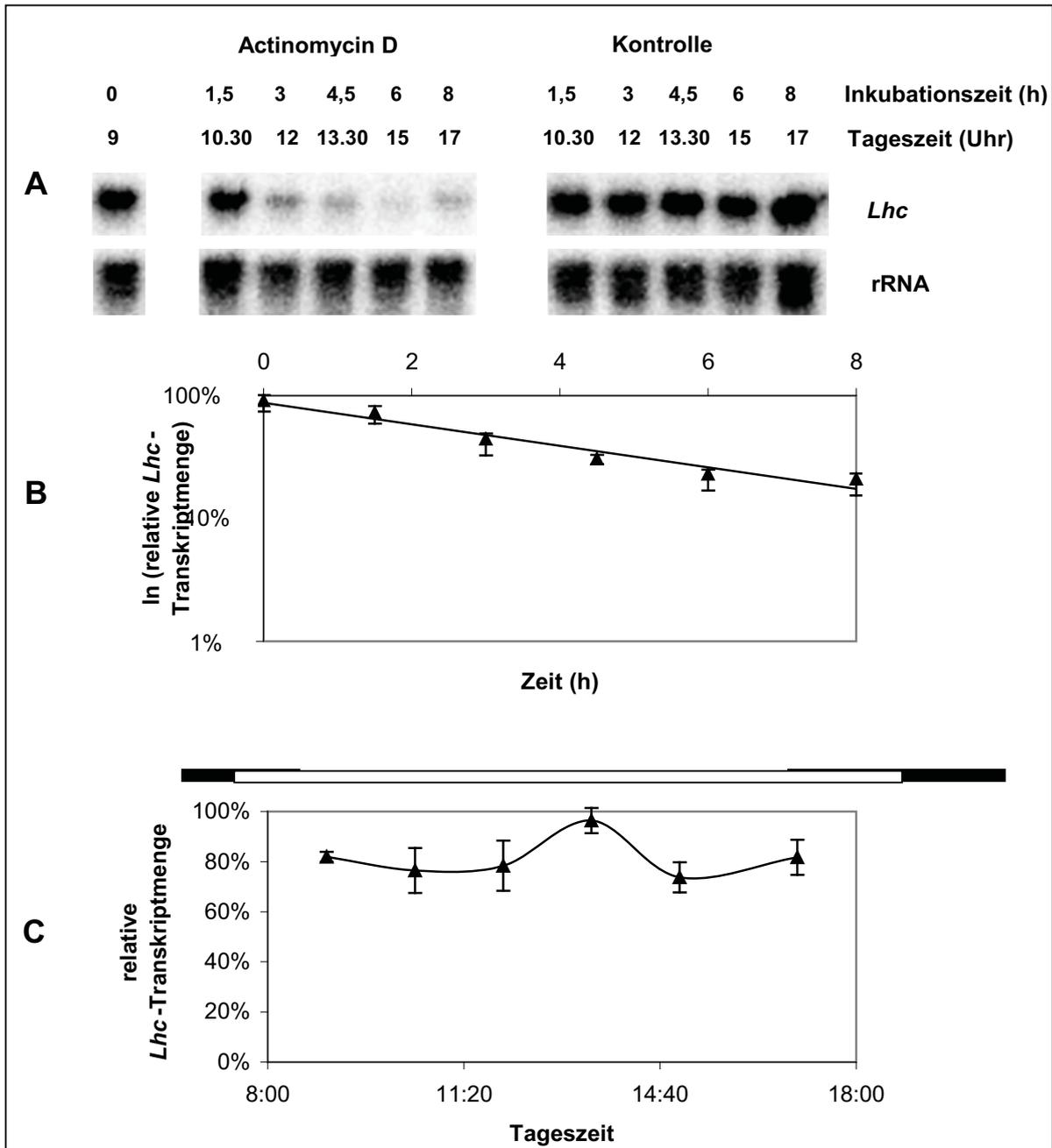
Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen zur Ermittlung der *Lhc*-mRNA-Stabilitäten bei Vertretern von zwei verschiedenen Klassen der Gymnospermen und zwei Vertretern der Angiospermen beschrieben. Zusätzlich zu den Halbwertszeiten der *Lhc*-Transkripte wurden die Halbwertszeiten für je ein weiteres Transkript einer Gymnosperme (*trnH* aus *Pinus sylvestris*) und einer Angiosperme (*psbA* aus *Lycopersicon esculentum*) ermittelt. Um die Stabilität der verschiedenen Transkripte zu bestimmen, wurde immer nach

dem in 2.2.15.2 beschriebenen Verfahren vorgegangen. Zur Ermittlung der Halbwertszeiten war es erforderlich, die Logarithmen der relativen Transkriptgehalte gegen die Zeit aufzutragen. Parallel zu diesen Ansätzen wurden jeweils Kontrollen ohne Actinomycin D mitgeführt, um auf die Übertragbarkeit der Resultate auf intakte Pflanzen schließen zu können. Im Unterschied zu den Messwerten für die Bestimmung der Stabilitäten wurden diese relativen mRNA-Mengen der Kontrollen in einem linearen Maßstab gegen die Tageszeit aufgetragen, damit sie unmittelbar mit Literaturdaten und den Ergebnissen aus 3.1.1 verglichen werden können.

### 3.2.3.1 Halbwertszeiten der *Lhc*-Transkripte in verschiedenen Pflanzen

Für die Bestimmung der Stabilität der *Lhc*-Transkripte bei der Angiosperme *Lycopersicon esculentum* wurden vier Wochen alte Pflanzen verwendet. Bei Unterbrechung der Transkription mittels Actinomycin D ließen sich im Autoradiogramm der Proben deutlich die Abbauprozesse der *Lhc*-mRNA verfolgen (Abb. 3.27 A). Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden der Logarithmen der relativen *Lhc*-mRNA-Gehalte konnte eine Halbwertszeit der *Lhc*-Transkripte von 3,5 h kalkuliert werden (Abb. 3.27 B).

Literaturdaten zeigen, dass sich in intakten Tomatenpflanzen im Tagesverlauf ein diurnaler Rhythmus der *Lhc*-mRNA-Akkumulation mit Maximum zur Mittagszeit bestimmen lässt (Piechulla 1989). Wie in Abb. 3.27 C zu erkennen, folgte die Kontrolle in diesem Versuch auch solch einem diurnalen Verlauf, auch wenn das Maximum im Vergleich zu den Messungen von Piechulla 1989 weniger stark ausgeprägt war. Allerdings sei angemerkt, dass an den Zeitpunkten, bei denen in den Messungen von Piechulla 1989 die Minima in der *Lhc*-mRNA-Konzentration detektiert wurden (6.50 Uhr, 22.50 Uhr, Lichtphase von 7-18 Uhr), im Rahmen dieser Versuchsreihen keine Ernten vorgenommen wurden.



**Abb. 3.27** Untersuchungen zur Bestimmung der *Lhc*-Transkriptstabilität in *Lycopersicon esculentum*

A: Autoradiogramm des Northern Blots, hybridisiert mit einer radioaktiv markierten 0,55kb *Lhc*-Sonde aus *Lycopersicon esculentum* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde der 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

B: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Proben zur Bestimmung der *Lhc*-Halbwertszeit.

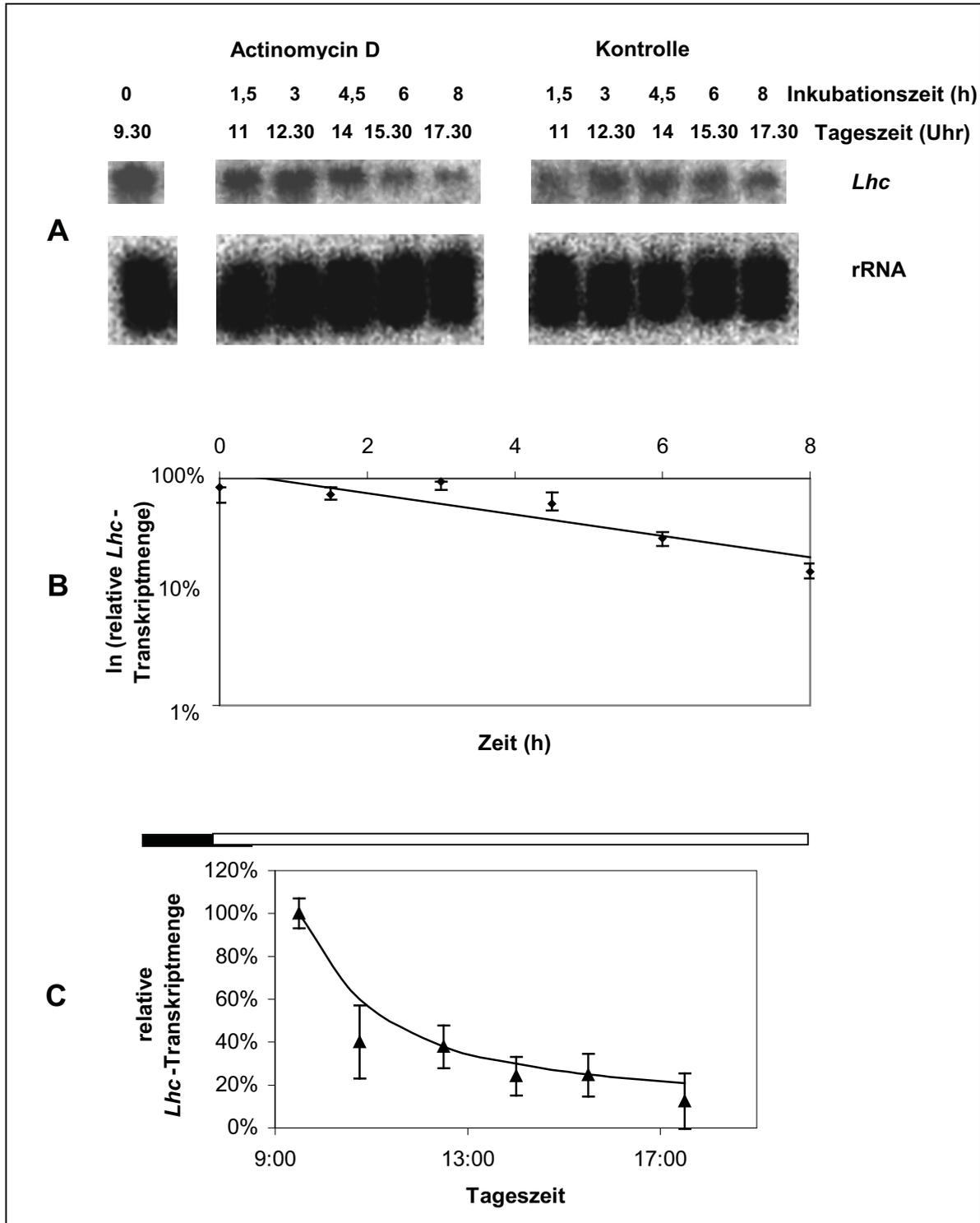
C: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Kontrolle. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase.

Jeder Messpunkt markiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 3-4 Einzelmesspunkten, von denen die Maximal- und Minimalwerte (bei logarithmischer Auftragung) bzw. die Standardabweichung (bei linearer Auftragung) eingezeichnet wurden.

(Anzuchtbedingungen: 4 Wochen alte Pflanzen, Temperatur: 21-23°C, Lichtphase 7-19 Uhr bei 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Die Stabilität der *Lhc*-Transkripte wurde auch bei der Angiosperme *Nicotiana tabacum* bestimmt. Dazu wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt: Mit Hypochlorit sterilisierte Tabaksamen wurden in Weckgläsern auf 2MS-Medium ausgesät. Um das Längenwachstum zu fördern, waren die Gläser mit Aluminiumfolie umwickelt, so dass nur von oben ein Lichteinfall möglich war. Nach vier Wochen wurden die Deckel der Weckgläser abgenommen, damit die Pflanzen eine Kutikula ausbilden konnten. Im Weiteren wurden die Pflanzen unter Wasser oberhalb der Wurzel abgeschnitten und wie unter 2.2.15.2 beschrieben verfahren. In einem zweiten Ansatz wurden Blattscheiben (Durchmesser ca. 1cm) aus Tabakblättern ausgestochen und mit diesen ebenso wie unter 2.2.15.2 beschrieben verfahren. Dabei wurde darauf geachtet, optimale Parallelproben zu verwenden (z. B. wurden aus einem Blatt 7 Scheibchen ausgestochen und gleichmäßig über alle 7 Erntezeitpunkte verteilt). Die Ergebnisse der *Lhc*-mRNA-Halbwertszeitbestimmung waren bei beiden Ansätzen identisch. Aus diesem Grund wird im Folgenden nicht zwischen ihnen unterschieden.

Im Autoradiogramm der *Nicotiana tabacum*-Proben, in denen die Transkription mittels Actinomycin D gehemmt wurde, lies sich deutlich der Abbau der *Lhc*-mRNA verfolgen. (Abb. 3.28 A). Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden der Logarithmen der relativ zur rRNA ermittelten *Lhc*-mRNA-Gehalte konnte für die Halbwertszeit der *Lhc*-Transkripte bei Tabak ein Wert von 3,1 h errechnet werden (Abb. 3.28 B). Sie ist somit der Halbwertszeit der Tomaten-*Lhc*-Transkripte (3,5 h) sehr ähnlich. In den Kontrollproben konnte während des Versuches eine Abnahme des *Lhc*-Transkriptgehaltes bis auf 11% beobachtet werden. Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden um 9 Uhr begonnen, also 3,5 h nach Start der Lichtphase. In den Untersuchungen von Wehmeyer et al. 1990 lagen die Maxima der *Lhc*-Transkriptakkumulation in *Nicotiana tabacum* im Tagesverlauf bei 4 h nach Start der Lichtphase. Der oben beschriebene Verlauf der relativen *Lhc*-Transkriptkonzentration bei den Kontrollen entspricht somit in etwa den von Wehmeyer et al. 1990 publizierten Daten.



**Abb. 3.28 Untersuchungen zur Bestimmung der *Lhc*-Transkriptstabilität in *Nicotiana tabacum***

A: Autoradiogramm des Northern Blots, hybridisiert mit einer radioaktiv markierten 0,55kb *Lhc*-Sonde aus *Lycopersicon esculentum* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde der 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

B: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Proben zur Bestimmung der *Lhc*-Halbwertszeit.

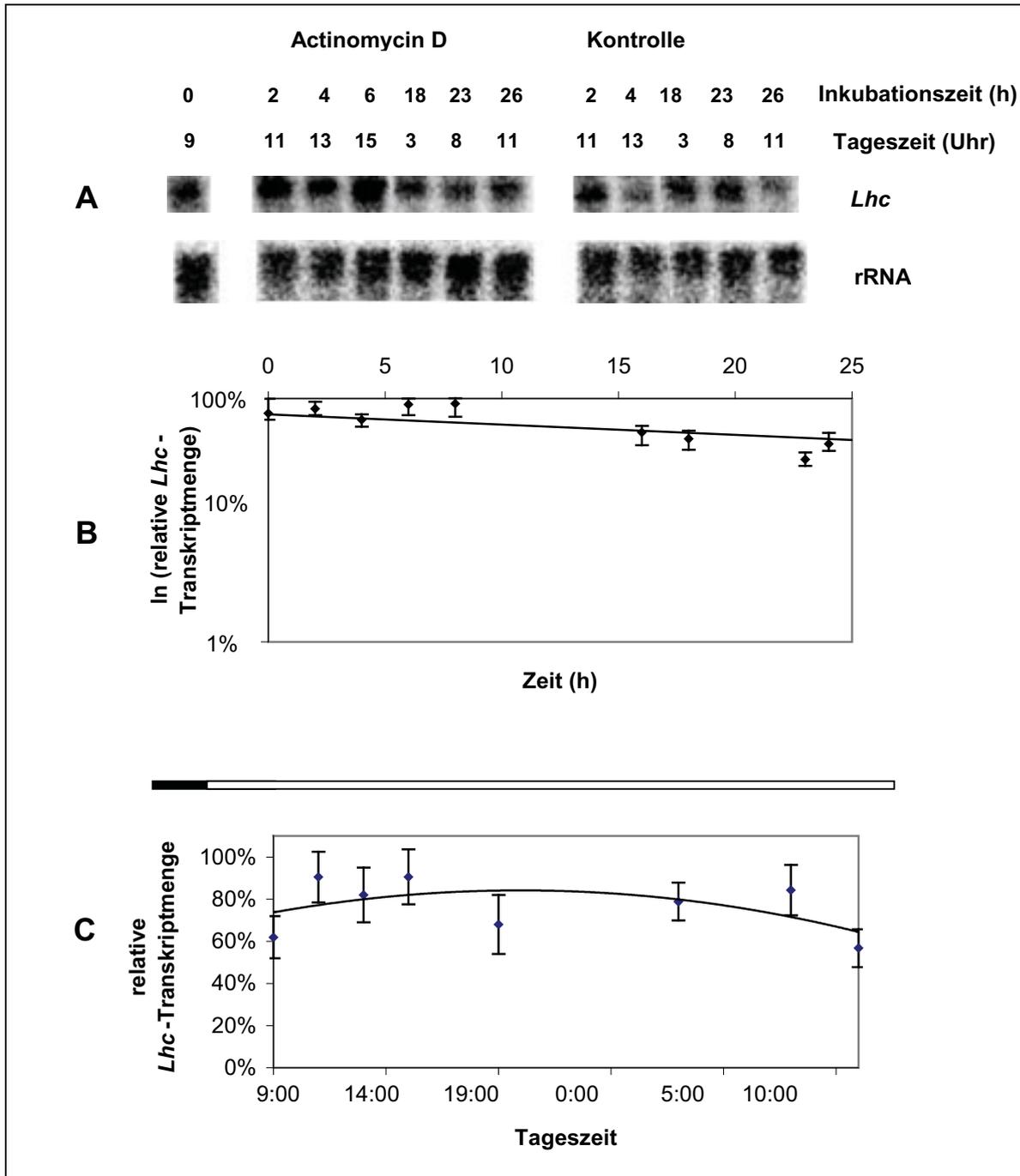
C: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Kontrolle. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase.

Jeder Messpunkt markiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 3 Einzelmesspunkten, von denen die Maximal- und Minimalwerte (bei logarithmischer Auftragung) bzw. die Standardabweichung (bei linearer Auftragung) eingezeichnet wurden.

(Anzuchtbedingungen: Blattscheiben aus 6 Wochen alten Pflanzen, Temperatur: 21-23°C, Lichtphase 5.30-20 Uhr bei 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Halbwertszeit der *Lhc*-Transkripte bei der Gymnosperme *Pinus sylvestris* bestimmt. Dazu fanden 4-7 Wochen alte Pflanzen Verwendung, die wie unter 2.2.15.2 beschrieben eingesetzt wurden. Wie auf den Autoradiogrammen (Abb. 3.29 A) zu erkennen ist, lies sich nahezu kein Unterschied zwischen der Kontrolle ohne Actinomycin D und den Proben, bei denen die Transkription durch die Anwesenheit von Actinomycin D gehemmt war, feststellen. Für die Halbwertszeit der *Lhc*-Transkripte von *Pinus sylvestris* wurde ein Wert von 23,9 h errechnet (Abb. 3.29 B). Die Stabilität der *Lhc*-Transkripte in *Pinus sylvestris* ist somit sehr hoch im Vergleich zu den Angiospermen *Nicotiana tabacum* (3,1 h) oder *Lycopersicon esculentum* (3,5 h). In Abb. 3.2 konnten bei *Pinus sylvestris* im Tagesverlauf keine diurnalen Schwankungen im Bezug auf die *Lhc*-Transkriptmenge festgestellt werden. Diese Beobachtung ließ sich auch bei den Kontrollproben bestätigen, bei denen das Pflanzenmaterial in Pufferlösung ohne Actinomycin D inkubiert wurde (Abb. 3.29 C).

Um die Stabilität der *Lhc*-Transkripte bei der Gymnosperme *Ginkgo biloba* zu bestimmen, wurden 2-3 Jahre alte *Ginkgo*-Pflanzen verwendet. Die Blätter wurden abgeschnitten und wie unter 2.2.15.2 beschrieben die *Lhc*-Transkripthalbwertszeit bestimmt. Hier unterschieden sich die *Lhc*-mRNA-Gehalte bei Proben, bei denen die Transkription durch die Anwesenheit von Actinomycin D blockiert war, kaum von denen der Kontrolle (Autoradiogramme, Abb. 3.30 A). Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden der relativen *Lhc*-mRNA-Gehalte, deren Logarithmen in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen wurden, konnte eine Halbwertszeit der *Lhc*-Transkripte von 36,7 h errechnet werden (Abb. 3.30 B). Daraus folgt, dass die Stabilität der *Lhc*-Transkripte etwas größer als bei *Pinus sylvestris* (23,9 h) und sehr viel höher im Vergleich zu *Nicotiana tabacum* (3,1 h) oder *Lycopersicon esculentum* (3,5 h) war. Es sei allerdings angemerkt, dass die Einzelwerte bei den Messungen für *Ginkgo biloba* stark streuen. Nur wenige der Messwerte lagen auf der errechneten Regressionsgeraden. Dies deutet darauf hin, dass weitere Faktoren einen Einfluss auf die Stabilität ausüben können. In 3.1.1 konnten bei *Ginkgo biloba* im Tagesverlauf keine diurnalen Schwankungen in Bezug auf die *Lhc*-Transkriptmenge festgestellt werden. Diese Beobachtung ließ sich auch bei den Proben bestätigen, bei denen das Pflanzenmaterial in Pufferlösung ohne Actinomycin D inkubiert wurde (Abb.3.30 C).



**Abb. 3.29 Untersuchungen zur Bestimmung der *Lhc*-Transkriptstabilität in *Pinus sylvestris***

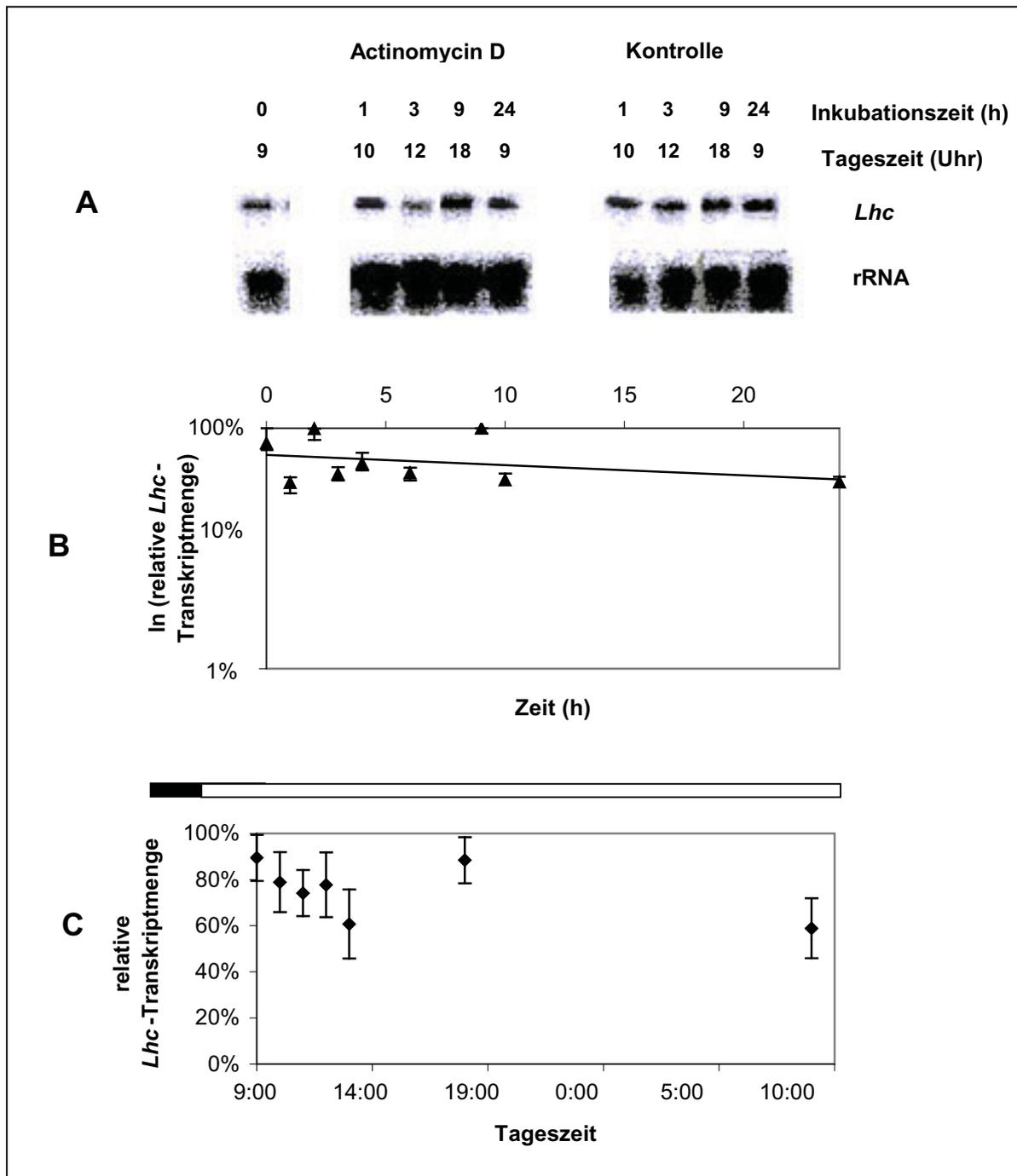
A: Autoradiogramm des Northern Blots, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Lhc*-Sequenz von *Pinus sylvestris* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde der 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

B: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Proben zur Bestimmung der *Lhc*-Halbwertszeit.

C: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Kontrolle. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase.

Jeder Messpunkt markiert den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit je 2-4 Einzelmesspunkten, von denen die Maximal- und Minimalwerte (bei logarithmischer Auftragung) bzw. die Standardabweichung (bei linearen Auftragung) eingezeichnet wurden.

(Anzuchtbedingungen: 4-7 Wochen alte Pflanzen, Temperatur: 18°C Nacht, Lichtphase 6-20 Uhr bei 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Versuche im Dauerlicht)



**Abb. 3.30 Untersuchungen zur Bestimmung der *Lhc*-Transkriptstabilität in *Ginkgo biloba***

A: Autoradiogramm des Northern Blots, hybridisiert mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Lhc*-Sequenz von *Ginkgo biloba* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde der 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

B: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Proben zur Bestimmung der *Lhc*-Halbwertszeit.

C: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Kontrolle. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase.

Jeder Messpunkt markiert den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit je 2-3 Einzelmesspunkten, von denen die Maximal- und Minimalwerte (bei logarithmischer Auftragung) bzw. die Standardabweichung (bei linearen Auftragung) eingezeichnet wurden.

(Anzuchtbedingungen: Temperatur: 21-23°C Tag, 18°C Nacht, Lichtphase 5-21 Uhr bei 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Versuche im Dauerlicht)

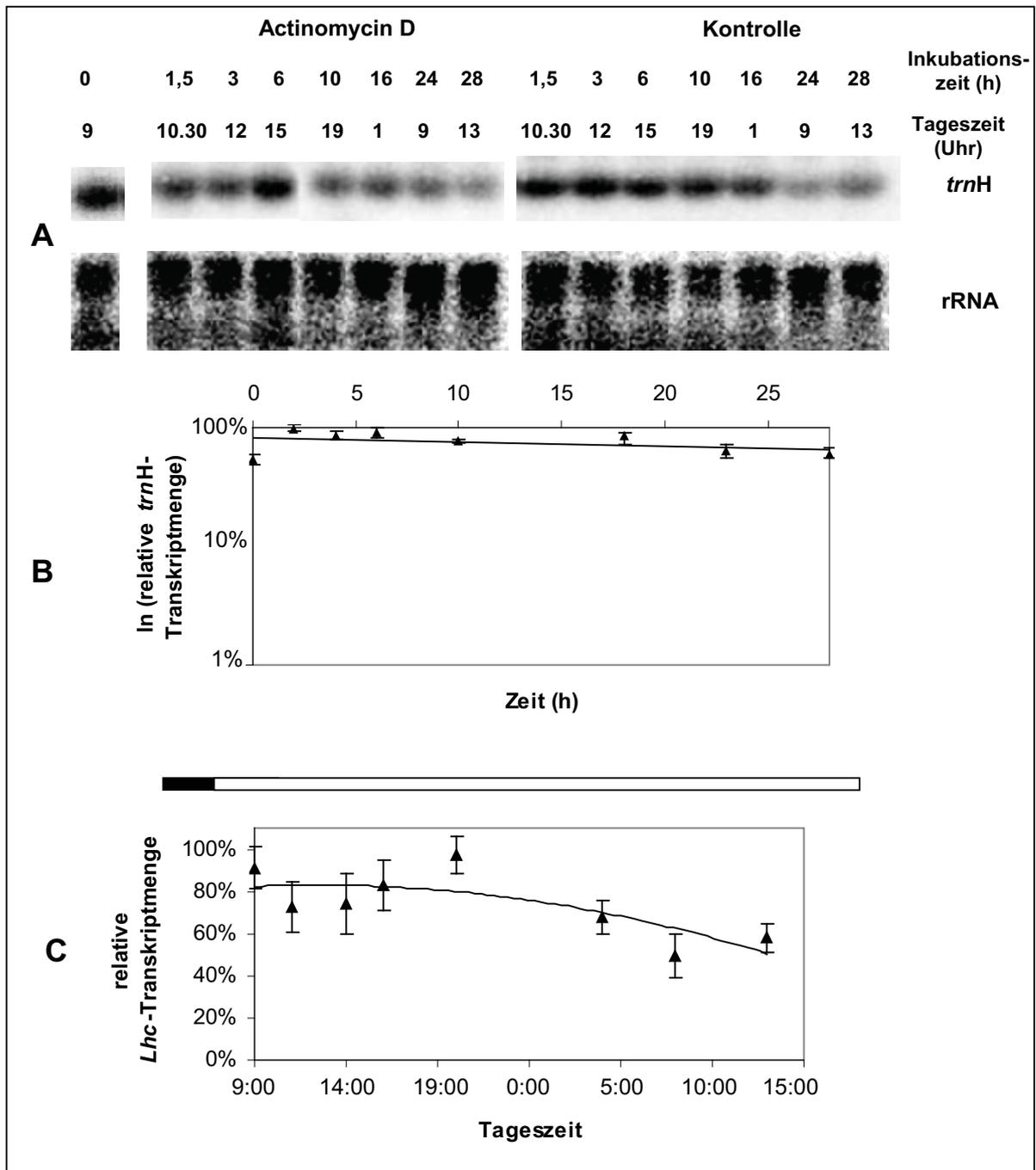
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit für je zwei verschiedene Vertreter der Gymnospermen und der Angiospermen die Stabilität der *Lhc*-Transkripte bestimmt wurde. Für die Gymnospermen *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba* konnten dabei mit 23,9 h bzw. 36,7 h sehr hohe Werte für die Halbwertszeit der *Lhc*-mRNA ermittelt werden. Bei den Angiospermen *Nicotiana tabacum* und *Lycopersicon esculentum* waren die Transkripte mit Halbwertszeiten von 3,1 h und 3,5 h im Vergleich dazu weniger stabil.

### 3.2.3.2 Halbwertszeiten der Transkripte anderer Gene

Neben der Halbwertszeit der *Lhc*-mRNA in verschiedenen Spermatophyta wurden auch die Stabilitäten zweier weiterer Transkripte bestimmt.

Dazu wurden 4 Wochen alte Pflanzen verwendet und entsprechend wie unter 2.2.15.2 beschrieben verfahren. Im Autoradiogramm (Abb. 3.31 A) erkennt man im Zeitverlauf nahezu keine Abnahme der mRNA der chloroplastenkodierten Transfer-RNA für Histidin (*trnH*) bei den Proben, die in Puffer mit Actinomycin D inkubiert worden waren. Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden der Logarithmen der relativen *trnH*-mRNA-Gehalte gegen die Zeit ergab sich ein Wert für die Halbwertszeit der *trnH* von 94,9 h (Abb. 3.31 B). Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass sowohl *trnH* wie auch die *Lhc*-Transkripte in *Pinus sylvestris* eine hohe Stabilität aufweisen.

In Abb. 3.31 ist erkennbar, dass die Konzentration der *trnH* in *Pinus sylvestris* keine großen Fluktuationen im Tagesverlauf durchläuft. Die relativen *trnH*-Konzentrationen schwankten am ersten Tag um einen Wert von ca. 80% und sanken am zweiten Tag auf einen Mittelwert von ca. 50% ab. Somit lässt sich folgern, dass weder die *trnH*-Transkriptakkumulation noch die der *gs*- oder der *Lhc*-mRNA (3.1.1 und 3.1.3) in *Pinus sylvestris* einem diurnalen Rhythmus folgen.



**Abb. 3.31 Untersuchungen zur Bestimmung der *trnH*-Transkriptstabilität in *Pinus sylvestris***

A: Autoradiogramm des Northern Blots, hybridisiert mit einer radioaktiv markierten Sonde aus der *trnH*-Sequenz von *Nicotiana tabacum* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde der 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

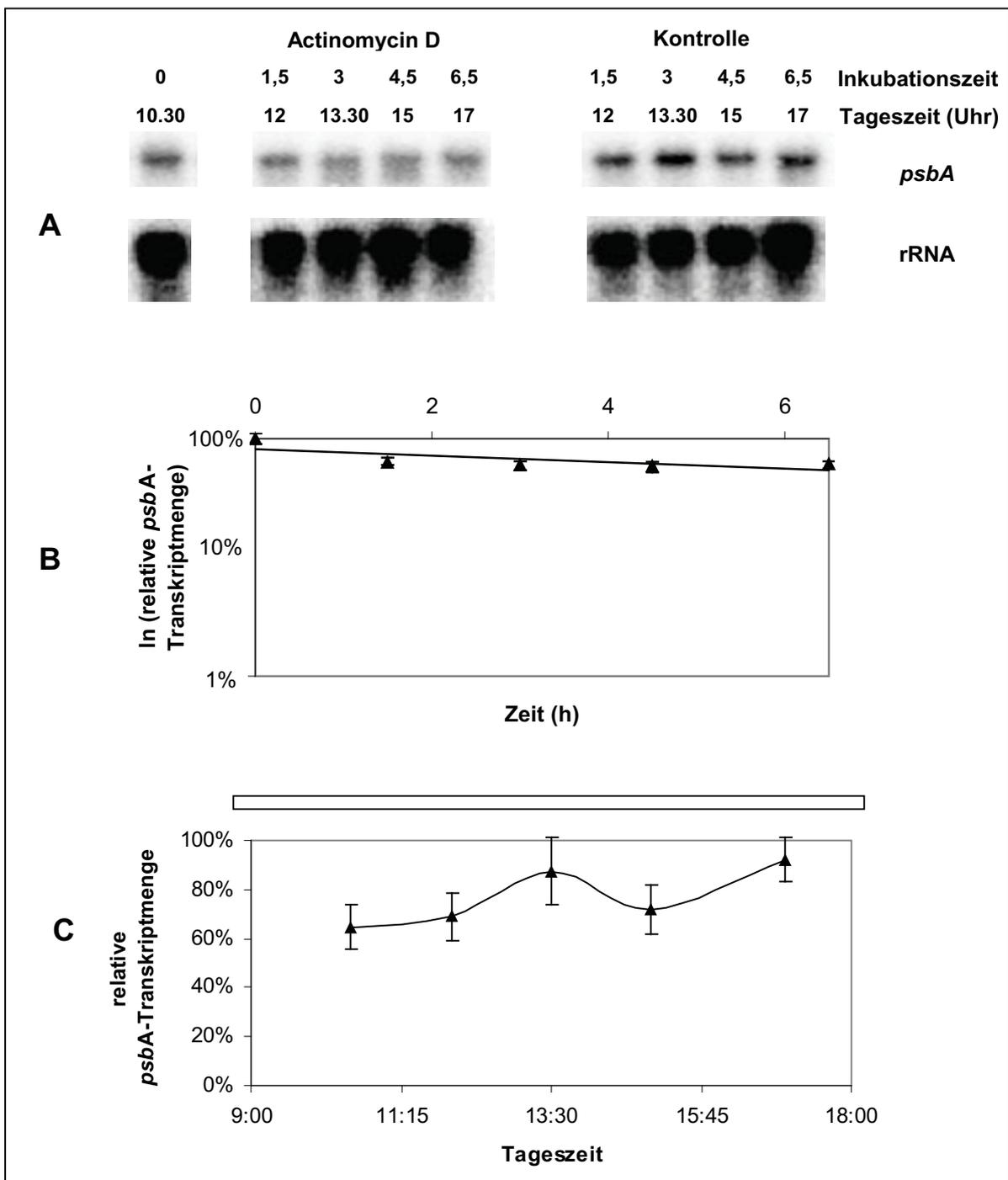
B: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Proben zur Bestimmung der *trnH*-Halbwertszeit.

C: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Kontrolle. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelfase.

Jeder Messpunkt markiert den Mittelwert eines Experimentes mit 3 Einzelmesspunkten, von denen die Maximal- und Minimalwerte (bei logarithmischer Auftragung) bzw. die Standardabweichung (bei linearen Auftragung) eingezeichnet wurden.

(Anzuchtbedingungen: 4-7 Wochen alte Pflanzen, Temperatur: 18°C Nacht, Lichtphase 6-20 Uhr bei  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Versuche im Dauerlicht)

Für die Bestimmung der Stabilität des Transkriptes des *psbA* Gen für das Q<sub>B</sub>-bindende Protein in der Angiosperme *Lycopersicon esculentum* wurden 4 Wochen alte Pflanzen verwendet und mit ihnen analog wie unter 2.2.15.2 beschrieben verfahren. Abb. 3.32 A zeigt deutlich die Abbauprozesse der *psbA*-Transkripte bei den Proben, bei denen die Inkubation in Puffer mit Actinomycin D erfolgte. Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden, bei der die Logarithmen der relativen *psbA*-mRNA-Gehalte gegen die Zeit aufgetragen wurden, konnte für die Halbwertszeit der *psbA*-Transkripte bei Tomate ein Wert von 11,1 h errechnet werden (Abb. 3.32 B). In den Kontrollproben, die in Puffer ohne Actinomycin D inkubiert wurden, konnte dagegen keine Degradation der *psbA*-Transkripte beobachtet werden. Die relativen Konzentrationen der *psbA*-Transkripte schwankten im Tagesverlauf mit einer Amplitude von ca. 10% um einen Wert von ca. 70% (Abb. 3.32 C). Damit unterlag die *psbA*-Transkriptmenge bei den Kontrollproben keinen diurnalen Schwankungen, wie es auch von Paulsen und Bogorad 1988 für Tabak beschrieben wurde.



**Abb. 3.32** Untersuchungen zur Bestimmung der *psbA*-Transkriptstabilität in *Lycopodium obscurum*

A: Autoradiogramm des Northern Blots, hybridisiert mit einer radioaktiv markierten Sonde aus der *psbA*-Sequenz von *Nicotiana tabacum* bzw. einer radioaktiv markierten Sonde der 18S/28S rDNA aus *Spinacea oleracea*.

B: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Proben zur Bestimmung der *psbA*-Halbwertszeit.

C: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms der Kontrolle. Der Balken oberhalb der Grafik symbolisiert die Licht- bzw. Dunkelphase.

Jeder Messpunkt markiert den Mittelwert eines Experimentes mit 3 Einzelmesspunkten, von denen die Maximal- und Minimalwerte (bei logarithmischer Auftragung) bzw. die Standardabweichung (bei linearen Auftragung) eingezeichnet wurden.

(Anzuchtbedingungen: 4 Wochen alte Pflanzen, Temperatur: 21-23°C, Lichtphase 7-19 Uhr bei 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

### 3.2.3.3 Gleichzeitige Bestimmung der Stabilitäten der *Pinus contorta-Lhc*- und der Tomaten-*Lhc*-Transkripte in transgenen Tomaten

Die in 3.2.3.1 beschriebenen Experimente zeigten, dass in *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba* die Stabilität der *Lhc*-Transkripte höher ist als die in den Angiospermen Tomate oder Tabak. Diese erhöhte Stabilität könnte durch die verminderte bzw. erhöhte Verfügbarkeit von RNasen (bzw. der RNase-Aktivität) oder aber durch die Sequenz der Transkripte *per se* verursacht werden.

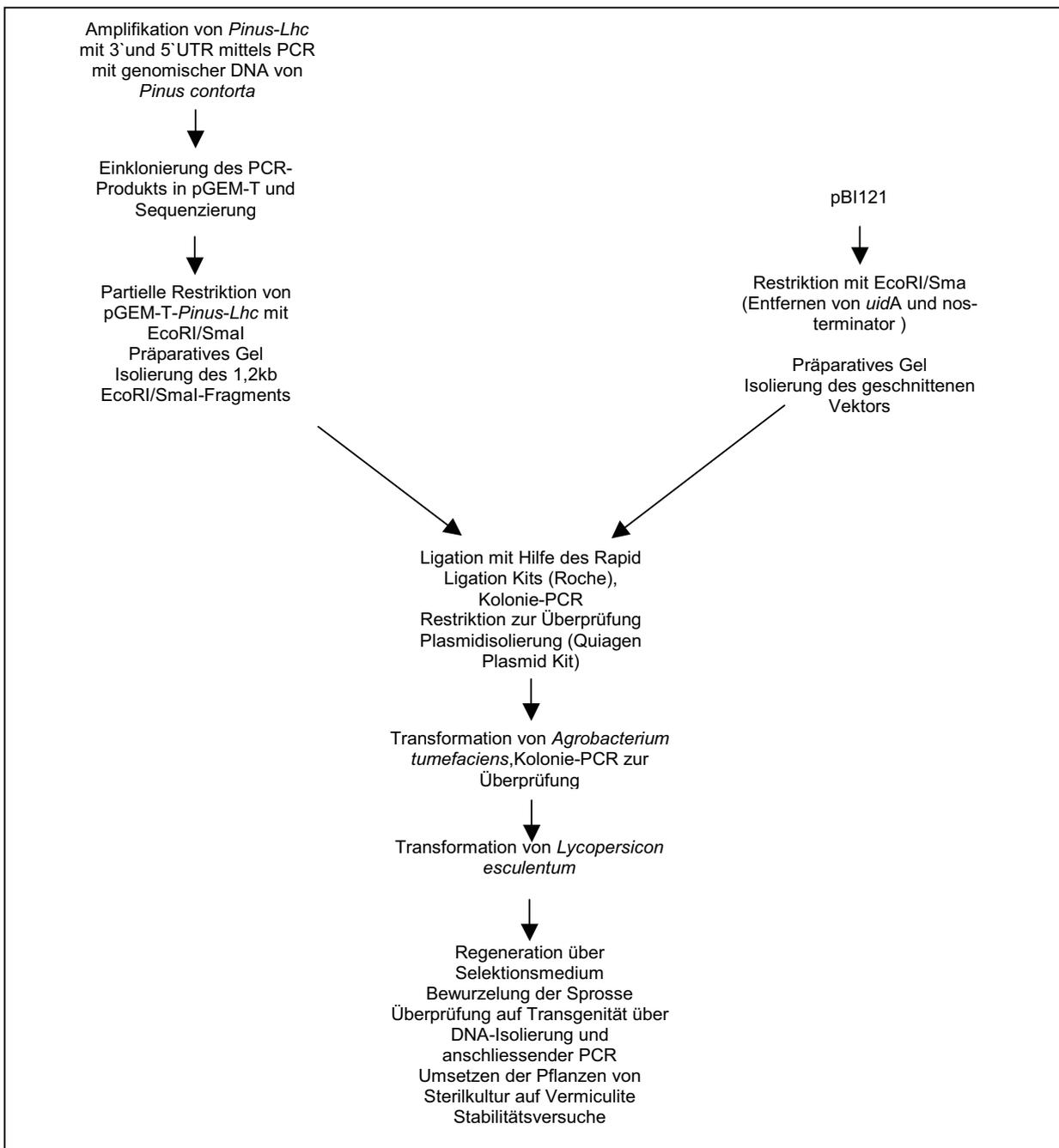
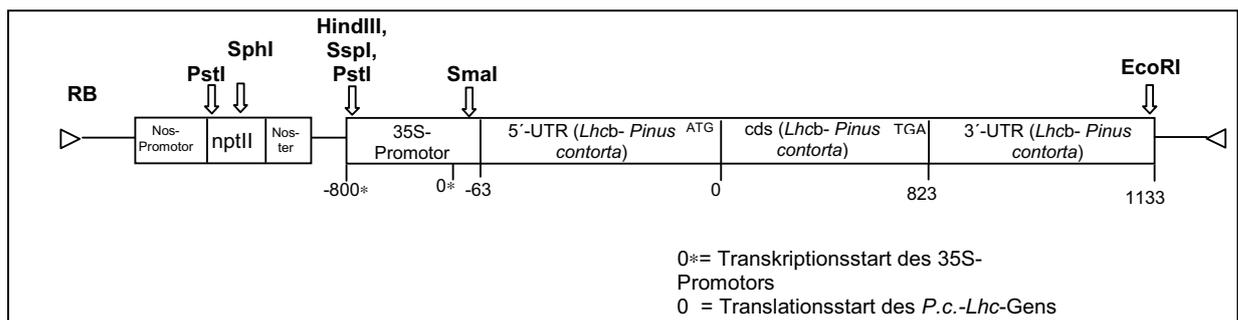


Abb. 3.33 Übersicht über die Herstellung transgener Tomatenpflanzen

Um zwischen diesen Möglichkeiten differenzieren zu können, wurde das *Lhcb*-Gen aus der Gymnosperme *Pinus contorta* konstitutiv unter der Kontrolle des 35S-Promotors in transgenen Tomatenpflanzen exprimiert, und die Stabilitäten der *Pinus-Lhc*-mRNA und der Tomaten-*Lhc*-Transkripte wurden in denselben Proben bestimmt. Dazu wurde folgender Ansatz gewählt, der als Schema in Abb. 3.33 wiedergegeben ist. Das *Lhcb*-Gen aus *Pinus contorta* (5'UTR- und 3'UTR-Bereiche und kodierende Sequenz, AC AJ313013) wurde mittels PCR mit genomischer DNA amplifiziert und in den Vektor pGEM-T eingeführt. Nach der Sequenzierung zur Überprüfung der Identität des klonierten PCR-Fragmentes wurde das Gen einschließlich der 5'UTR- und 3'UTR-Bereiche mit Hilfe der Enzyme *EcoRI* und *SmaI* durch eine partielle Restriktion aus dem Vektor ausgeschnitten und in den Pflanzentransformationsvektor pBI121 kloniert, aus dem zuvor das *uidA*-Gen und der sich stromabwärts anschließende Nos-Terminator entfernt worden waren. Die T-DNA dieses Konstruktes ist in Abb. 3.34 wiedergegeben. Die Sequenz des eingesetzten *Lhcb*-Gens aus *Pinus contorta* ist in Abb. 3.39 aufgeführt.



**Abb. 3.34 35S::*Lhcb*(*Pinus contorta*)**  
**T-DNA zur Expression eines *Pinus contorta-Lhcb*-Gens in Tomate**

Nach erfolgreicher Klonierung wurde das Plasmid durch Elektroporation in *Agrobacterium tumefaciens* eingebracht und positive Klone wurden durch Anzucht auf entsprechendem Selektionsmedium und mittels einer Kolonie-PCR identifiziert. Etiolierte Tomatenkeimlinge wurden mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* transformiert, die transgenen Pflanzen auf Kanamycin enthaltendem Selektionsmedium regeneriert und die Transgenität mit einer PCR auf genomischer DNA bestätigt. Die Pflanzen wurden aus der Sterilkultur auf Vermiculite umgesetzt. *Lycopersicon esculentum* wurde für diese Transformationsansätze ausgewählt, weil die unter 3.2.3.1 beschriebenen Untersuchungen gezeigt hatten, dass bei dieser Pflanzenart der circadiane Verlauf der *Lhc*-Transkriptgehalte auch nach Abschneiden der Pflanzen und Inkubation in Pufferlösung gut detektiert werden konnte und somit keinerlei Sekundäreffekte durch das Abschneiden auftraten.

Für die Stabilitätsversuche wurden Fiederblättchen mit 7 Fiedern verwendet. Um von möglichst homologen Proben ausgehen zu können, wurde jeweils eine Fieder von jedem Blatt pro Erntepunkt in Pufferlösung mit/ohne Actinomycin D inkubiert (dies ergab 7 Erntezeitpunkte). Für die Untersuchungen wurden 3-5 Fiedern pro Zeitpunkt eingesetzt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde das Pflanzenmaterial geerntet, Gesamt-RNA isoliert und die Menge der verschiedenen Transkripte und 18SrRNA bestimmt.

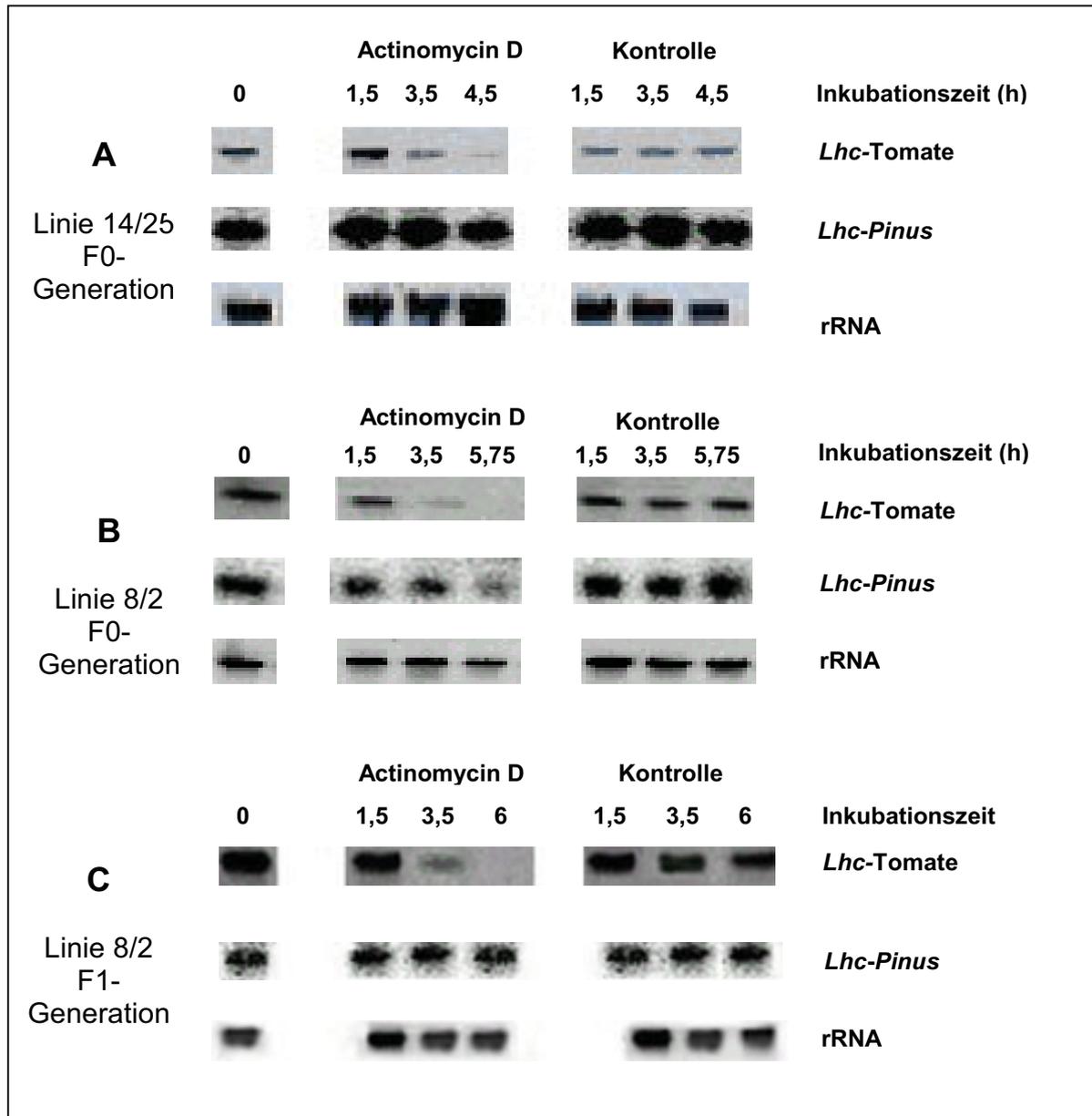
Dazu wurde jeder hergestellte Northern Blot 3mal hybridisiert:

1. mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid, das spezifisch die *Pinus-Lhc*-mRNA erkannte
2. mit einer *Lhc1\*2* (*cab1B*)-Sonde aus Tomate, die spezifisch die Tomaten-*Lhc*-Transkripte erkannte und durch "Random Priming" in Anwesenheit von DIG-dUTP markiert worden war
3. mit einer Sonde, die spezifisch die 18S rRNA erkannte und durch PCR in Anwesenheit von DIG-dUTP markiert worden war.

Die Ergebnisse dieser drei Hybridisierungen, die im Weiteren beschrieben werden, waren direkt miteinander vergleichbar, da bei jeder Hybridisierung derselbe Blot verwendet wurde. Auch wenn eine andere Reihenfolge bei den Hybridisierungen gewählt wurde (zuerst mit der *Lhc1\*2*-Sonde aus *Lycopersicon esculentum*, dann mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus der *Pinus-Lhc*-Sequenz und zum Schluss mit einer Sonde, die spezifisch die 18S rRNA erkannte), konnten die gleichen Resultate erzielt werden. Die Stabilitäten der verschiedenen *Lhc*-Transkripte wurden in zwei unabhängigen transgenen Linien 8/2 und 14/25 bestimmt. Bei Unterbrechung der Transkription mittels Actinomycin D ließen sich im Autoradiogramm der Proben deutlich die Abbauprozesse der Tomaten-*Lhc*-mRNA verfolgen (Abb. 3.35, A-C, obere Reihen). Die Halbwertszeit der Tomaten-*Lhc*-Transkripte betrug in Linie 14/25 0,9 h (Mittelwert aus 0,7 h und 1,1 h), die in Linie 8/2 1,3 h (F0-Generation, Mittelwert aus 0,9 h und 1,7 h) bzw. 1 h (F1-Generation) (Abb. 3.36). Die Werte der beiden Linien lagen nahe zusammen, die Differenz von 0,3 h-0,4 h, die sich bei der Auswertung der Daten ergab, lag im Fehlerbereich der eingesetzten Northern Blot Technik.

In Abb. 3.27 wurde für die Halbwertszeit der Tomaten-*Lhc*-Transkripte ein Wert von 3,5 h bestimmt. Der Unterschied von 3,5h Halbwertszeit zu 0,9 h, 1 h bzw. 1,3 h lässt sich möglicherweise durch die veränderte Probennahme erklären. Bei den in Abb. 3.27 dargestellten Ergebnissen der Untersuchungen wurden 4 Wochen alte, ganze Pflanzen verwendet, während bei dem Einsatz der hier beschriebenen transgenen Pflanzen aufgrund des Vorhandenseins nur einer Pflanze Fiedern der Fiederblätter verwendet wurden. Das

Actinomycin D sollte sich bei Verwendung der Fiedern schneller im Gewebe verteilen, da der Flächeninhalt gegenüber einer ganzen Pflanze deutlich kleiner ist. Somit sollte die Transkription rascher vollständig blockiert werden. Der systematische Fehler, der durch den Transport des Actinomycin D entsteht, ist somit geringer als bei den Messungen in Abb. 3.27 einzustufen.



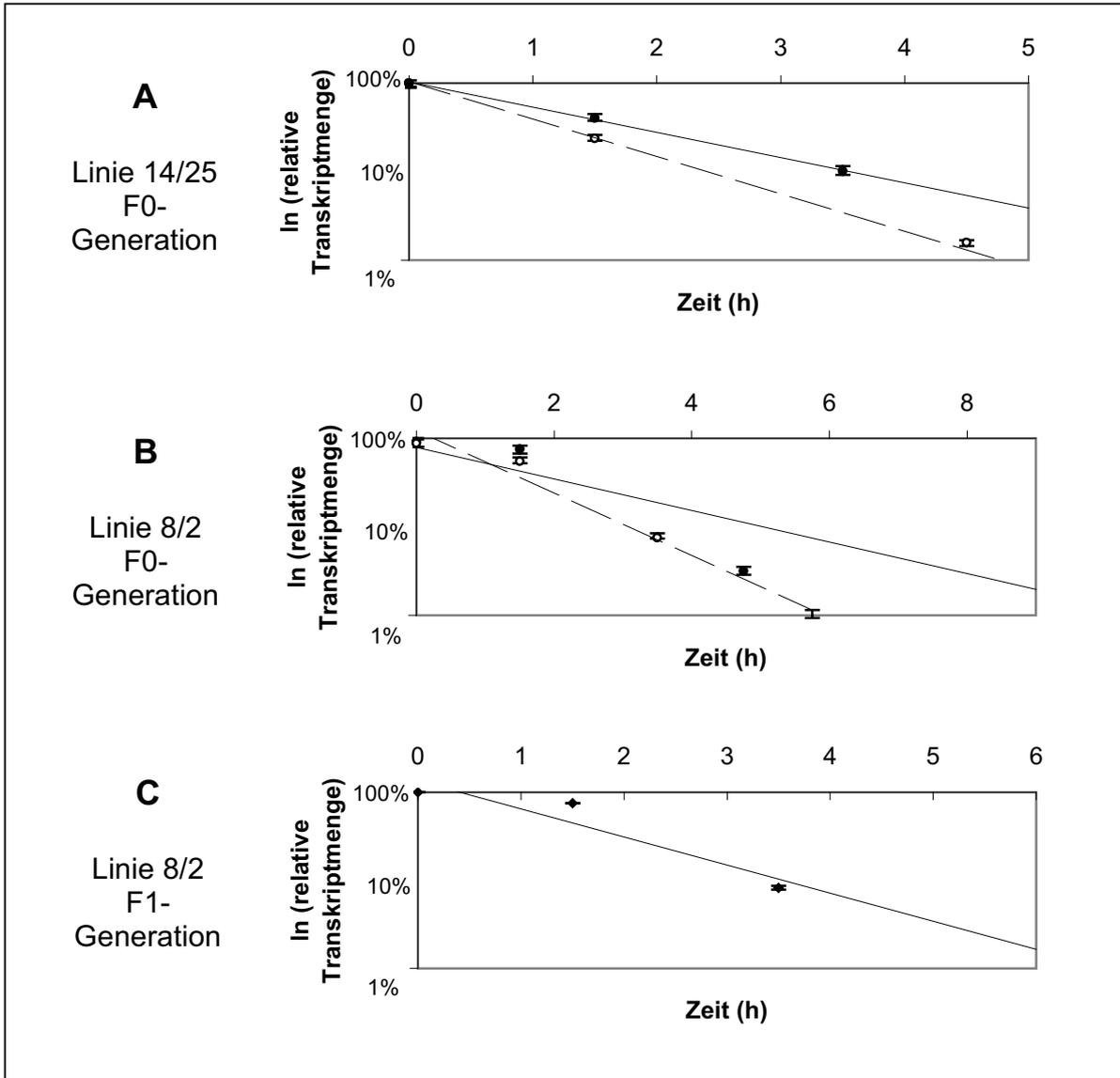
**Abb. 3.35** Autoradiogramme der Northern Blots zur Bestimmung der Tomaten-*Lhc*-Transkriptstabilität und *Pinus-Lhc*-Transkriptstabilität in transgenen Tomatenpflanzen

A: Linie 14/25 (F0-Generation)

B: Linie 8/2 (F0-Generation)

C: Linie 8/2 (F1-Generation)

(Anzuchtbedingungen: Temperatur: 23°C konstant, Lichtphase 6-22 Uhr bei 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )



**Abb. 3.36 Densitometrische Auswertungen der Autoradiogramme der Proben zur Bestimmung der Tomaten-Lhc-Transkriptstabilität in transgenen Tomatenpflanzen mit dem Konstrukt 35S::Lhcb(*Pinus contorta*)**

A: Linie 14/25 (F0-Generation)

B: Linie 8/2 (F0-Generation)

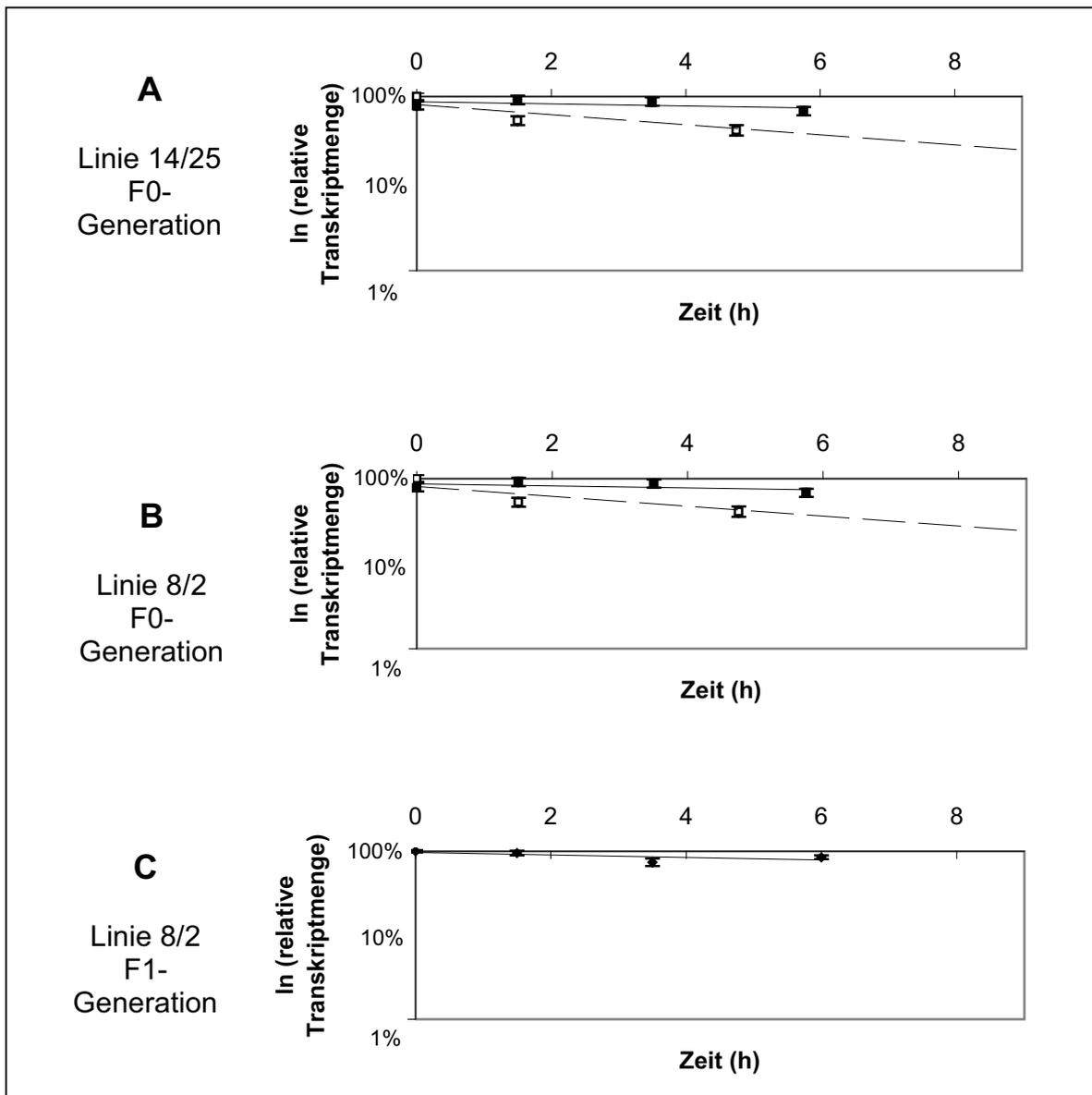
C: Linie 8/2 (F1-Generation)

Die Linien markieren die Regressionsgeraden der beiden unabhängigen Experimente. Die Linien markieren die Regressionsgeraden der beiden unabhängigen Experimente der F0-Generation und eines Experimentes der F1-Generation mit je 3-5 Einzelwerten, von denen die Maximal- und Minimalwerte jeweils eingezeichnet wurden. Die Messwerte der ersten Versuchsreihe der F0-Generation sind als ausgefüllte Symbole, die der zweiten Versuchsreihe als offene Symbole angegeben. Die Abbildung der Autoradiogramme der ersten Versuchsreihe sind in Abb. 3.35, A-C, obere Reihen dargestellt.

Im Weiteren sind die Resultate für die Bestimmungen der Stabilität der *Pinus-Lhc*-Transkripte in den transgenen Tomatenpflanzen aufgeführt. Wie auf den Autoradiogrammen (Abb. 3.35, A-C, mittlere Reihen) zu erkennen ist, ließen sich im Autoradiogramm der Proben die Abbauprozesse der *Pinus-Lhc*-mRNA verfolgen, die aber deutlich langsamer verliefen als die der Tomaten-*Lhc*-mRNA (Abb. 3.35, A-C, obere Reihen). So konnten nach 4,7 h (Linie 14/25) bzw. 5,75 h und 6 h (Linie 8/2) Inkubation in Puffer mit Actinomycin D in den jeweiligen Proben *Pinus-Lhc*-Transkripte, aber keine Tomaten-*Lhc*-Transkripte detektiert werden. Für die Halbwertszeiten des *Pinus-Lhc*-Transkriptes wurde in Linie 14/25 ein Wert von 4,7 h (Mittelwert aus 6,9 h und 2,4 h), in Linie 8/2 Werte von 15 h (F0-Generation, Mittelwert aus 25 h und 5,2 h) bzw. 20,6 h (F1-Generation) bestimmt (Abb. 3.37). Die Halbwertszeiten der *Pinus-Lhc*-mRNA (4,7 h bzw. 15 h und 20,6 h) waren damit in jedem Fall deutlich größer im Vergleich zu den Halbwertszeiten der Tomaten-*Lhc*-Transkripte (0,9 h bzw. 1,3 h und 1 h). Dies wird durch die Bildung des Quotienten aus *Pinus-Lhc*-Transkriptstabilität und Tomaten-*Lhc*-Transkriptstabilität verdeutlicht (Tabelle 3.2). Die hohe Variabilität der beiden unabhängigen Versuchsreihen 1 und 2 bei der Untersuchung der F0-Generation beider Linien lassen sich durch die Verwendung unterschiedlich alten Blattmaterials derselben Pflanzen erklären. Dies könnte auf eine Abhängigkeit der Halbwertszeiten vom Entwicklungsstand des Gewebes hindeuten.

Transgene Tomaten-Linie	Stabilität der Tomaten- <i>Lhc</i> -mRNA	Stabilität der <i>Pinus-Lhc</i> -mRNA	Quotient Stabilität der <i>Pinus-Lhc</i> -mRNA / Stabilität der Tomaten- <i>Lhc</i> -mRNA
14/25 (F0-Generation)	Mittel 0,9 h 1. Versuchsreihe: 0,7 h 2. Versuchsreihe: 1,1 h	Mittel 4,7 1. Versuchsreihe: 6,9 h 2. Versuchsreihe: 2,4 h	Mittel 5,2 1. Versuchsreihe: 9,9 2. Versuchsreihe: 2,2
8/2 (F0-Generation)	Mittel 1,3 h 1. Versuchsreihe: 0,9 h 2. Versuchsreihe: 1,7 h	Mittel 15 h 1. Versuchsreihe: 25 h 2. Versuchsreihe: 5,2 h	Mittel 11,5 1. Versuchsreihe: 27,8 2. Versuchsreihe: 3,1
8/2 (F1-Generation)	1. Versuchsreihe 1 h	1. Versuchsreihe 20,6 h	1. Versuchsreihe 20,6

**Tabelle 3.2 Übersicht über die Ergebnisse der Stabilitätsmessungen bei Bestimmung eines *Pinus contorta-Lhc*- und der Tomaten-*Lhc*-Transkripte in transgenen Tomaten**



**Abb. 3.37** Densitometrische Auswertungen der Autoradiogramme der Proben zur Bestimmung der *Pinus-Lhc*-Transkriptstabilität in transgenen Tomatenpflanzen mit dem Konstrukt **35S::*Lhcb*(*Pinus contorta*)**

A: Linie 14/25 (F0-Generation)

B: Linie 8/2 (F0-Generation)

C: Linie 8/2 (F1-Generation)

Die Linien markieren die Regressionsgeraden der beiden unabhängigen Experimente der F0-Generation und eines Experimentes der F1-Generation mit je 3-5 Einzelwerten, von den die Maximal- und Minimalwerte jeweils eingezeichnet wurden. Die Messwerte der ersten Versuchsreihe der F0-Generation sind als ausgefüllte Symbole, die der zweiten Versuchsreihe als offene Symbole angegeben. Die Abbildung der Autoradiogramme der ersten Versuchsreihe sind in Abb. 3.35, A-C, mittlere Reihen dargestellt.

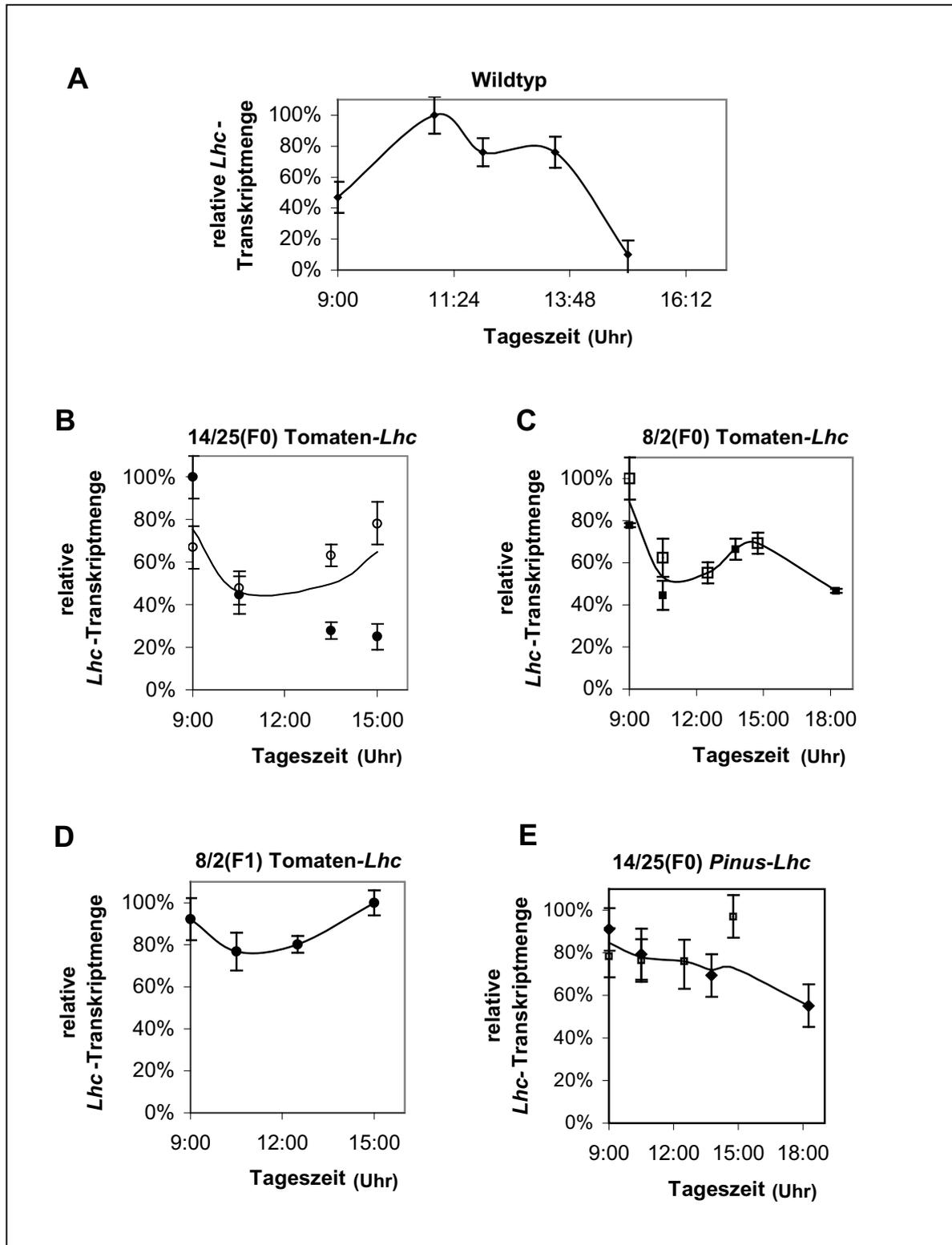
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den beiden transgenen Tomatenlinien 8/2 und 14/25 mit dem Konstrukt *35S::*Lhcb*(*Pinus contorta*)* die *Pinus-Lhc*-mRNA in jedem Fall stabiler war im Vergleich zu den Tomaten-*Lhc*-Transkripten. Weil die Messungen in

derselben Pflanze durchgeführt wurden und somit z. B. die gleiche zelluläre Voraussetzungen wie Verfügbarkeit von RNasen, RNase-Aktivität, Wirksamkeit von Actinomycin D u. a. vorlagen, kann gefolgert werden, dass Sequenzunterschiede der Transkripte für die veränderten Halbwertszeiten verantwortlich sind.

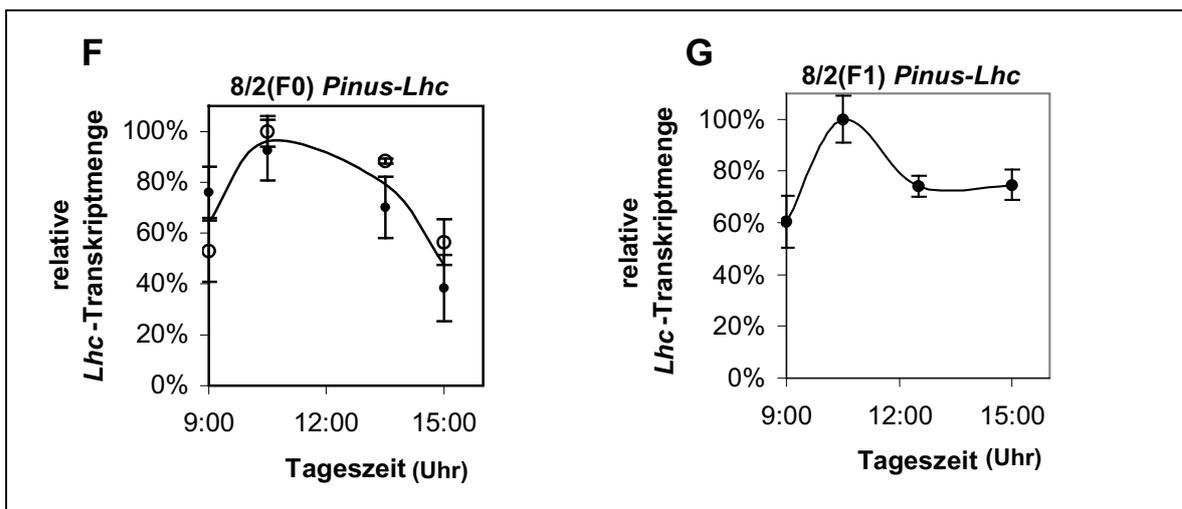
In Kontrollversuchen wurde Pflanzenmaterial in Puffer ohne Actinomycin D inkubiert, um Aussagen treffen zu können, ob sich die Resultate der Stabilitätsmessungen auch auf die Situation in einer intakten Pflanze übertragen lassen. Treten keine Sekundäreffekte auf, sollten Prozesse wie Aufbau und Abbau der mRNA in gleicher Weise ablaufen wie in einer intakten Pflanze. Die Tomaten-*Lhc*-Transkriptakkumulation sollte in diesen Kontrollproben in einer linearen Auftragung gegen die Zeit einem diurnalen Rhythmus folgen. Bei Fiedern des Wildtyps ließ sich eine diurnale Schwankung mit Maximum zur Mittagszeit erkennen (Abb. 3.38 A). In den beiden transgenen Linien (Linie 8/2 und Linie 14/25) konnten dagegen bei keiner Messung derartig ausgeprägten Fluktuationen der Tomaten-*Lhc*-mRNA-Menge detektiert werden (Abb. 3.38 B, C und D). In der Linie 8/2 verlief die Tomaten-*Lhc*-Transkriptakkumulation sowohl in den beiden Versuchsreihen der F0-Generation wie auch bei der F1-Generation annähernd konstant ( $70\% \pm 15\%$  bzw.  $90\% \pm 10\%$ ) (Abb. 3.38 C, D). In der Linie 14/25 konnte in der ersten Versuchsreihe ein Maximum zu Beginn der Untersuchungen um 9.00 Uhr festgestellt werden, danach sank die Tomaten-*Lhc*-mRNA-Menge auf einen Wert von ca. 30%, während in der zweiten Versuchsreihe die *Lhc*-Transkriptmenge im Tagesverlauf analog zur Linie 8/2 um einem Mittelwert von ca. 70% schwankte (Abb. 3.38 B). Daraus folgt, dass das zusätzlich zum Wildtyp eingebrachte Transgen (*Lhcb* aus *Pinus contorta*) eine Wirkung auf die Expression der in Tomate vorhandenen *Lhc*-Genfamilie ausübte.

Die Expression der transgenen *Pinus*-mRNA stand unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus CaMV. Dieser virale Promotor wurde verwendet, um eine hohe Expression des Transgens zu gewährleisten. Bei der transgenen Tomatenlinie 14/25 schwankte der Gehalt der *Pinus-Lhc*-mRNA im Tagesverlauf um einen Mittelwert von 75% (Abb. 3.38 E). Bei der Linie 8/2 folgte die *Pinus-Lhc*-Transkriptakkumulation hingegen sowohl in der F0-Generation wie auch in der F1-Generation einem diurnalen Rhythmus mit Maximum bei 11 Uhr (Abb. 3.38 F, G). In der Literatur existieren keine Daten über die Expression des verwendeten 800 bp langen 35S-Promotors im Tagesverlauf. Aus den Ergebnissen lässt sich aber folgern, dass die Expression, die durch diesen Promotor reguliert wird, durch weitere unbekannte Faktoren beeinflusst werden kann, die offenbar in den beiden

transgenen Linien unterschiedlich zum Tragen kommen. Die *Lhc*-Transkriptakkumulationsverläufe konnten in beiden Versuchsreihen (1 und 2) bei den Untersuchungen der F0-Generation beider Linien gemessen werden und waren folglich nicht entwicklungsspezifisch.



Legende der Abbildung nächste Seite



**Abb. 3.38** Densitometrische Auswertungen der Autoradiogramme des Wildtyps und der Kontrollproben in den Stabilitätsversuchen

A: Tomaten-*Lhc*-Transkriptverteilung im Wildtyp

B: Tomaten-*Lhc*-Transkriptverteilung in Tomatenpflanzen der Linie 14/25 (F0-Generation)

C: Tomaten-*Lhc*-Transkriptverteilung in Tomatenpflanzen der Linie 8/2 (F0-Generation)

D: Tomaten-*Lhc*-Transkriptverteilung in Tomatenpflanzen der Linie 8/2 (F1-Generation)

E: *Pinus-Lhc*-Transkriptverteilung in Tomatenpflanzen der Linie 14/25(F0-Generation)

F: *Pinus-Lhc*-Transkriptverteilung in Tomatenpflanzen der Linie 8/2 (F0-Generation)

G: *Pinus-Lhc*-Transkriptverteilung in Tomatenpflanzen der Linie 8/2 (F1-Generation)

Die Linien markieren die Mittelwerte mit Standardabweichung der beiden unabhängigen Experimente der F0-Generation und eines Experimentes der F1-Generation mit je 3-5 Einzelwerten. Die Messwerte der ersten Versuchsreihe sind als ausgefüllte Symbole, die der zweiten Versuchsreihe als offene Symbole angegeben.

### 3.2.3.4 Sequenzvergleichende Untersuchungen und Berechnungen zur Vorhersage der Sekundärstrukturen verschiedener *Lhc*-RNA-Spezies aus *Lycopersicon esculentum* und *Pinus contorta*

Wie die Ergebnisse aus 3.2.3.3 zeigen, sind vermutlich die Sequenzen der *Lhc*-Transkriptes von *Pinus contorta* und der Tomaten-*Lhc*-mRNA für die Unterschiede in der Stabilität verantwortlich. Die Tomaten-*Lhc*-Transkripte sind die Produkte einer Genfamilie mit mindestens 19 verschiedenen Mitgliedern. Das *Lhc1\*2* (*cab1B*)-Transkript bildet dabei mit bis zu 50% den Hauptanteil (Kellmann et al. 1993) der Gesamt-*Lhc*-Transkripte in Tomate und wird deshalb im Folgenden mit dem *Lhc*-Transkript von *Pinus contorta* verglichen.

Beim Vergleich der Transkripte auf Nukleotidebene (Abb. 3.39) wurde eine Gesamtübereinstimmung von 64% festgestellt. Dabei glichen sich 40% in der 5' untranslatierten Region (5' UTR), 72% in der kodierenden Region und 47% in der 3' untranslatierten Region (3' UTR). Die Ähnlichkeit war somit in den kodierenden Bereichen stärker ausgeprägt als in den UTRs. Beim Vergleich der 3'untranslatierten Regionen (3'UTRs) mit Hilfe einer Datenbank (<http://bio-www.ba.cnr.it:8000/cgi-bin/BioWWW>) ließ

sich feststellen, dass die 3'UTR des Tomaten-*Lhc1\*2*-Gens zu den 3'UTRs von Angiospermen (Tabak-*Lhc*-Genen) mehr Ähnlichkeit aufwies als zu denen aus Gymnospermen (Tabelle 3.3). Analog fand sich beim Vergleich der 3'-UTR des *Pinus contorta-Lhcb*-Gens eine höhere Übereinstimmung zu 3'-UTRs von *Lhc*-Gene aus Gymnospermen (*Pinus palustris*, *Pinus thunbergii*). Identitäten im 5'UTR-Bereich der Gene mit 5'-UTRs aus anderen Pflanzenspezies konnten mit Hilfe dieser Datenbank nicht gezeigt werden. Aus dem Abgleich lässt sich folgern, dass generell Sequenzunterschiede zwischen den 3'-untranslatierten Regionen der *Lhc*-Gene von Gymnospermen und Angiospermen bestehen.

Untersuchte 3'UTR	Ähnliche 3'UTR
3'UTR der <i>Lhc1*2</i> -mRNA aus Tomate (LECBPA, AC M14443)	cab21 aus Tabak, 78,9% Identität bei Vergleich von 90 Nukleotiden cab50 aus Tabak, 72% Identität bei Vergleich von 65 Nukleotiden
3'UTR der <i>Lhcb</i> -mRNA aus <i>Pinus contorta</i> (PCO313013, AC AJ313013)	<i>Lhc</i> Type 1 aus <i>Pinus palustris</i> , 98,4% Identität bei Vergleich von 123 Nukleotiden <i>Lhc</i> aus <i>Pinus thunbergii</i> , 89,2% Identität bei Vergleich von 139 Nukleotiden

**Tabelle 3.3 Ergebnisse des Vergleichs von 3-untranslatierten Regionen mit Hilfe einer Datenbank (<http://bio-www.ba.cnr.it:8000/cgi-bin/BioWWW>)**



**Abb. 3.39 Sequenzvergleich zwischen der *Lhcb* mRNA aus *Pinus contorta* (PCO313013, AC AJ313013) und der *Lhc1\*2* (*cab1b*) mRNA aus Tomate (LECBPA, AC M14443)**

In fetten, kursiv geschriebenen Buchstaben ist der Anteil des 35S-Promoters markiert. Fett unterlegt wurden zwei destabilisierenden AUUUA-Elemente.

→ Translation start

▲ Translation stop

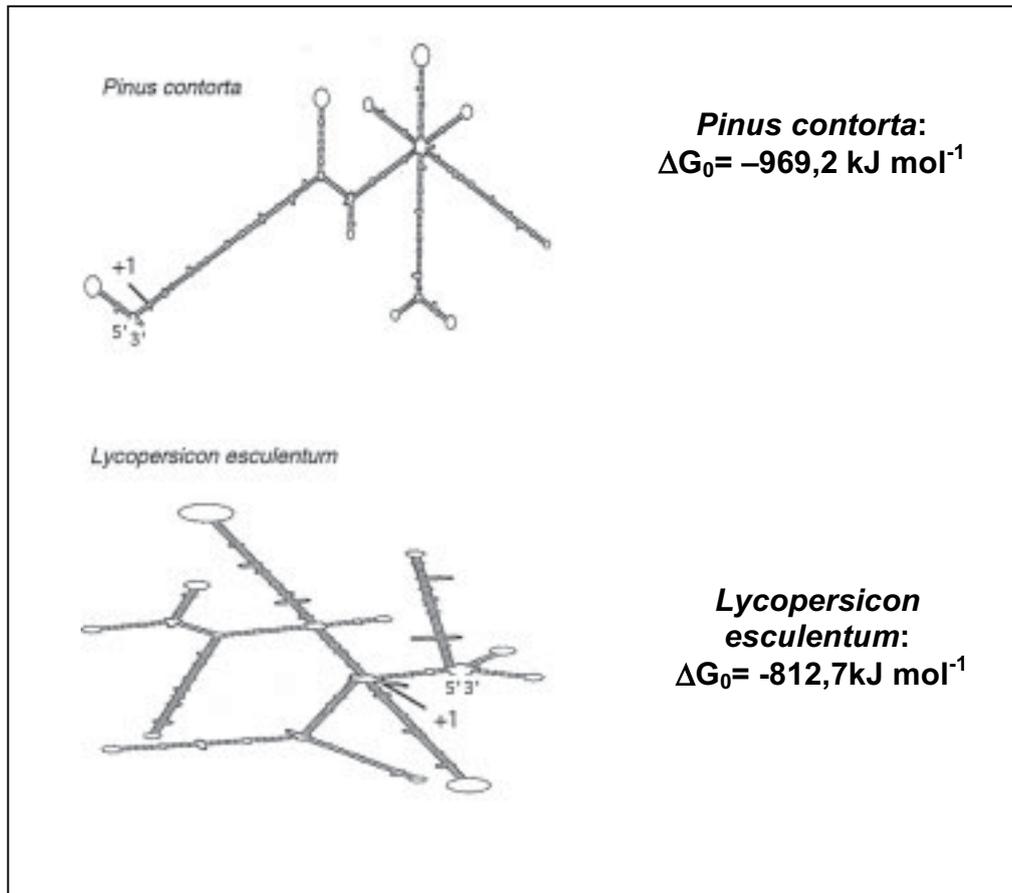
In der Literatur sind verschiedene destabilisierende Sequenzelemente beschrieben, die für eine Instabilität der mRNA sorgen können (zusammengefasst in Gutierrez et al. 1999). Von Ohme-Takagi et al. (1993) und Chen und Shyu (1995) konnte gezeigt werden, dass in Tieren und Pflanzen AUUUA-Elemente im 3'UTR-Bereich eine Instabilität der RNA-Spezies vermitteln können. Dieses Element konnte in der 3'UTR des *Lhc1\*2*-Transkripts der Tomate in zweifacher Kopie gefunden werden, während es bei *Pinus contorta* nicht auftauchte (Element markiert in Abb. 3.39). Diese Beobachtung unterstützt die bisherigen Resultate aus 3.2.3.3, die zeigten, dass die *Pinus-Lhc*-Transkripte in transgenen Tomatenpflanzen mit dem Konstrukt 35S::*Lhcb*(*Pinus contorta*) sehr viel stabiler sind als die Tomaten-*Lhc*-Transkripte.

In weiteren Untersuchungen wurden an der Universität Düsseldorf durch Frau Dr. Klaff Strukturkalkulationen bei 40°C und 1M NaCl Ionenstärke nach Schmitz und Steger (1992) vorgenommen. Mit Hilfe eines Computerprogramms wurde aus allen rechnerisch möglichen Sekundärstrukturen die Struktur mit der geringsten freien Enthalpie errechnet. Die thermodynamisch günstigsten Strukturen der *Lhcb* mRNA aus *Pinus contorta* und der *Lhc1\*2* (*cab1B*) mRNA aus Tomate sind in Abb. 3.40 gezeigt. Für die freie Enthalpie ergaben sich dabei folgende Werte:

- *Pinus contorta*: -969,2 kJ/mol (987 Nukleotide)
- Tomate: -812,7 kJ/mol (1108 Nukleotide)

Somit lässt sich sagen, dass die freie Energie pro Nukleotid bei der *Pinus-Lhc*-mRNA mit 0,98 kJ/mol im Vergleich zur Tomaten-*Lhc*-mRNA mit 0,73 kJ/mol um mehr als 30% höher lag. Diese Rechnungen unterstützen die bisherigen Untersuchungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Sequenzvergleich, die Berechnungen zur Sekundärstruktur und das Auftreten bzw. Fehlen von destabilisierenden Sequenzmotiven die experimentellen Daten aus 3.2.3 unterstützen.



**Abb. 3.40** Kalkulierte Sekundärstrukturen der *Lhcb* mRNA aus *Pinus contorta* (PCCABA, AC X67714) und der *Lhc1\*2* (*cab1B*) mRNA aus Tomate (LECBPA, M14443). Die Berechnungen wurden nach Schmitz and Steger (1992) bei 40°C und 1M NaCl vorgenommen. (Translationstart = +1).

### 3.3 Physiologische Untersuchungen

Aus den Vorarbeiten zu dieser Dissertation (Oberschmidt et al. 1995; Jäschke 1996) konnten keine Aussagen getroffen werden, ob eine innere Uhr in der Unterklasse der Gymnospermen vorhanden ist. Aus diesem Grund sollten im Verlauf dieser Arbeit weitere Parameter untersucht werden, von denen aus Angiospermen bekannt ist, dass sie eine circadiane Rhythmik aufweisen. Dazu gehören z. B. Blatt- und Stomatabewegungen, deren Ausprägung im Tagesverlauf an verschiedenen Gymnospermen ermittelt wurde.

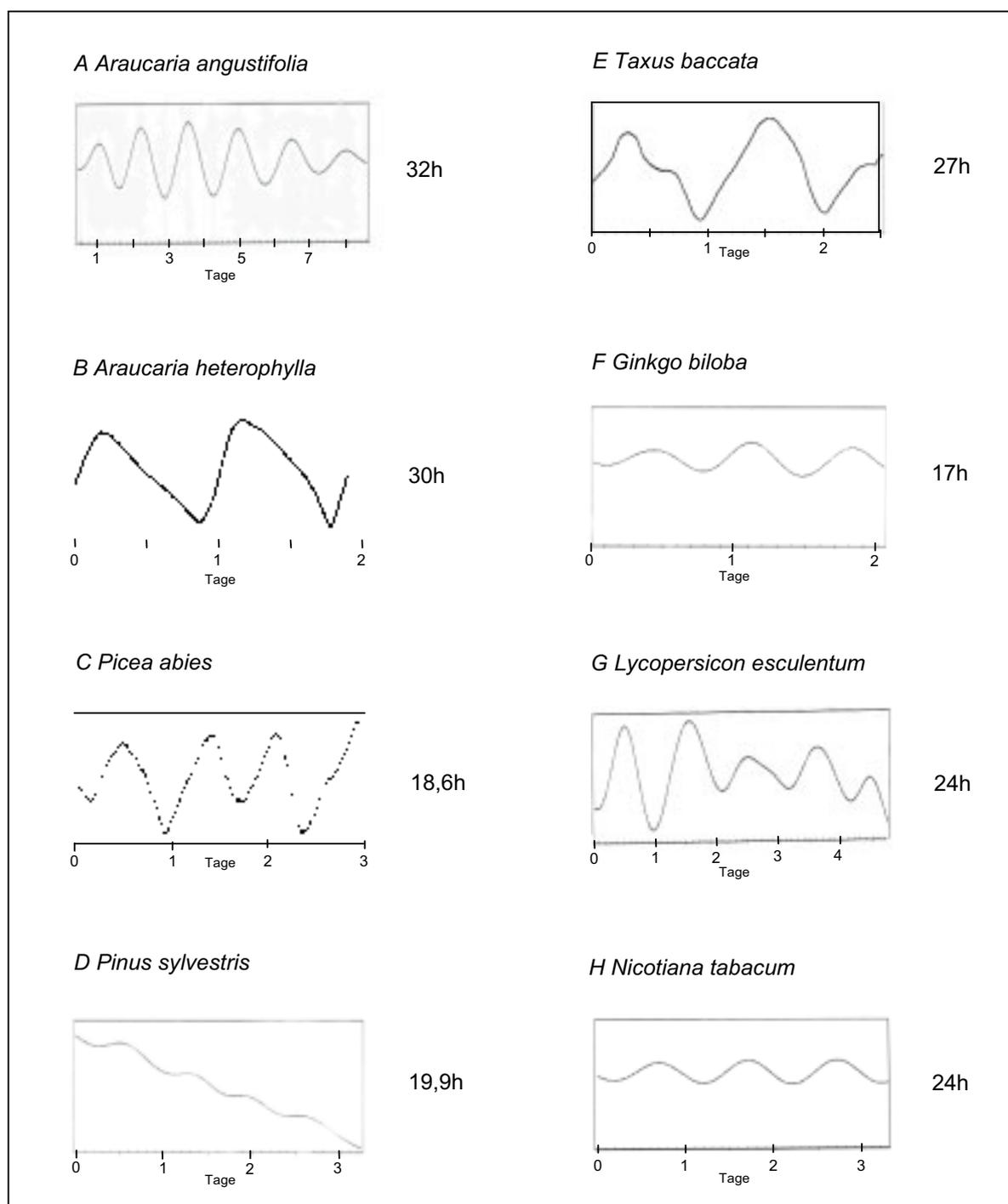
#### 3.3.1 Blattbewegungen

Zur Detektion von Blattbewegungen wurde eine Apparatur verwendet, die Prof. Dr. Engelmann von der Universität Tübingen freundlicherweise zur Verfügung stellte. Dabei wurde auf dem zu untersuchenden Blatt mit Farbe oder durch Ankleben von Styropor ein

weißer Punkt angebracht. Mit Hilfe einer Schwarzweiß-Kamera konnte im Anschluss die Bewegung dieses Punktes auf einem dunklen Hintergrund verfolgt werden. Die Messungen wurden mit 6 Gymnospermenarten und 2 Angiospermenarten durchgeführt.

Bei allen sechs untersuchten Gymnospermen (*Ginkgo biloba*, *Pinus sylvestris*, *Picea abies*, *Taxus baccata*, *Araucaria heterophylla* und *Araucaria angustifolia*) konnten circadiane Blattbewegungen im Dauerlicht für mehr als 5 Tage detektiert werden. Auch bei den Angiospermen *Lycopersicon esculentum* und *Nicotiana tabacum* wurden ebenfalls circadiane Blattschwingungen gemessen (Abb. 3.41). Die Amplitude der Schwingungen bei den Gymnospermen war im Vergleich zu der bei den betrachteten Angiospermen wesentlich geringer. Eine Ausnahme bildete dabei *Araucaria heterophylla*, bei der die Schwingungen mit ähnlich starken Amplituden wie bei Tomate bzw. Tabak detektiert werden konnten. Die Periodenlängen in den Messungen variierten zwischen 17 h und 32 h und waren artspezifisch, aber auch vom Entwicklungsstadium abhängig. So wurde beispielsweise die Periode bei *Araucaria heterophylla* mit Alterung der Nadeln immer größer. Bei fortschreitender Alterung konnte schließlich keine Schwingungen mehr detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei allen untersuchten Gymnospermenarten eine circadiane Regulation der Blattbewegungen gemessen werden konnte. Die Existenz einer inneren Uhr in dieser Untergruppe der Samenpflanzen konnte mit Hilfe dieser Experimente bestätigt werden.



**Abb. 3.41 Blattbewegungen von 6 Gymnospermen- und 2 Angiospermenarten im Dauerlicht und bei konstanter Temperatur (Lichtintensität  $75 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ):**

A *Araucaria angustifolia*, 9 Wochen alt

B *Araucaria heterophylla* 15 Jahre alt, junge Triebe

C *Picea abies* 20 Wochen alt

D *Pinus sylvestris*, 13 Wochen alt

E *Taxus baccata*, 4 Jahre alt

F *Ginkgo biloba*, 6 Monate alt

G *Lycopersicon esculentum* VFNT LA 1221, 12 Wochen alt

H *Nicotiana tabacum*, 8 Wochen alt

Angegeben sind die Daten, bei denen alle Schwingungen mit Periodenlängen kleiner als 12 h mathematisch herausgefiltert wurden und/oder nach Trendbereinigung die Periodenlänge mittels einer Spektralanalyse bestimmt wurde. Neben den Diagrammen wurde jeweils die Periodenlänge angegeben.

### 3.3.2 Gaswechselfmessungen und elektronenmikroskopische Aufnahmen

In Angiospermen werden die CO<sub>2</sub>-Aufnahme und der Wasserverlust über die Transpiration durch das Öffnen bzw. Schließen der Stomata kontrolliert. Obwohl eine Vielzahl an Untersuchungen zu stomatären Rhythmen in Pflanzen in der Literatur beschrieben wird, finden sich darunter keine Daten über Gymnospermen. Aus diesem Grund sollte die Stomataleitfähigkeit im Tagesverlauf in der Gymnosperme *Ginkgo biloba* und der Angiosperme *Nicotiana tabacum* untersucht werden. Dazu stellte Prof. Dr. Raschke, Universität Göttingen, freundlicherweise eine Gasanalyseapparatur zur Verfügung. Blätter intakter Pflanzen von *Ginkgo biloba* (2 Jahre alt) bzw. *Nicotiana tabacum* (7 Monate alt) wurden in eine Blattkammer eingespannt. Aus den Konzentrationen an CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O im Gasstrom vor und nach Durchtritt durch die Blattkammer wurde die stomatäre Leitfähigkeit errechnet.

Im Lichtdunkelwechsel folgte die stomatäre Leitfähigkeit bei *Ginkgo biloba* einem diurnalen Rhythmus. Im Licht konnte eine stomatäre Leitfähigkeit von 0,2 mol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> ermittelt werden, die während der Dunkelphase auf 0 mol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> sank. Die Amplitude war in der zweiten Nacht geringer ausgeprägt und lag bei 0,1 mol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> (Abb. 3.42 A). Im Dauerlicht und bei konstanter Temperatur konnte bei Tabak eine circadiane Kontrolle der stomatären Leitfähigkeit beobachtet werden. Dabei sank die Leitfähigkeit von 0,18 mol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> auf 0,03 mol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> ab, um am subjektivem Tag wieder auf einen Wert von 0,2 mol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> anzusteigen (Abb. 3.42 C).

Bei *Ginkgo biloba* konnte im Gegensatz dazu kein Absinken der Leitfähigkeit und somit auch kein Schließen der Stomata in der subjektiven Nacht im Dauerlicht gemessen werden (Abb. 3.42 B). Hier schien somit die circadiane Komponente zu fehlen. Da es durchaus möglich ist, dass die Schwankungen in Bezug auf diesen Parameter geringer sind als im Lichtdunkelwechsel und somit unter der Detektionsgrenze liegen könnten, sollten die in den Gaswechselfmessungen erhaltenen Ergebnisse durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt oder widerlegt werden.

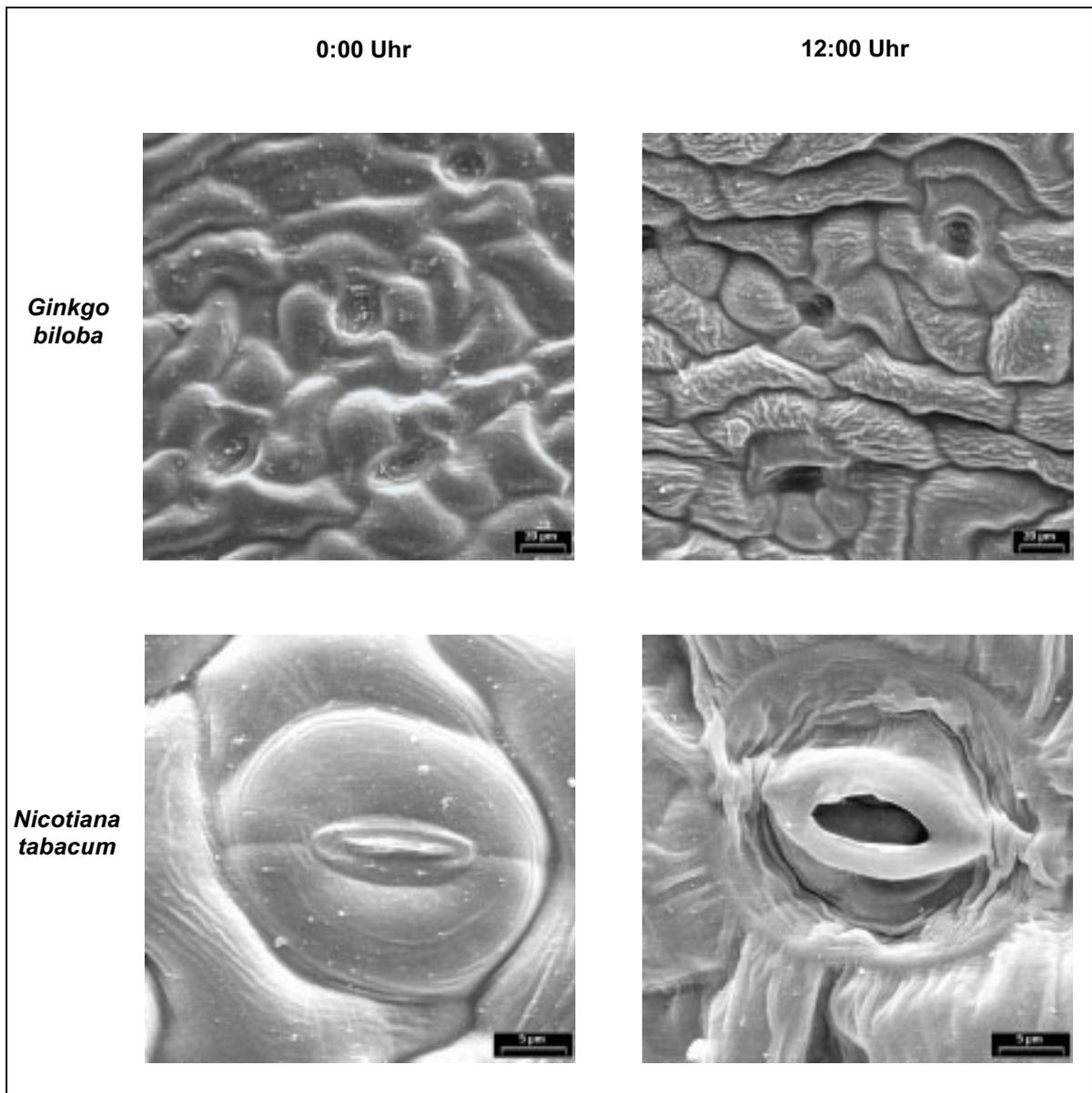


Abb. 3.43 EM-Aufnahmen der Stomata von *Ginkgo biloba* (oben) und *Nicotiana tabacum* (unten) im Lichtdunkelwechsel (Lichtphase: 6-22 Uhr,  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $23^\circ\text{C}$  konstant)

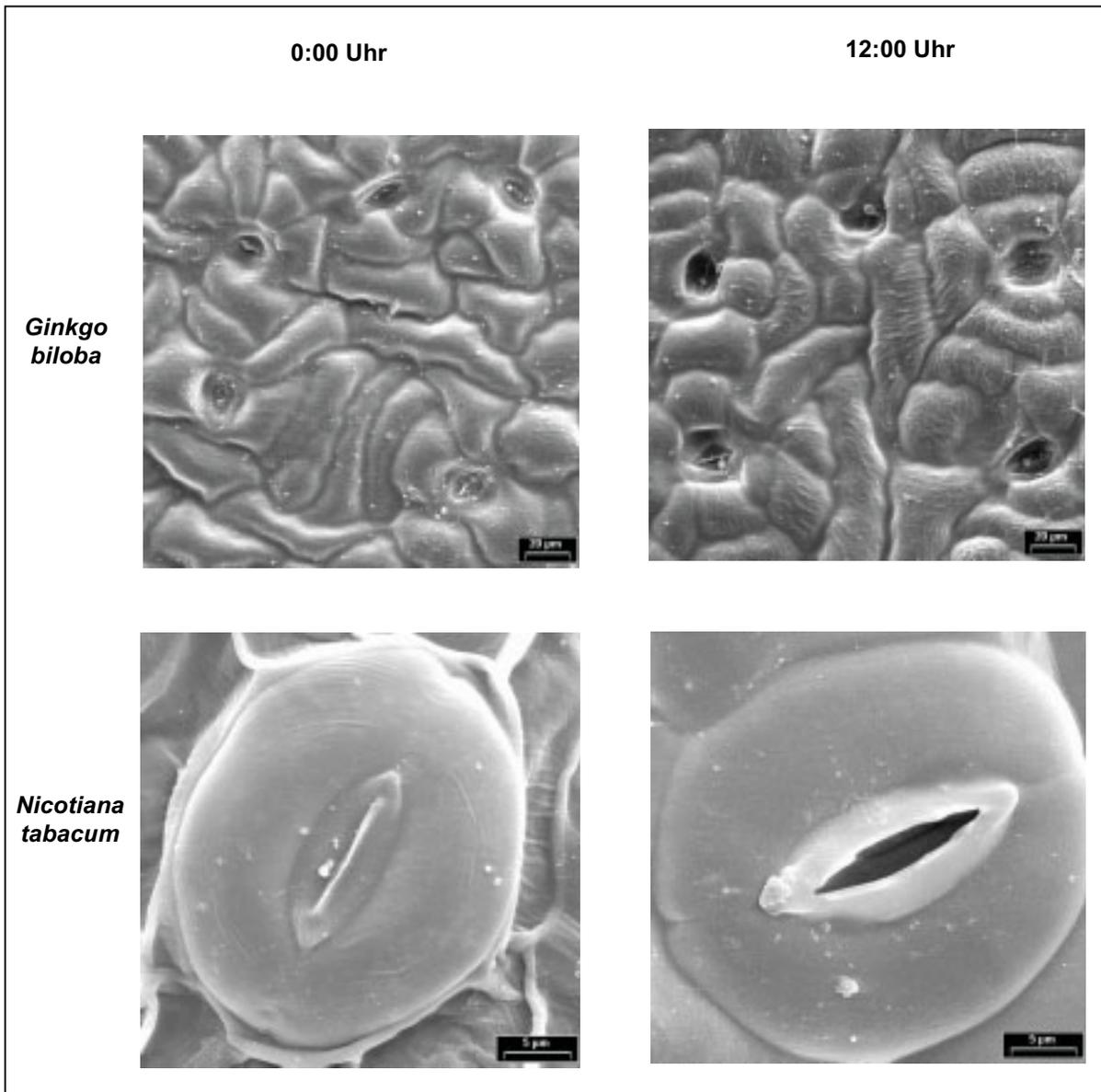


Abb. 3.44 EM-Aufnahmen der Stomata von *Ginkgo biloba* (oben) und *Nicotiana tabacum* (unten) im Dauerlicht ( $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $23^\circ\text{C}$  konstant)

## 4. Diskussion

### 4.1 *Lhc*-Transkriptakkumulation und *Lhc*-Transkription in Gymnospermen

Bei den bislang untersuchten Vertretern der Gymnospermen aus der Unterabteilung der Coniferophytina *Abies alba*, *Ginkgo biloba*, *Larix decidua*, *Picea abies*, *Pinus sylvestris* (Abb. 3.2), *Pinus contorta* (Abb. 3.3) und *Taxus baccata* konnten keine tageszeitlichen Schwankungen der *Lhc*-Transkriptmenge unter Licht-Dunkel-Bedingungen gemessen werden (Oberschmidt et al. 1995, Jäschke 1996, diese Arbeit, Tabelle 4.1). Die *Lhc*-mRNA-Gehalte in *Pseudotsuga menziesii* zeigten hingegen eine geringe diurnale Fluktuation mit einer Amplitude von ca. 25%, die am ersten Tag im Dauerdunkel, also unter circadianen Bedingungen, nicht mehr auftrat (Alosi et al. 1990). Darüber hinaus konnte keine circadiane Schwingung der *Lhc*-mRNA-Menge bei *Larix decidua* am ersten Tag im Dauerdunkel und bei *Pinus sylvestris* am 1. und 2. Tag im Dauerdunkel ermittelt werden (Oberschmidt et al. 1995, Abb. 3.5). Bei der Detektion der *Lhc*-mRNA-Gehalte nach 5 Tagen im Dauerdunkel wurde dagegen bei *Pinus sylvestris* eine circadiane Oszillation beobachtet (Abb. 3.6 und 3.7). Die Phase dieser Schwingung war bei *Pinus sylvestris* abhängig vom gewählten Anzuchtsubstrat (Anzucht auf Erde oder in Sterilkultur, Abb. 3.6 und 3.7). Auch bei *Ginkgo biloba* konnten circadiane Schwingungen bezüglich der *Lhc*-mRNA-Menge am 4. und 6. Tag im Dauerdunkel detektiert werden (Abb. 3.8).

In der Literatur finden sich nur wenige Daten zum Verlauf der *Lhc*-mRNA-Akkumulation in der zweiten Gruppe der Gymnospermen, den Cycadophytina (Tabelle 4.1). So zeigten *Ephedra campylopoda* und *Welwitschia mirabilis* keine diurnalen Fluktuationen bezüglich des *Lhc*-mRNA-Gehaltes (Jäschke 1996). Diurnale Schwankungen konnten hingegen bei zwei weiteren Vertretern der Cycadophytina, *Gnetum gnemon* und *Dioon spinulosum*, detektiert werden (Oberschmidt et al. 1995, Jäschke 1996). Da die Cycadophytina und die Unterabteilung der Angiospermen vermutlich auf gemeinsame Stammformen (Lyginopteridopsida) zurückgehen (Sitte et al. 1992), könnte spekuliert werden, dass diese Stammformen einen diurnalen Verlauf der *Lhc*-mRNA-Akkumulation zeigten. Bei der weiteren Differenzierung der Gnetopsida, einer Klasse der Cycadophytina, in die drei Unterklassen der Ephidridae, Welwitschiidae und der Gnetidae könnte diese Fähigkeit bei den Ephidridae und Welwitschiidae verloren gegangen sein. Um diese Hypothese zu verifizieren

oder zu widerlegen, besteht weiterer Forschungsbedarf. Dazu sollten weitere Vertreter der Cycadophytina auf dieses Kriterium hin untersucht werden.

Gymnosperme	Gen	diurnal	circadian	Quelle
<i>Abies alba</i>	<i>Lhc</i>	-	n. d.	Oberschmidt et al. 1995
<i>Dioon spinulosum</i>	<i>Lhc</i>	+	n. d.	Oberschmidt et al. 1995
<i>Ephedra campylopoda</i>	<i>Lhc</i>	-	n. d.	Jäschke 1996
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Lhc</i>	-	+ (4., 6. Tag im DD)	Jäschke 1996, diese Arbeit
<i>Gnetum gnemon</i>	<i>Lhc</i>	+	n. d.	Jäschke 1996
<i>Larix decidua</i>	<i>Lhc</i>	-	-	Oberschmidt et al. 1995 Jäschke 1996
<i>Picea abies</i>	<i>Lhc</i>	-	n. d.	Oberschmidt et al. 1995
<i>Pinus contorta</i>	<i>Lhc</i>	-	n. d.	diese Arbeit
<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Lhc</i>	-	+/- (1., 2. Tag im DD) + (6. Tag DD)	Jäschke 1996, diese Arbeit
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	<i>Lhc</i>	+/- *	-	Alosi et al. 1990
<i>Taxus baccata</i>	<i>Lhc</i>	-	n. d.	Jäschke 1996
<i>Welwitschia mirabilis</i>	<i>Lhc</i>	-	n. d.	Jäschke 1996

**Tabelle 4.1 Übersicht aller bisher bekannten Daten zur diurnalen/circadianen *Lhc*-Genexpression in Gymnospermen**

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit in Kombination mit Literaturdaten festgehalten werden, dass in 9 von 12 untersuchten Gymnospermenarten ein anderer zeitlicher Verlauf der *Lhc*-mRNA-Akkumulation unter Licht-Dunkel-Bedingungen mit nicht diurnaler Ausprägung der *Lhc*-Transkriptgehalte im Vergleich zu Angiospermen (wie z. B. *Helianthus annuus*, Abb. 3.1) auftrat. Die Maxima der *Lhc*-mRNA-Gehalte, die in Angiospermen um die Mittagszeit oder am Vormittag gemessen werden konnten (Meyer et al. 1989), waren nicht existent. Auch die Quotienten der relativen *Lhc*-mRNA-Konzentrationen zwischen Maximum und Minimum waren mit Werten von 1,1 bis 1,6 sehr viel kleiner als die der Angiospermen, die sich bei Sonnenblume, Weizen, Tabak oder Tomate in einem Bereich von 7 bis 50 (Kay und Millar 1993, Abb. 3.1) bewegen.

In Angiospermen können Literaturdaten zufolge verschiedene Parameter einen Einfluss auf die Amplitude der Gesamt-*Lhc*-Transkriptakkumulation ausüben. So kann nach Meyer et al. (1989) die Amplitude der Schwingung der *Lhc*-Transkriptakkumulation in der Angiosperme Tomate vom Entwicklungsstadium abhängig sein. Die größten Unterschiede zwischen Maxima und Minima der *Lhc*-mRNA-Mengen im Tagesverlauf, die mit zunehmendem Blattalter kleiner wurden, detektierten Meyer et al. (1989) in jungen Tomatenblätter. Wie in dieser Arbeit wurden auch von Jäschke (1996), Oberschmidt et al. (1995) sowie Alosi et al. (1990) Keimlinge der Gymnospermen *Abies alba*, *Picea abies*, *Pinus contorta*, *Pinus sylvestris*, *Pseudotsuga menziesii* und *Larix decidua* bzw. junge Pflanzen von *Welwitschia mirabilis* verwendet. Somit sollten, bezogen auf das Entwicklungsstadium, deutliche Unterschiede zwischen Maximum und Minimum zu erwarten sein. In der Gymnosperme *Pinus palustris* wurde von Peer et al. (1996) die Abhängigkeit des *Lhc*-mRNA-Gehaltes von der Länge der Kotyledonen untersucht. Sie konnten ermitteln, dass der relative *Lhc*-Transkriptgehalt mit einer Längenzunahme der Kotyledonen von 0,5 cm bis 3 cm anstieg. Bei der Ernte des Blattmaterials der für diese Arbeit verwendeten Arten der gleichen Gattung, *Pinus contorta* und *Pinus sylvestris*, wiesen die Kotyledonen eine Länge von 2-3 cm auf, so dass damit auch hohe *Lhc*-mRNA-Gehalte und – sofern vorhanden- eine deutliche Amplitude der *Lhc*-mRNA-Mengen im Tagesverlauf zu erwarten waren. Unter Berücksichtigung dieser Fakten ist es unwahrscheinlich, dass eine diurnale *Lhc*-mRNA-Akkumulation bei anderen Entwicklungsstadien wie z. B. älteren oder jüngeren Nadeln/Blättern in Gymnospermen gemessen werden könnte.

Auch die Temperatur kann einen Einfluss auf die Amplitude der diurnalen/circadianen *Lhc*-mRNA-Akkumulation in Angiospermen ausüben. So zeigten sich bei Temperaturen von 4°C bzw. 10°C reduzierte oder/ und kaum messbare Oszillationen der *Lhc*-mRNA in *Arabidopsis* und Tomate (Krebs und Simon 1997, Riesselmann und Piechulla 1990). Die im Rahmen dieser Arbeit und in der Literatur beschriebenen Experimente wurden bei konstanten Temperaturen von 24°C (*Pinus contorta*, *Pseudotsuga menziesii*, *Welwitschia mirabilis*) bzw. 18°C (*Pinus sylvestris*), unter natürlichen Temperaturverhältnissen (August 1999: *Ginkgo biloba*; August 1995: *Taxus baccata*; April 1991: *Abies alba* und *Picea abies*) oder bei geringen Temperaturschwankungen in einer Klimakammer (Tag 18°C, Nacht 15°C: *Larix decidua*) vorgenommen. Daraus lässt sich folglich keine Begründung für das Auftreten einer nicht diurnalen *Lhc*-mRNA-Akkumulation bei den untersuchten Gymnospermen ableiten.

Darüber hinaus kann eine unterschiedliche Expression der Mitglieder der *Lhc*-Genfamilie in Angiospermen einen Einfluss auf die Amplitude der Gesamt-*Lhc*-Transkriptakkumulation ausüben. So konnten Millar und Kay (1991) zeigen, dass der Gesamt-*Lhc*-Gehalt in der Angiosperme *Arabidopsis* im Tagesverlauf nur einer geringen Oszillation unterlag. Für den Unterschied zwischen Maximum und Minimum bei Detektion des Gesamt-*Lhc*-Gehaltes wurde demzufolge von ihnen ein für Angiospermen kleiner Wert von 3 bestimmt. Die Transkription (Synthese der mRNA) beider untersuchter *Lhc*-Gene (*Lhcb1\*1* , *Lhcb1\*2* (*cab1*, *cab2*)) erfolgte in *Arabidopsis* diurnal/circadian. Die geringen Schwankungen der *Lhc*-mRNA-Konzentrationen des *cab1*-Transkriptes im Tagesverlauf und somit auch des Gesamt-*Lhc*-Pools führten die Autoren auf eine posttranskriptionale Regulation zurück. Wie in Angiospermen können auch in Gymnospermen die *Lhc a*- und die *Lhc b*-Gene zu einer Genfamilie zusammengefasst werden. Ein „Ursprungs-*Lhc*-Gen“ war im Lauf der Evolution dabei vermutlich einer Reihe von Duplikationen und Diversifikationen unterworfen, die vor der Trennung der Gymnospermen von den Angiospermen auftrat. Aufgrund dieser Beobachtungen scheint es zwingend notwendig zu sein, die Expression jedes *Lhc*-Gens auch in den verwendeten Gymnospermen getrennt zu untersuchen. Literaturdaten zufolge stellt die unterschiedliche Regulation der *Lhc*-Gene bei *Arabidopsis* aber vermutlich eine Ausnahme dar. So zeigten Untersuchungen von Kellmann et al. (1993), dass bei allen 19 Mitgliedern der *Lhc*-Genfamilie in *Lycopersicon esculentum* ein diurnaler/circadianer Verlauf der *Lhc*-Transkriptakkumulation detektiert werden konnte. Auch Stayton et al. (1989) untersuchten fünf Mitglieder aus zwei Klassen (*LHCII* Typ 1, *LHCII* Typ 2) der *Lhc*-Genfamilie in *Petunia*. Sie konnten bei allen fünf Mitgliedern feststellen, dass die Konzentration der *Lhc*-mRNA in der (subjektiven) Nacht deutlich absank und somit diurnale (circadiane) Fluktuationen detektierbar waren. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Regulation der einzelnen Mitglieder der *Lhc*-Genfamilie in den meisten Angiospermen wahrscheinlich parallel erfolgt. Detaillierte Untersuchungen hinsichtlich dieses Kriteriums wurden für Gymnospermen bislang nicht durchgeführt. Chinn et al. (1995) stellten jedoch fest, dass bei Ergrünen einer zuvor etiolierten *Ginkgo*-Pflanze die Akkumulationsmuster aller drei untersuchten *Lhcb*-Gene (1, 2, 3) synchron verliefen, d. h. die Regulation bei Ergrünung war vermutlich bei allen drei Mitgliedern der *Lhc*-Genfamilie gleich. Aus dieser Beobachtung könnte möglicherweise abgeleitet werden, dass die Regulation einzelner Mitglieder der *Lhc*-Genfamilie auch in Gymnospermen parallel erfolgt. Alle Mitglieder der *Lhc*-Genfamilien in Gymnospermen würden dann tageszeitlich gleichmäßig exprimiert, so dass hierin keine Begründung für das Auftreten einer nicht diurnalen *Lhc*-mRNA-Akkumulation liegen könnte.

Um konkrete Aussagen hierüber treffen zu können, sind aber weitere Untersuchungen notwendig. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die nicht diurnalen Schwankungen des *Lhc*-mRNA-Gehaltes in Gymnospermen vermutlich nicht durch bekannte äußere Faktoren, die die Amplitude der Schwingung in Angiospermen dämpfen könnten, bedingt werden. Deshalb müssen gravierende Unterschiede in der Regulation der tageszeitlichen Akkumulation der *Lhc*-Genexpression zwischen Angiospermen und Gymnospermen bestehen.

Über die physiologische Bedeutung, die eine nicht diurnale *Lhc*-Genexpression mit sich bringt, kann nur spekuliert werden. Nach Jansson und Gustafsson (1990) sind keine biochemischen oder physiologischen Unterschiede zwischen dem Photosynthese-Apparat von Gymnospermen und Angiospermen messbar. Die Gymnospermen umfassen im Unterschied zu den Angiospermen aber ausschließlich vieljährige Holzpflanzen mit sekundärem Dickenwachstum, von denen die meisten Vertreter in Bergregionen anzutreffen sind. Somit ist denkbar, dass Gymnospermen in ökologischen Nischen leben, in denen eine zeitabhängige Synthese von *Lhc*-mRNA vielleicht keine Vorteile mit sich bringt.

Aus den zuvor genannten Darlegungen ergibt sich die Frage, worin sich Angiospermen und Gymnospermen unterscheiden. Bei Angiospermen erfolgt die *Lhc*-mRNA-Synthese lichtabhängig, während die meisten Gymnospermen in der Lage sind, auch im Dauerdunkel *Lhc*-mRNA zu synthetisieren (Alosi et al. 1990, Yamamoto et al. 1991). So konnte in den Angiospermen *Lycopersicon esculentum* bzw. *Nicotiana sylvestris* nach drei bzw. vier Tagen im Dauerdunkel kein *Lhc*-Transkript mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.9, Piechulla et al. 1989). In *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba* wurde hingegen selbst nach 15 Tagen im Dauerdunkel noch *Lhc*-Transkript über Northern-Blot-Analysen detektiert (Abb. 3.9). Unter Berücksichtigung der Literaturdaten (Alosi et al. 1990, Yamamoto et al. 1991) kann folglich davon ausgegangen werden, dass dies durch die Produktion neuer *Lhc*-mRNA in der Dunkelheit bedingt sein könnte. Neben Gymnospermen sind aber auch einige Angiospermen in der Lage, im Dunkeln *Lhc*-mRNA zu synthetisieren. Dazu gehören beispielsweise *Arabidopsis thaliana*, Mais, Mungbohne und Gerste (Brusslan und Tobin 1992, Sullivan et al. 1989, Thompson et al. 1983, Baumgartner et al. 1989). Da für diese Angiospermen ebenfalls gezeigt wurde, dass die *Lhc*-Transkriptakkumulation im Tagesverlauf diurnalen Schwankungen unterliegt (zusammengefasst in: Piechulla 1999), kann keine direkte

Korrelation zwischen der lichtunabhängigen Synthese der *Lhc*-Transkripte und einem nicht diurnalen Verlauf der *Lhc*-mRNA-Konzentrationen existieren.

Ein weiterer Unterschied zwischen Angiospermen und Gymnospermen liegt in dem Auftreten von Etiolierungserscheinungen. Im Gegensatz zu Angiospermen zeigen im Dunkeln angezogenen Keimlinge der Gymnospermen, wie z. B. der Pinopsida, keine Gelbfärbung durch Mangel an Chlorophyll oder eine Verlängerung des Hypokotyls. Gymnospermen, Rotalgen, Cyanobakterien und Moose verfügen über eine lichtunabhängige Protochlorophyllidreduktase (POR), mit deren Hilfe sie im Dunkeln durch die Umsetzung von Protochlorophyllid zu Chlorophyllid (eine Vorstufe des Chlorophylls) und im Weiteren auch Chlorophyll bilden können. Gymnospermen und Angiospermen sowie Rotalgen, Cyanobakterien und Moose sind darüber hinaus in der Lage, auch bei Licht durch eine lichtabhängige POR Chlorophyll zu bilden (zusammengefasst in: Skinner und Timko 1998). Weil die lichtunabhängige Reduktion von Protochlorophyllid zu Chlorophyllid auch in Rotalgen und Cyanobakterien vorkommt, wird vermutet, dass dieser Mechanismus der evolutionär ältere ist und die Angiospermen ihn verloren haben. Da die beiden Gymnospermen *Welwitschia mirabilis* und *Ginkgo biloba* Etiolierungserscheinungen zeigten (Piechulla et al. 2001), aber keine diurnale *Lhc*-Transkriptakkumulation (Tabelle 4.1) und weil Cyanobakterien und einige Moose, die wie die meisten Gymnospermen im Dunkeln Chlorophyll synthetisieren können, diurnale/circadiane Schwankungen in Bezug auf die *Lhc*-mRNA-Mengen aufwiesen (zusammengefasst in Piechulla 1999), wird kein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit, Chlorophyll im Dunkeln zu synthetisieren, und nicht diurnaler *Lhc*-Genexpression ersichtlich.

Zur Gruppe der Gymnospermen gehören sehr viele immergrüne Gewächse, während die meisten Angiospermen ihre Blätter im Winter verlieren. *Larix decidua* und *Ginkgo biloba*, die zu den sommergrünen Gewächsen in der Gruppe der Gymnospermen gehören, zeigten wie die immergrünen Gymnospermen *Abies alba*, *Ephedra campylopoda*, *Picea abies*, *Pinus contorta*, *Pinus sylvestris*, *Taxus baccata* und *Welwitschia mirabilis* keine diurnale *Lhc*-Akkumulation. Bei *Dioon spinulosum* und *Gnetum gnemon*, die auch zu den immergrünen Gymnospermen zählen, konnten dagegen diurnale *Lhc*-Transkriptfluktuationen im Tagesverlauf detektiert werden. Eine direkte Korrelation zwischen einer nicht diurnalen *Lhc*-Genexpression und dem jahreszeitlichen Blattabwurf scheint folglich nicht zu existieren.

Um die Tatsache zu erklären, dass bei 9 von 12 Gymnospermenarten eine nicht diurnale *Lhc*-Transkriptakkumulation detektiert (Tabelle 4.1) wurde, könnte angenommen werden, dass die Synthese der *Lhc*-mRNA (Transkription) in Gymnospermen nicht diurnal/circadian verläuft. Gymnospermenpromotoren könnten z. B. keine entsprechenden cis-regulatorischen Promotorelemente besitzen, die zu einer diurnale/circadianen Regulation der Genexpression beitragen. Alternativ ist vorstellbar, dass den Gymnospermen Transfaktoren fehlen, die eine durch den Promotor vermittelte diurnale/circadiane Genexpression verursachen können. Damit stellt sich die Frage, ob Transfaktoren aus Gymnospermen bzw. Angiospermen entsprechende Elemente in Promotoren aus Angiospermen bzw. Gymnospermen erkennen und die Expression entsprechend beeinflussen können. In der Literatur sind wenige Untersuchungen beschrieben, in denen Reportergene mit Hilfe von Promotoren aus Gymnospermen in transgenen Angiospermen exprimiert werden (Brinker 1999). Kojima et al. (1994) klonierten ein 1,7 kb-langes Promotorfragment des *Lhcb2* (*cab6*)-Gens aus *Pinus thunbergii* vor ein Reportergen (*uidA*) und transferierten es über *Agrobacterium tumefaciens* in Tabak. Das gleiche Konstrukt wurde von Yamamoto et al. (1994) in Reis eingebracht. In beiden Fällen erfolgte die Expression lichtunabhängig wie in der Spenderpflanze des Promotors, der Gymnosperme *Pinus thunbergii* und nicht lichtabhängig wie in der Wirtspflanze, der Angiosperme Tabak bzw. Reis. Der *Lhcb*-Promotor aus der Gymnosperme *Pinus contorta* dagegen konnte eine diurnale Synthese eines Reportergen-Transkriptes in der Angiosperme *Nicotiana tabacum* bewerkstelligen (Abb. 3.13). Die Expression erfolgte somit im Unterschied zu den Ergebnissen von Kojima und Yamamoto wie in der Wirtspflanze Tabak. Daraus lässt sich schließen, dass bei der Expression durch die Transkriptionsmaschinerie der Angiosperme Tabak die cis-regulatorischen Elemente in dem *Lhc*-Promotor aus *Pinus contorta* korrekt erkannt wurden. Weder von Kojima et al. (1994) noch von Yamamoto et al. (1994) wurden Untersuchungen zum Reportergen-Transkriptgehalt im Tagesverlauf vorgenommen, so dass bei dem *Lhc*-Promotor aus *Pinus thunbergii* keine Schlussfolgerungen über die Nutzung cis-regulatorischer Elemente, die eine tageszeitabhängige Promotoraktivität in Angiospermen erzeugen, getroffen werden können. Von Wu et al. (1997) wurde ein Chitinase-Gen mit seinem natürlichen Promotor aus *Pinus strobus* stabil in Tabak integriert. Das entsprechende Transkript konnte nach Induktion durch den Elizitor Chitosan nachgewiesen werden. Die Autoren folgern aus dieser Beobachtung, dass die Regulationsmechanismen des Chitinasegens in der Spenderpflanze des Promotors *Pinus strobus* wie auch in der Wirtspflanze Tabak gleich sind. Wie in den Experimenten dieser Arbeit, bei dem ein Reportergen diurnal unter der Kontrolle eines *Lhc*-Promotors aus

*Pinus contorta* exprimiert wurde, wurden die cis-regulatorischen Elemente des Promotors der Gymnosperme vermutlich korrekt in der Angiosperme genutzt. Aus der Gesamtheit dieser Daten lässt sich folgern, dass die Möglichkeit für eine korrekte Erkennung der Sequenzelemente in Gymnospermenpromotoren (cis-Elemente) durch Transfaktoren der Angiospermen besteht.

Auch über den Einsatz von Promotoren aus Angiospermen, mit deren Hilfe ein Reportergen in transgenen Gymnospermen exprimiert wird, existieren in der Literatur nur wenige Daten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedlich lange Abschnitte des *Lhc4\*1*-Promotors aus der Angiosperme *Lycopersicon esculentum*, die vor ein Reportergen (*uidA*) kloniert waren, in die Gymnosperme *Picea abies* eingebracht. Während das kürzere  $\Delta 119$ -Promotorfragment im transienten Assay eine Expression des GUS-Proteins in farblosen embryonischen *Picea abies*-Zellen zeigte, konnte eine solche Promotoraktivität bei dem längeren  $\Delta 251$ -*Lhc4\*1*-Promotorfragment weder im transienten Assay in farblosen embryonischen *Picea abies*-Zellen noch über die Detektion des Reportergentranskriptes in grünen *Picea*-Pflanzen gemessen werden (Abb. 3.15 und Abb. 3.16). Dies weist darauf hin, dass der *Lhc4\*1*-Promotor in der Gymnosperme möglicherweise nicht korrekt erkannt wird. Darüber hinaus sind aber auch alternative Erklärungsmöglichkeiten denkbar. An dem zusätzlichen Promotorstück, das die beiden Konstrukte ( $\Delta 119$ -*Lhc4\*1* und  $\Delta 251$ -*Lhc4\*1*-Promotor) voneinander unterscheidet, könnte sowohl in den farblosen embryonischen Zellen wie auch im grünen Gewebe der transgenen *Picea abies*-Pflanzen ein Transfaktor binden, der eine Transkription verhindert und somit als Repressor fungiert. Diese Annahme wird durch die Expression des Reportergens in Zellen der Bombardements mit dem kürzeren  $\Delta 119::uidA::nos$ -Konstrukt und die fehlende Expression mit dem längeren  $\Delta 251::uidA::nos$ -Konstrukt gestützt. Über die Expression in transgenen Pflanzen kann aufgrund noch ausstehender Ergebnisse keine Aussage getroffen werden. Diese Untersuchungen können aufgrund der langen Regenerationszeit transgener *Picea*-Pflanzen erst ab Herbst 2002 durchgeführt werden. Trifft die oben genannte Hypothese zu, wäre dieser Repressor nur in der Gymnosperme existent, nicht aber in Angiospermen wie *Lycopersicon esculentum* oder *Nicotiana tabacum*, die beide eine circadiane Expression des *Lhc4\*1*-Gens bzw. eines Reportergens, das unter der Kontrolle dieses Promotors steht, zeigen (Kellmann et al. 1993, Merforth 1996). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die fehlende Expression in den transgenen *Picea*-Pflanzen könnte mit dem Auftreten von „Transcriptional gene silencing“ (TGS) verbunden sein. Dieser Effekt konnte bislang nur in transgenen Pflanzen beobachtet

werden und setzt eine Homologie zwischen den Promotoren des Transgens und endogener Wirtspromotoren voraus (Ding 2000). So wurde z. B. von Brusslan et al. (1993) eine Reduktion des cab140-Transkriptes in *Arabidopsis thaliana* beobachtet, nachdem ein cab140-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt in diese Pflanze transferiert worden war. Ein ähnlicher Cosuppressionseffekt könnte auch bei den stabilen *Picea*-Transformanten mit dem  $\Delta$ 251-Promotorfragment aufgetreten sein. Da von *Picea abies* keine *Lhc*-Promotorsequenzen in Datenbanken abgelegt sind, lässt sich diese Hypothese nur schwer überprüfen. Trifft sie zu, so sollte auch in transgenen Pflanzen mit dem kürzeren  $\Delta$ 119-Promotorfragment keine Expression des Transgens erfolgen. Über die Existenz und entsprechende Funktionalität von Transfaktoren können aus diesen Experimenten noch keine abschließenden Schlussfolgerungen gezogen werden. Literaturdaten zeigen, dass bei einem Bombardement von Gymnospermzellen (*Picea*) mit Angiospermenpromotor-Reporter-Gen-Konstrukten in den meisten Fällen eine transiente Expression eines Reportergens in verschiedenen Geweben gemessen werden konnte (z. B. Ellis et al. 1991, Sabala et al. 2000). Diese Beobachtungen sprechen für die Existenz von Transfaktoren, die eine Transkription ähnlich der verwendeten Angiospermen in der Wirtspflanze *Picea* bewirken. Auch Walter und Smith (1995) konnten in *Pinus radiata*-Pflanzen, die mit vier unterschiedlichen Angiospermenpromotor-Reporter-Gen-Konstrukten transformiert worden waren, in allen Fällen eine hohe Expression erreichen. Alle diese Resultate lassen auf die korrekte Erkennung der cis-regulatorischen Elemente der Promotoren durch Transfaktoren in *Pinus radiata* schließen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl Sequenzelemente in Gymnospermenpromotoren bzw. Angiospermenpromotoren durch Transfaktoren der Angiospermen bzw. Gymnospermen korrekt erkannt werden können. Folglich kann angenommen werden, dass in Gymnospermen sowohl die notwendigen cis-regulatorischen Promotorelemente wie auch entsprechenden Transfaktoren für eine diurnale/circadiane Expression der *Lhc*-Gene vorhanden sind. Die Transkription der *Lhc*-Gene erfolgt also wahrscheinlich auch in Gymnospermen diurnal/circadian. Diese Hypothese wird auch durch experimentelle Daten gestützt. So kann nach einigen Tagen im Dauerdunkel eine circadiane Schwingung der *Lhc*-mRNA-Mengen in *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba* beobachtet werden (Abb. 3.6-3.8), die wahrscheinlich in einer circadian regulierten Neusynthese der Transkripte begründet liegt.

In Angiospermen kann die Transkription der *Lhc*-Gene durch Licht über das Phytochromsystem entscheidend beeinflusst werden. So wurde der *Lhc*-mRNA-Gehalt in etiolierten Tabak-, Weizen- oder Bohnenpflanzen durch die Bestrahlung mit Weißlicht deutlich gesteigert (Tavladoraki et al. 1989, Wehmeyer et al. 1990, Millar et al. 1992, Nagy et al. 1993). Da bei Gymnospermen der Verlauf der *Lhc*-mRNA-Menge im Licht-Dunkel-Wechsel anders als bei Angiospermen ist, stellte sich die Frage, ob Licht auch auf die Synthese (Transkription) der *Lhc*-Transkripte in Gymnospermen einen Effekt ausüben kann. Bei *Pinus sylvestris*-Pflanzen, die für vier Tage im Dauerdunkel angezogen und im Anschluss zu verschiedenen Tageszeiten Weißlicht von 4h ausgesetzt wurden, wurde nur an einigen wenigen Tageszeitpunkten eine Zunahme der *Lhc*-Transkriptmenge im Vergleich zu den im Dunkel verbliebenen Pflanzen ermittelt (Abb. 3.19 und 3.20). An allen anderen Messpunkten erfolgte keine oder nur eine sehr schwache Erhöhung der *Lhc*-mRNA-Menge durch die Beleuchtung. Von Meyer et al. (1989) wurden Versuche in gleicher Weise mit Tomatenpflanzen durchgeführt. Sie zeigten ein ähnliches Ergebnis, wobei jedoch die Erhöhung der *Lhc*-Transkriptmengen bei *Lycopersicon esculentum* sehr viel stärker ausgeprägt war als bei *Pinus sylvestris*. Auch bei *Arabidopsis thaliana* konnte die Expression eines *Lhc*-Promotor-Reporter-gen-Transkriptes (bzw. des zugehörigen Proteins) durch Licht in unterschiedlichem Maße in Abhängigkeit von der Tageszeit gesteigert werden (Millar et al. 1996). Bei *Ginkgo biloba* sank die relative *Lhc*-mRNA-Menge nach Bestrahlung durch Weißlicht ab oder blieb auf konstantem Niveau (Abb. 3.21). Es kann somit festgehalten werden, dass sowohl bei den Angiospermen *Lycopersicon esculentum* und *Arabidopsis thaliana* als auch bei den Gymnospermen *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba* ein zeitliches „Fenster“ (Gate) existiert, durch das die gleiche Lichtmenge und Qualität einen unterschiedlichen Effekt auf die Transkription der *Lhc*-Gene ausüben (Gating-Hypothese, Kay und Millar 1993). In Angiospermen wird dieses Fenster durch eine innere Uhr erklärt. So wurde von Harmer et al. (2000) vermutet, dass die Synthese des Lichtrezeptors Phytochrom in *Arabidopsis* circadianen/diurnalen Fluktuationen unterliegt. Der Phytochromgehalt wird dabei circadian reguliert. Durch diese Schwankungen wirkt die innere Uhr dabei vermutlich auf die Induktion der *Lhc*-Genexpression durch Licht. Dass auch die Transkription der *Lhc*-Gene in Gymnospermen durch eine innere Uhr beeinflusst werden kann, zeigen die circadianen Schwingungen der *Lhc*-Transkriptakkumulation, die sowohl bei *Ginkgo biloba* wie auch bei *Pinus sylvestris* nach einigen Tagen im Dauerdunkel detektiert werden (Abb. 3.6-3.8). Gleichzeitig besteht aber auch die Möglichkeit der Beeinflussung durch Licht, die aber anscheinend in geringerem Maße im Vergleich zu den untersuchten Angiospermen erfolgt.

Das Licht spielt somit bei der Reaktion der *Lhc*-Transkription in Gymnospermen vermutlich eine weit weniger wichtige Rolle als in Angiospermen.

## 4.2 *Lhc*-Genexpression und *Lhc*-mRNA-Stabilität

### 4.2.1 Auswahl eines geeigneten Verfahrens und Voraussetzungen zur Bestimmung von Transkripthalbwertszeiten

Die *Lhc*-Transkriptgehalte in vielen Gymnospermen weisen nur leichte Schwankungen im Tagesverlauf auf und sind nicht diurnal bzw. circadian ausgeprägt (Tabelle 4.1). Da die Regulation dieser Transkriptgehalte wahrscheinlich nicht auf transkriptionaler Ebene erfolgt (4.1), wurde im Rahmen dieser Arbeit neben der Transkription auch die posttranskriptionale Ebene untersucht. Zu den wichtigsten posttranskriptionalen Prozessen gehört der Abbau der mRNA. Um die Halbwertszeit eines Transkriptes zu ermitteln, sind in der Literatur viele verschiedene Messverfahren beschrieben (zusammengefasst in: Abler und Green 1996, Gutierrez et al. 1999). Die Verwendung von Transkriptioninhibitoren wie Actinomycin D, Cordycepin oder Alpha-Amanitin ist dabei eine weit verbreitete Methode. In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Actinomycin D in Angiospermen (z. B. *Spinacea oleracea*, *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, Klaff et al. 1991, Zhang et al. 1993, Plotnikov et al. 1996, De Rocher et al. 1998, Newman et al. 1993) eine hemmende Wirkung auf die Transkription ausübt. In der Literatur sind allerdings keine Untersuchungen zur Bestimmung von Transkriptstabilitäten in Gymnospermen beschrieben. Deshalb war es notwendig, die Effekte dieses Hemmstoffes auf die Transkription in dieser Gruppe der Spermatophyta zu überprüfen. Aus der Verteilung verschiedener radioaktiver Substanzen wie z. B. eines Oligonukleotid und dCTP (3.2.1) lässt sich folgern, dass wahrscheinlich auch Actinomycin D in den Gymnospermen *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba* transportiert wurde und im Pflanzengewebe vorlag. Bei *Pinus sylvestris* konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Actinomycin D einen hemmenden Einfluss auf die *de novo* Synthese der Gesamt-RNA ausübte (3.2.2). Es war somit möglich, eine der absoluten *Lhc*-mRNA-Konzentration proportionale Größe zu messen, aus der die Geschwindigkeitskonstante  $k$  und somit die Halbwertszeit des Transkriptes bestimmt werden konnte (vgl. 2.2.15.1). Inwieweit eine Hemmung der Transkription durch Actinomycin D in *Ginkgo biloba* erfolgte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt. Da aber Literaturdaten zeigen, dass Actinomycin D die Synthese der RNA in zahlreichen Pflanzen behindert, ist es unwahrscheinlich, dass dieser Hemmstoff hier nicht die erwartete Wirkung zeigt.

Darüber hinaus muss erwähnt werden, dass beim Einsatz von Transkriptioninhibitoren wie Actinomycin D die Synthese aller Transkripte, und damit auch die der Referenzgröße, gehemmt wird. Die Untersuchungen in der Literatur verwenden größtenteils die Gesamt-RNA als Referenzgröße (z. B. De Rocher et al. 1998, Petracek et al. 2000, Phillips et al. 1997, Zhang et al. 1993, Fritz et al. 1991, van Hoof et al. 1996). Diese Gesamt-RNA wird in den meisten Fällen durch Northern Blotting auf eine Membran übertragen. Um die Effizienz dieses Transfer zu überprüfen, kann der Filter im weiteren Verlauf mit einer Sonde hybridisiert werden, deren Signal denen der Gesamt-RNA proportional ist. In der Literatur werden dazu bei Messung von Transkriptstabilitäten die 25S rRNA (z. B. Chiba et al. 1999), die 16S rRNA (z. B. Salvador et al. 1993) oder auch die 18S-rRNA (z. B. Holtorf et al. 1999) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Membranen mit einer 18S-rRNA-Sonde hybridisiert und die Signale verglichen. Nach Spiller et al. (1987) setzt sich die Gesamt-RNA etwa zu 92% aus rRNA zusammen. Damit sollte die rRNA eine proportionale Größe im Vergleich zur Gesamt-RNA darstellen. Um die Messwerte der einzelnen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit direkt miteinander vergleichen zu können, wurde darüber hinaus immer die gleiche Bezugsgröße (rRNA) gewählt. Wird die Synthese aller Transkripte durch den Einsatz von Actinomycin D gehemmt, bedeutet dies, dass die Gesamt-RNA pro Frischgewicht nicht konstant bleiben kann, sondern allmählich absinkt. Bei den Probennahmen während dieser Arbeit konnten aber bei gleicher Menge an Blattmaterial auch ungefähr gleiche Mengen an Gesamt-RNA isoliert werden. Somit kann gefolgert werden, dass die Abbauprozesse der Gesamt-RNA langsam ablaufen und die Stabilität der Gesamt-RNA sehr hoch sein muss. Deshalb stellt die Gesamt-RNA bzw. die rRNA eine geeignete Referenzgröße für die durchgeführten Messungen dar. Um eine Bezugsgröße zu wählen, die unabhängig von der Hemmung der Genexpression ist und somit nicht den gleichen methodischen Fehlerquellen unterliegt, könnten z. B. quantitative In-situ-Hybridisierungen durchgeführt werden, um die Transkriptmengen auf das Frischgewicht bzw. auf die Zellzahl zu beziehen. Auch bei der Anwendung anderer Methoden zur Bestimmung von Transkriptstabilitäten kann dieses Problem vernachlässigt werden, da die Synthese der Referenzgröße nicht durch den Versuchsansatz beeinflusst werden sollte.

Neben der Blockierung der mRNA-Synthese können Transkriptioninhibitoren wie Actinomycin D in wenigen Fällen Literaturdaten zufolge eine stabilisierende Wirkung auf Transkripte ausüben (Abler und Green 1996). Vermutlich wird dabei die Synthese eines Faktors, der in der mRNA-Degradationsmaschinerie benötigt wird, gehemmt (Peltz et al. 1991). Dass Actinomycin D auf diese Art und Weise wirkt, kann für die Resultate zur Transkriptbestimmung in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Um solch einen Effekt ausschalten zu können, sollten die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Transkriptionshalbwertszeiten mit Hilfe anderer Methoden ohne Verwendung von Transkriptioninhibitoren bestätigt werden. So könnten z. B. Transkripte, die in vitro synthetisiert wurden, durch Elektroporation in Protoplasten transferiert werden. Es existieren allerdings in der Literatur keine Beschreibungen über die Erstellung von Protoplasten aus Gymnospermenzellen, so dass für weitere Untersuchungen zuerst ein Verfahren hierfür entwickelt werden müsste. Auch mittels Verwendung von induzierbaren Promotoren in transgenen Pflanzen, die das Ein- oder Ausschalten der Expression des Transgens für eine bestimmte Zeit und ein definiertes Gewebe (z. B. Gatz et al. 1992) ermöglichen, können Transkriptionshalbwertszeiten bestimmt werden. Literaturdaten zeigen, dass die Transformation von Koniferen wie *Picea abies*, *Picea glauca* und *Pinus radiata* möglich ist (Sabala et al. 2000, Ellis et al. 1991, Walter und Smith 1995, Wenck et al. 1999), wenn auch die Regeneration der stabil transformierten Pflanzen mehrere Jahren dauert. Es existieren bislang aber weder Transformationssysteme für Gymnospermen aus der Unterabteilung der Cycadophytina noch für die Klasse der Ginkgoopsida. Eine weitere Methode zur Bestimmung von Transkriptstabilitäten ohne Verwendung von Transkriptioninhibitoren stellt die Markierung der Gesamt-RNA durch radioaktive Moleküle (Pulse chase) dar. Bei dieser Methode muss gewährleistet sein, dass in dem Zeitintervall, in dem die Markierung durch Radioaktivität erfolgt, auch genug Transkript für einen entsprechenden Nachweis gebildet wird. Aus den Resultaten der Untersuchungen in 3.2.2 lässt sich folgern, dass diese Methode zumindest bei der Gymnosperme *Pinus sylvestris* wenig Erfolg verspricht, weil der Anteil an radioaktiv markierter *Lhc*-mRNA nach einer 28stündigen Markierungsreaktion zu gering für den Nachweis war. Dies zeigt, dass die Verwendung des Transkriptioninhibitors Actinomycin D trotz der beschriebenen Nachteile das am besten geeignete Verfahren zur Bestimmung von Transkriptstabilitäten in Gymnospermen darstellt und aus diesem Grund gewählt wurde.

Bei der Bestimmung der Halbwertszeit eines Transkriptes wird vorausgesetzt, dass der Abbau der mRNA einer Reaktion erster Ordnung folgt. Dies bedeutet, dass der Abbau nur abhängig von der zum betrachteten Zeitpunkt vorliegenden mRNA-Menge, der Konzentration des Edukts, ist. Es existieren keine weiteren Reaktionspartner beim geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Zahlreiche experimentelle Daten z. B. von Plotnikov et al. 1996, Zhang et al. 1993, Higgs et al. 1995, Ylstra und McCormick 1999, Phillips et al. 1997, Petracek et al. 2000, Klaff et al. 1991 und anderen zeigten, dass die Degradation der untersuchten Transkripte in Pflanzen tatsächlich einer Reaktion erster Ordnung unterliegt. Nach dem aus diesem Mechanismus resultierenden Geschwindigkeitsgesetz muss sich bei der Auftragung der Logarithmen des mRNA-Gehaltes gegen die Zeit eine Gerade (vgl. 2.2.15.1) ergeben. Dieses Kriterium war bei den Messwerten zur Bestimmung der *Lhc*-mRNA-Halbwertszeit bei *Lycopersicon esculentum* (Abb. 3.27), *Nicotiana tabacum* und *Pinus sylvestris* (Abb. 3.28 und 3.29) und bei der gleichzeitigen Bestimmung der Tomaten-*Lhc*- und *Pinus-Lhc*-Transkripte in transgenen Tomaten (Abb. 3.36 und Abb. 3.37) erfüllt. Damit entsprach die angenommene Kinetik einer Reaktion erster Ordnung den realen Verhältnissen in den Pflanzen. Im Gegensatz dazu streuten die Einzelwerte bei der Bestimmung der Stabilität der *Lhc*-mRNA bei *Ginkgo biloba* (Abb. 3.30) stark. Nur wenige der Messwerte lagen auf der errechneten Regressionsgerade. Bei der Untersuchung der beiden transgenen Tomatenlinien 8/2 und 14/25 traten ferner deutliche Unterschiede bei den absoluten Werten für die Halbwertszeit der *Pinus-Lhc*- bzw. der Tomaten-*Lhc*-Transkripte auf. Die beiden Linien enthielten die gleichen Konstrukte, wiesen aber einen möglichen Unterschied in der Anzahl der Kopien auf. Bei der Annahme, dass die Degradation einer Reaktion erster Ordnung folgt, ist die Halbwertszeit aber unabhängig von der Ausgangskonzentration. Somit sollten Unterschiede in der Anzahl der Kopien der T-DNA und daraus resultierende ungleiche Transkriptgehalte keinen Effekt haben. Eine mögliche Erklärung für die Differenzen zwischen den transgenen Linien und der starken Streuung der Messdaten bei *Ginkgo biloba* könnte in der unbewiesenen Annahme liegen, dass die Degradation der *Lhc*-Transkripte nach einer Reaktion erster Ordnung verläuft. In diesem Fall müssten beim Abbau der *Lhc*-Transkripte in den verschiedenen Pflanzen unterschiedliche Reaktionsmechanismen vorliegen. Die starke Streuung der Daten und die Differenzen der Werte für die verschiedenen *Lhc*-Halbwertszeiten in transgenen Tomaten könnte allerdings auch durch den Einfluss äußerer Faktoren erklärt werden. So könnte bei *Ginkgo biloba* das Entwicklungsalter der Blätter einen Einfluss auf die Stabilität der *Lhc*-Transkripte ausgeübt haben. Diese Gymnosperme verliert die Blätter im Herbst. Die Untersuchungen zur *Lhc*-Transkriptstabilität

wurden aus diesem Grund mit vollentwickelten Blättern im Frühjahr/Sommer durchgeführt. Dabei wurde aber das genaue Blattalter der Blattprobengemische nicht berücksichtigt. Dies könnte auf eine inhomogene Probenahme hindeuten und damit auf Unterschiede zwischen den Blättern aufgrund des Entwicklungsstadiums. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, sollte bei weiteren Experimenten mit *Ginkgo biloba* das exakte Blattalter berücksichtigt werden.

Auch bei den Bestimmungen der Transkriptstabilitäten der *Pinus-Lhc*-mRNA und der Tomaten-*Lhc*-mRNA in transgenen Tomaten wurde eine Abhängigkeit der ermittelten *Lhc*-Halbwertszeiten vom Entwicklungszustand des Gewebes festgestellt (Abb. 3.36 und Abb. 3.37). Die Halbwertszeit nahm dabei mit steigendem Blattalter ab. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Unterschiede der Werte für die verschiedenen *Lhc*-Halbwertszeiten in transgenen Tomaten ist das Auftreten von „Gene silencing“-Effekten. Es ist bekannt, dass ein PTGS (Posttranscriptional Gene silencing)-Effekt auftreten kann, wenn die eingeführten Sequenzen eine Homologie zu endogenen Sequenzen aufweisen. In diesem Fall existiert eine Homologie zwischen der Sequenz des Transgens (*Lhc*-Sequenz aus *Pinus contorta*) und den endogenen *Lhc*-Tomaten-Sequenzen (vgl. Sequenzvergleich Abb. 3.39). Nach Depicker und Van Montagu 1997 ist PTGS mit einer Reduktion der RNA-Level verbunden. Dabei könnte in diesem Fall sowohl die *Pinus-Lhc*-mRNA (als Transgen) als auch die Tomaten-*Lhc*-mRNA (als homologe endogene Sequenz) in einer der beiden Linien einem verstärkten Abbauprozess unterliegen und somit die Unterschiede bei der Bestimmung der Halbwertszeiten verursachen. Um zu überprüfen, ob diese Hypothese zutrifft, könnten *in vitro*-transkribierte *Pinus*- und Tomaten-*Lhc*-Transkripte über Elektrottransformation getrennt von einander in Protoplasten aus Tomate transferiert werden, um im Anschluss den Abbau der mRNAs zu verfolgen. Neben dem Entwicklungsalter können weitere Faktoren wie Licht, Hitze, Kälte, Sauerstoffmangel, Trockenstress oder Salinität und auch Auftreten von Infektionen durch Pilze oder Bakterien die Stabilität eines Transkriptes verändern (zusammengefasst in: Johnson et al. 1998, Mehdy et al. 1998, Gutierrez et al. 1999; Marcotte 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Messungen der Transkriptstabilitäten unter konstanten Licht- und Temperaturverhältnissen durchgeführt. Alle verwendeten Pflanzenteile wurden unter Wasser mit einem scharfen Skalpell abgeschnitten bzw. mit einem scharfen Korkbohrer ausgestochen, um den Transpirationsstrom nicht zu unterbrechen und um somit keinen Trockenstress zu erzeugen. Die verwendeten Pflanzen wiesen darüber hinaus keine

sichtbare Schädigung durch Infektionen durch Pilze oder Bakterien auf. Ein Einfluss dieser Größen ist deshalb auszuschließen.

Um Aussagen treffen zu können, ob sich die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Transkriptstabilitäten auch auf die Situation in einer intakten Pflanze übertragen lassen, wurden jeweils Kontrollen in den Versuchsansätzen mitgeführt. Während zur Bestimmung der Halbwertszeit die abgeschnittenen Pflanzen in wässriger Lösung mit Actinomycin D inkubiert wurden, um die Transkription zu hemmen, wurde den Kontrollproben dieser Hemmstoff nicht zugegeben. Um eine gute Übertragbarkeit der Daten auf die Situation in intakten Pflanzen zu gewährleisten, dürfen sich in diesen Ansätzen die Synthese und die Abbauprozesse der mRNA-Spezies nicht von denen in nicht abgeschnittenen Pflanzen unterscheiden. Die Transkriptgehalte im Tagesverlauf in den abgeschnittenen Pflanzen sollten somit denen in intakten Pflanzen gleichen. Bei allen untersuchten Wildtyp-Pflanzen (*Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba*) war dieses Kriterium gut erfüllt (Abb. 3.27-3.30). Da somit keine Sekundäreffekte durch die Versuchsansätze selbst verursacht wurden, kann gefolgert werden, dass die ermittelten *Lhc*-Halbwertszeiten in *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba* sowie die Halbwertszeiten von *trnH* in *Pinus sylvestris* und *psbA* in *Lycopersicon esculentum* den Verhältnissen in den intakten Pflanzen entsprechen. Dies zeigt auch die Übereinstimmung des Wertes von 11,1h für die Halbwertszeit der *psbA*-Transkripte in Tomate mit den Literaturangaben. Von Klaff und Gruissem wurde (1991) für die Halbwertszeit der *psbA*-mRNA Werte von 4,7h in jungen und 10h in reifen Spinatblättern ermittelt.

Bei der Verwendung der transgenen Tomatenpflanzen, in denen gleichzeitig die Transkriptstabilitäten des Transgens und endogener Gene bestimmt wurden, kann die Verfügbarkeit und Aktivität von RNasen und das Entwicklungsstadium des Gewebes innerhalb einer Versuchsreihe als identisch angesehen werden, weil die Messungen in dem gleichen „Pflanzen-Background“ durchgeführt wurden. Mit Hilfe der Untersuchung der *Lhc*-Transkriptkonzentrationen im Tagesverlauf in den Kontrollproben lässt sich somit überprüfen, ob neben den oben genannten Größen weitere Faktoren einen Einfluss auf die Transkriptmengen besitzen. Bei den Kontrollproben muss zwischen dem Verlauf der Tomaten-*Lhc*-Transkriptgehalte (unter der Kontrolle der natürlichen Promotoren) und der der eingeführten *Pinus-Lhc*-mRNA (unter der Kontrolle des starken 35S-Promotors) in den

Kontrollproben im Tagesverlauf unterschieden werden. Es ist zu erwarten, dass die Tomaten-*Lhc*-Transkriptakkumulation bei diesen Kontrollproben einem diurnalen Rhythmus folgt, wie er von Piechulla et al. (1989) beschrieben wurde. Bei Inkubation von Fiedern des Wildtyps von Tomate in Pufferlösung ließ sich eine diurnale Schwankung mit Maximum zur Mittagszeit erkennen (Abb. 3.38A). Somit kann davon ausgegangen werden, dass keine Beeinflussung der Transkriptakkumulation durch Wundeffekte vorlag. In beiden transgenen Linien (Linie 8/2 und Linie 14/25) der F0-Generation konnten dagegen bei keiner Messung diurnale Fluktuationen der Tomaten-*Lhc*-mRNA-Menge detektiert werden (Abb. 3.38 B,C). Dieser Effekt konnte auch nicht in der F1-Generation der Linie 8/2 beobachtet werden (Abb. 3.38 D, F1-Generation von 14/25 nicht untersucht). Das zusätzlich zum Wildtyp eingebrachte Transgen (*Lhcb* aus *Pinus contorta*) zeigte demnach eine Wirkung auf die Expression der endogenen *Lhc*-Gene. Da beide Linien *Pinus-Lhc*-mRNA exprimierten und diese Sequenz homolog zu den Tomaten-*Lhc*-Genen ist, besteht die Möglichkeit, dass die Differenzen durch „Gene silencing“-Effekte begründet sind. Durch die Homologie der eingeführten kodierenden Region der *Lhc*-Sequenz aus *Pinus contorta* zu den endogener *Lhc*-Tomaten-Sequenzen ist es denkbar, dass ein „Posttranscriptional Gene silencing“ (PTGS) auftritt. Dabei könnte die Akkumulation der Tomaten-*Lhc*-mRNA durch PTGS den beobachteten nicht diurnalen Verlauf zeigen. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnten andere Gene unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert werden und der Verlauf der Tomaten-*Lhc*-Akkumulation gemessen werden. Liegt ein PTGS-Effekt vor, so sollte die Expression nicht homologer Gene keinen Einfluss auf die Menge der Tomaten-mRNA im Tagesverlauf ausüben.

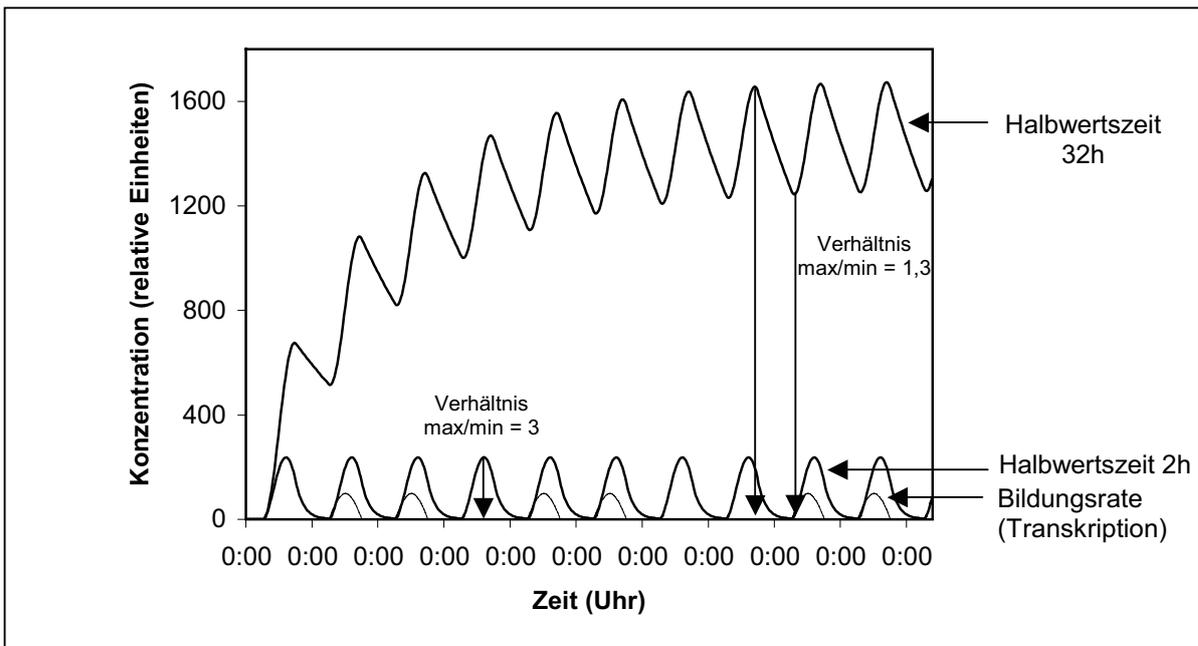
Die Expression der *Pinus-Lhc*-mRNA stand in den transgenen Tomaten unter der Kontrolle eines 800bp langen Fragmentes des 35S-Promotors. Bei der transgenen Tomatenlinie 14/25 (F0-Generation) schwankte der Gehalt der *Pinus-Lhc*-mRNA im Tagesverlauf um einen Mittelwert von 75%. Bei der Linie 8/2 (F0- und F1-Generation) folgte die *Pinus-Lhc*-Transkriptakkumulation hingegen einem diurnalen Rhythmus (Abb. 3.38 F,G). Die jeweiligen Verläufe konnten in der F0-Generation in beiden Versuchsreihen gemessen werden und waren somit nicht entwicklungspezifisch. Die Beobachtungen decken sich mit Literaturdaten zur Expression durch das 800bp lange Fragment des 35S-Promotors, die nicht entwicklungspezifisch, gewebespezifisch oder durch Umwelteinflüsse reguliert ist (Brinker 1999). Über den Verlauf der Transkriptakkumulation im Tagesverlauf, die von diesem 800bp langen Teil des Promotors reguliert wird, existieren keine Daten. Millar et al. (1992) verwendeten ein 941bp langes Fragment des 35S-Promotors. Die *uidA*-

Reportergentranskriptmenge zeigte danach in *Arabidopsis* eine diurnale Transkriptakkumulation am ersten Tag der Untersuchungen. Im anschließenden Dauerdunkel wurden jedoch keine Fluktuationen mehr festgestellt. Bei einer Fusion dieses 941bp-langen 35S-Promotors mit einem anderen Reportergen (Luciferase-Gen) und folgender Expression in *Arabidopsis* konnten hingegen sowohl unter Licht-Dunkel- wie auch unter Dauerlichtbedingungen diurnale bzw. circadiane Fluktuationen der Luciferase-Reportergenaktivität ermittelt werden. Die Expression, die durch den 35S-Promotor vermittelt wird, kann somit offensichtlich von weiteren unbekanntem Faktoren beeinflusst werden, die auch bei der *Lhc*-Transkriptakkumulation in transgenen Tomaten aufgetreten sein könnten. Auch die schon oben beschriebenen PTGS-Effekte könnten auf die Expression des Transgens einen Einfluss ausgeübt haben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei dem Einsatz von Wildtyppflanzen keine Sekundäreffekte durch den Versuchsansatz detektiert werden konnten, bei transgenen Tomaten können sie jedoch nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der Homologie der *Lhc*-mRNAs ist aber davon auszugehen, dass diese Effekte auf alle *Lhc*-Transkripte gleichermaßen wirken würden. Deshalb sind die Halbwertszeiten, die für die einzelnen *Lhc*-Transkripte in den transgenen Pflanzen bestimmt wurden, hervorragend miteinander vergleichbar. Bei einem Vergleich dieser Daten mit anderen Messungen, die mit Wildtyppflanzen durchgeführt wurden, muss jedoch die mögliche Auswirkung von Sekundäreffekten in Betracht gezogen werden.

#### **4.2.2 *Lhc*-Genexpression und *Lhc*-mRNA-Stabilität**

Die Synthese (Transkription) der *Lhc*-Transkripte erfolgt in Angiospermen diurnal/circadian (Millar und Kay 1991, Giuliano et al. 1988, Taylor 1989, Wehmeyer et al. 1990). Auch in Gymnospermen ist dieser Prozess vermutlich diurnal/circadian reguliert (vgl. 4.1). In insgesamt 9 Gymnospermenarten wurde aber ein nicht diurnaler Verlauf der *Lhc*-mRNA-Mengen im Tagesverlauf ermittelt (Tabelle 4.1). Für die Detektion dieser *Lhc*-mRNA-Gehalte wurde die Northern Blot Technik angewendet, bei der tageszeitliche Schwankungen in der Transkriptmenge erst erkannt werden können, wenn das Verhältnis zwischen maximaler und minimaler Konzentration einen Unterschied von schätzungsweise Faktor 2 bis 3 aufweist. Es ist denkbar, dass die Schwingung, die durch eine diurnale/circadiane Kontrolle der Transkription entsteht, durch eine hohe Stabilität der mRNA überlagert wird, so dass bei der Detektion der *Lhc*-mRNA-Konzentrationen im Tagesverlauf keine diurnale Fluktuation gemessen werden kann. Modellberechnungen, die Frau Dr. Katja Henning an der Universität Göttingen durchführte, unterstützen diese These. Dabei wurde gezeigt, dass das Verhältnis

zwischen maximaler und minimaler Konzentration bei Erhöhung der Halbwertszeit abnahm (Abb. 4.1). Bei einer Halbwertszeit von 2h errechnete sich für den Quotienten aus maximaler und minimaler Konzentration ein Wert von 3, während bei einer Halbwertszeit von 32h ein Verhältnis von 1,3 kalkuliert wurde. Bei den Rechnungen wurde angenommen, dass die Bildung (Transkription) einer Substanz einem sinusförmigen Verlauf folgte, also diurnal/circadian reguliert ist.



**Abb. 4.1 Modellrechnung zur Bestimmung der Konzentration**

Es wurde angenommen, dass die Transkription einem sinusförmigen Verlauf mit Maximum um 12 Uhr mittags und Minimum um 0.00 Uhr folgt. Mit Hilfe eines Modellierungsprogramms (ModelMaker 3.0.3) wurden dann die Konzentrationen bei unterschiedlichen Halbwertszeiten errechnet.

Für zwei Gymnospermen, *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba*, wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Stabilität der *Lhc*-Transkripte im Licht-Dunkel-Wechsel tatsächlich im Vergleich zu Angiospermen sehr hoch war (Tabelle 4.2). Daraus ergibt sich die folgende Korrelation: Schwankungen der *Lhc*-Transkriptgehalte im Tagesverlauf sind trotz diurnal/circadian regulierter Transkription (Synthese) kaum erkennbar, wenn die Halbwertszeit sehr hoch ist. Somit kann gefolgert werden, dass die *Lhc*-mRNA-Halbwertszeiten bei den 9 untersuchten Gymnospermen, die keine diurnalen Schwankungen der *Lhc*-mRNA-Menge im Tagesverlauf zeigen (Tabelle 4.1), unter Licht-Dunkel-Bedingungen höher als bei Angiospermen sein müssen. Auch unter circadianen Bedingungen im Dauerdunkel sind in Gymnospermen hohe Stabilitäten der *Lhc*-Transkripte zu erwarten. Die Regulation der tageszeitlichen *Lhc*-Genexpression in Gymnospermen im Licht-Dunkel-Wechsel bzw. am 1. und 2. Tag im Dauerdunkel erfolgt demzufolge vermutlich auf posttranskriptionaler Ebene. Eine zusätzliche Regulation auf der Ebene der Transkription

erscheint unwahrscheinlich, kann jedoch aufgrund der bisherigen Datenlage nicht ganz ausgeschlossen werden (vgl. 4.1).

<b>Organismus</b>	<b><i>Lhc</i>- Transkriptakkumulation unter Licht-Dunkel- Bedingungen</b>	<b><i>Lhc</i>- Transkription</b>	<b><i>Lhc</i>-mRNA- Halbwertszeit</b>
<i>Lycopersicon esculentum</i>	diurnal, circadian (Piechulla et al. 1989)	diurnal, circadian (Wehmeyer et al. 1990)	3,5h (diese Arbeit)
<i>Nicotina tabacum</i>	diurnal, circadian (Wehmeyer et al. 1990)	diurnal, circadian (Wehmeyer et al. 1990)	3,1h (diese Arbeit)
<i>Spinacea oleracea</i>	diurnal, circadian (Oelmüller et al. 1995)	n.d.	2,5h (Dr. P. Klaff, persönliche Mitteilung)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	diurnal, circadian (Hwang et al. 1994)	diurnal, circadian (Hwang et al. 1994)	1-2h (Hwang et al. 1994)
<i>Pinus sylvestris</i>	Nicht diurnal (diese Arbeit)	n.d.	23,9h (diese Arbeit)
<i>Ginkgo biloba</i>	Nicht diurnal (diese Arbeit)	n.d.	36,7h (diese Arbeit)

**Tabelle 4.2 Übersicht aller bisher bekannten Daten der *Lhc*-Transkripthalbwertszeiten in verschiedenen Organismen in Kombination mit den *Lhc*-Transkriptakkumulationen im Tagesverlauf unter Licht-Dunkel-Bedingungen und der *Lhc*-Transkription**

In Angiospermen wie z. B. *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum* und *Spinacea oleracea* und in Grünalgen wie z. B. *Chlamydomonas reinhardtii* wurden im Unterschied zu vielen Gymnospermen bei der Untersuchung der *Lhc*-Transkriptgehalte im Tagesverlauf diurnale bzw. circadiane Schwingungen in der *Lhc*-Transkriptmenge gemessen (zusammengefasst in Piechulla 1999). Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Synthese (Transkription) der *Lhc*-Transkripte in verschiedenen Angiospermen (*Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Zea mays*, *Nicotiana tabacum*; Millar und Kay 1991, Giuliano et al. 1988, Taylor 1989, Wehmeyer et al. 1990) und in *Chlamydomonas reinhardtii* (Hwang et al. 1994) diurnal/circadian reguliert ist. Die Schwingung in Bezug auf die *Lhc*-mRNA-Menge, die durch die circadian regulierte Synthese entsteht, kann folglich nicht durch eine hohe Halbwertszeit überlagert werden, so dass kleinere Werte der *Lhc*-mRNA-Halbwertszeiten im Vergleich zu Gymnospermen zu erwarten sind. Im Rahmen dieser Arbeit und von Frau Dr. Klaff wurden für die *Lhc*-mRNA-Halbwertszeiten der Angiospermen *Nicotiana tabacum*,

*Lycopersicon esculentum* und *Spinacea oleracea* Werte von 2-3,5 h ermittelt. Hwang et al. (1994) bestimmten darüber hinaus einen Wert von 1-2 h für die *Lhc*-mRNA-Halbwertszeit in *Chlamydomonas reinhardtii*. Damit ist die Stabilität der *Lhc*-Transkripte in Angiospermen (und *Chlamydomonas reinhardtii*) sehr viel geringer als in den Gymnospermen. Damit lässt sich folgende Korrelation formulieren: Schwankungen der *Lhc*-Transkriptgehalte im Tagesverlauf sind nur detektierbar, wenn bei diurnal/circadian regulierter Synthese die Halbwertszeit gering ist.

Am 5. bzw. 4. und 6. Tag im Dauerdunkel konnte sowohl bei *Pinus sylvestris* wie auch bei *Ginkgo biloba* eine circadiane Schwingung der *Lhc*-mRNA-Menge detektiert werden (Abb. 3.6-3.8). Da unter diesen Bedingungen Oszillationen erkennbar sind, kann angenommen werden, dass die Transkription dieser Gene circadian verläuft und dass die Stabilitäten der *Lhc*-Transkripte in diesen Organismen verringert werden. Auch aus der Literatur ist bekannt, dass Licht die Stabilität eines Transkriptes beeinflussen kann. So sind die Transkripte von *psbAI* und *psbAIII* in *Synechococcus* im Starklicht weniger stabil als in Schwachlicht (Kulkarni und Golden 1997). Von Garcia-Dominguez et al. (2000) und Shiina et al. (1998) wurde dagegen gezeigt, dass Licht einen destabilisierenden Effekt auf die Transkripte einer Histidinkinase (*Cph1*) und eines putativen Responseregulators (*rcp1*) in *Synechocystis* bzw. auf die mRNA der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcL*) in Tabak ausübt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Lhcb*-Gen aus der Gymnosperme *Pinus contorta* konstitutiv unter der Kontrolle des 35S-Promotors in transgenen Tomatenpflanzen exprimiert. Dabei war in beiden transgenen Tomatenlinien 8/2 und 14/25 die *Pinus-Lhc*-mRNA in jedem Fall stabiler im Vergleich zu den Tomaten-*Lhc*-Transkripten. Weil die Messungen in denselben Pflanzen durchgeführt wurden und somit identische zelluläre Voraussetzungen vorhanden sind, sind wahrscheinlich die Sequenzunterschiede der Transkripte für die unterschiedlichen Halbwertszeiten verantwortlich. Im folgenden werden daher die Ergebnisse eines Sequenzvergleichs der Transkripte *Lhc1\*2* aus *Lycopersicon esculentum* und *Lhcb* aus *Pinus contorta* diskutiert. In der Literatur sind verschiedene Elemente in der Sequenz von Transkripten beschrieben, die einen Einfluss auf die Stabilität ausüben können. So wurde von Ohme-Takagi et al. (1993) und Chen und Shyu (1995) gezeigt, dass AUUUA-Motive im 3'UTR-Bereich von tierischen oder pflanzlichen Transkripten eine Instabilität vermitteln können. In der 3'UTR des *Lhc1\*2*-Transkripts der Tomate konnte dieses Element in zweifacher Kopie gefunden werden, während es bei *Pinus contorta* nicht auftauchte (Abb. 3.39). Diesen Befund unterstützen die experimentellen Ergebnisse, dass in Tomaten- und

*Pinus sylvestris*-Pflanzen sowie transgenen Tomatenlinien die Tomaten-*Lhc*-Transkripte weniger stabil sind als die *Pinus-Lhc*-mRNA. Ursprünglich wurden Adenin/Uracil-reiche Sequenzen AREs (adenylate/uridylate-rich elements) bei Untersuchungen der 3'UTR-Bereiche von Transkripten aus Säugern gefunden. Von Ohme-Takagi wurde gezeigt, dass ein Reporter gen mit 11 Kopien dieses Motivs in der 3'UTR in Tabak sehr schnell abgebaut wird. Über den Mechanismus, über den dieses Sequenzelement wirkt, gibt es in der Literatur keine Angaben. Es ist denkbar, dass es beispielsweise eine Bindestelle für ein mit der RNA-Degradation verbundenes Protein darstellt. In diesem Fall könnten auch Positionen in der 5'-UTR oder/und in den kodierenden Regionen wichtig sein. In den *Lhc*-Transkripten von Angiospermen und Gymnospermen kann dieses Sequenzelement sowohl in der 3'-UTR wie auch in den kodierenden Regionen gefunden werden. Welche Funktion es an diesen Positionen besitzt und welche Proteine daran binden, sollte in weiteren Experimenten ermittelt werden. Es ist darüber hinaus ebenfalls unbekannt, wie viele Kopien dieses Motivs notwendig sind, um eine Instabilität zu verursachen. Bei mRNAs aus Säugetieren ist das Sequenzmotiv AUUUA nicht als destabilisierendes Element wirksam. Erst eine verlängerte Sequenz UUAUUUAUU führt zu einer Destabilisierung des Transkriptes (Lagnado et al. 1994, Zubiaga et al. 1995). Aus diesem Grund muss angenommen werden, dass auch die das Kernmotiv umgebenden Sequenzen einen Einfluss auf die Stabilität des Transkriptes ausüben können. Ob die umgebenden Sequenzen auch bei den *Lhc*-Transkripten aus *Lycopersicon esculentum* und *Pinus contorta* eine Wirkung auf die *Lhc*-mRNA-Halbwertszeit besitzen, ist nicht bekannt und bedarf fortführender Untersuchungen. Das alleinige Auftreten von Sequenzelementen kann auf die Instabilität eines Transkriptes hindeuten, die aber stets experimentell bestätigt werden sollte.

Weitere Instabilität vermittelnde Sequenzelemente wie z. B. DST (Downstream element), das zuerst in der 3'UTR SAUR (small auxin up regulated)-Genen in der Sojabohne (Mc Clure et al. 1989) beschrieben wurde, das Auftreten von Stopcodons, die vor dem eigentlichen Ende der mRNA auftreten und zur vermehrten Degradation führen (van Hoof et al. 1997) oder das Light Responsive Element LRE aus der 5'UTR-Region der Ferredoxin-mRNA aus Reis (Chan et al. 1998), wurden in den untersuchten *Lhc*-Transkripten aus Tomate und *Lycopersicon esculentum* nicht gefunden. Neben der Suche nach Sequenzelementen in der mRNA wurden mit Hilfe einer Datenbank die gesamten 3'UTR-Regionen des Tomaten-*Lhc1\*2*-Gens und des *Pinus contorta-Lhcb*-Gens miteinander verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die 3'UTR des Tomaten-*Lhc*-Gens zu den 3'UTRs von

Angiospermen (Tabak) mehr Ähnlichkeit aufwies als zu denen aus Gymnospermen. Analog fand sich beim Vergleich der 3'-UTR des *Pinus-Lhc*-Gens eine höhere Übereinstimmung zu 3'-UTRs von *Lhc*-Genen aus Gymnospermen (*Pinus palustris* und *Pinus thunbergii*). Diese Beobachtungen lassen sich durch die stammesgeschichtliche Abstammung von Tomate und *Pinus* erklären. So gehören sowohl die Tomate wie auch der Tabak zur Familie der Nachtschattengewächse. *Pinus contorta*, *Pinus palustris* und *Pinus thunbergii* stammen darüber hinaus aus der gleichen Gattung. Überdies zeigt dieser Vergleich aber auch in Übereinstimmung mit dem Auftreten bzw. Fehlen von AUUUA-Motiven, dass Sequenzunterschiede zwischen den 3'-untranslatierten Regionen der *Lhc*-Gene von Gymnospermen und Angiospermen bestehen könnten. Um diese Hypothese statistisch abzusichern und darüber hinaus abschätzen zu können, in wie weit solche Unterschiede in Zusammenhang stehen mit einer erhöhten bzw. reduzierten *Lhc*-mRNA-Stabilität, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Grundsätzlich ist zu bemerken, dass die Transkripte in einer Zelle nicht als linear gestreckte Moleküle vorliegen, sondern über Interaktion der enthaltenen Basen in Sekundär- und Tertiärstrukturen organisiert sind. Aus thermodynamischen Größen ließen sich die Sekundärstrukturen der *Lhcb* mRNA aus *Pinus contorta* und der *Lhc1\*2* (*cab1B*) mRNA aus Tomate ermitteln, die die geringsten Werte für die freie Enthalpie zeigen (Abb. 3.40). Dabei war die freie Energie pro Nukleotid bei der *Pinus-Lhc*-mRNA um mehr als 30% höher im Vergleich zur Tomaten-*Lhc*-mRNA. Aus diesen Berechnungen lässt sich folgern, dass die *Pinus-Lhc*-mRNA stabiler sein sollte als die Tomaten-*Lhc*-mRNA. Diese Rechnungen unterstützen die experimentell bestimmten Daten aus Abb. 3.27 und Abb. 3.29. Die tatsächlich in der Zelle vorliegende Struktur der Transkripte muss allerdings nicht in allen Fällen der errechneten thermodynamisch günstigsten Form entsprechen, sondern kann in einer suboptimalen bzw. metastabilen Struktur auftreten, die vermutlich nach der Transkription schneller als die thermodynamisch günstigsten Form gefaltet wird (Klaff et al. 1996). Aus diesem Grund stellen diese Kalkulationen Voraussagen dar, die nicht unbedingt Information über die realen Verhältnisse in der Zelle geben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwischen den Sequenzen der Transkripte *Lhc1\*2* aus der Angiosperme *Lycopersicon esculentum* und *Lhcb* aus der Gymnosperme *Pinus contorta* Unterschiede bestehen, die auf unterschiedliche Stabilitäten dieser mRNAs schließen lassen. Ob diese Schlussfolgerung auf alle *Lhc*-Transkripte von Angiospermen im Vergleich zu Gymnospermen zutrifft, sollte durch fortführende Untersuchungen überprüft werden. Leider sind nur wenige Sequenzen von *Lhc*-

Transkripten aus Gymnospermen in Datenbanken hinterlegt, so dass für eine statistische Absicherung zuerst weitere *Lhc*-mRNAs sequenziert werden müssen.

### 4.3 Rhythmische Phänomene in Gymnospermen

In Angiospermen existieren zahlreiche rhythmische Phänomene wie z. B. die Gasaufnahme, der Wurzelndruck, die CO<sub>2</sub>-Produktion, das Öffnen der Blüten, die Duftstoffproduktion, das Wachstum von Stängel oder Enzymaktivitäten, Stomata- und Blattbewegungen (Sweeney 1987), die einer diurnalen/circadianen Rhythmik unterliegen. Auch die Expression vieler Gene ist in Angiospermen diurnal/circadian reguliert. So unterliegt die Transkriptmenge der RuBisCO-Aktivase (*rca*) in der Angiosperme *Arabidopsis thaliana* circadianen Schwankungen (Liu et al. 1996). Im Gegensatz dazu folgte die *rca*-Transkriptakkumulation in der Gymnosperme *Gnetum gnemon* keinem diurnalen Verlauf (Abb. 3.10). Auch die mRNA-Konzentrationen der Glutaminsynthetase (*gs*) in *Pinus sylvestris* unterlag keinen diurnalen Fluktuationen und wurde als konstant beschrieben (Abb. 3.11), während in der Angiosperme Tomate eine deutliche diurnale Schwankung der *gs*-Transkriptmenge detektiert werden (Becker et al. 1992) konnte.

Gymnosperme	Gen	diurnal	circadian
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>hem A</i>	-	n.d.
	<i>gsa</i>	-	n.d.
	<i>ala D</i>	-	n.d.
<i>Gnetum gnemon</i>	<i>rca</i>	-*	n.d.
<i>Larix decidua</i>	<i>hem A</i>	-	-
	<i>gsa</i>	-	-
	<i>ala D</i>	-	-
<i>Pinus sylvestris</i>	<i>hem A</i>	-	-
	<i>gsa</i>	-	-
	<i>ala D</i>	-	-
	<i>gs</i>	-*	n.d.

**Tabelle 4.3 Übersicht aller bisher bekannten Daten zur Expression von Genen in Gymnospermen, die in Angiospermen diurnal/circadian reguliert sind mit Ausnahme der *Lhc*-Gene (nach Jäschke 1996, \* diese Arbeit)**

In Angiospermen sind neben den *Lhc*-Genen auch Gene, die bei der Chlorophyllsynthese eine wichtige Rolle spielen wie z. B. die Glutamyl-tRNA Reduktase (*hemA*), die Glutamat-1-Semialdehyd Aminotransferase (*gsa*) oder die 5'- Aminolävulinsäure-Dehydratase *alaD* diurnal/circadian reguliert (Beator und Klopstech 1994, Jäschke 1996). Jäschke (1996) konnte dagegen zeigen, dass die Transkriptakkumulation dieser Gene in den Gymnospermen

*Pinus sylvestris*, *Larix decidua* und *Ginkgo biloba* keinen diurnalen/circadianen Schwankungen unterlag. Aus der Gesamtheit dieser Daten (Tabelle 4.3) lässt sich schließen, dass die Expression in Gymnospermen bei den bisher untersuchten Genen nicht diurnal/circadian erfolgte wie in Angiospermen. Differenzen in der Regulation zwischen Angiospermen und Gymnospermen sind folglich nicht nur auf *Lhc*-Gene beschränkt (4.1 und 4.2), sondern betreffen auch weitere Gene. In wie weit sich die Regulationsmechanismen zwischen Angiospermen und Gymnospermen unterscheiden, muss aber für die Expression der Gene im einzelnen untersucht werden.

Um eine statistische Aussage treffen zu können, wie viele der Gene, deren Expression in Angiospermen diurnal/circadian reguliert werden, nicht aber in Gymnospermen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Gegenwärtig existieren nur wenige Sequenzinformationen über Gene aus Gymnospermen, deren Transkriptmengen in Angiospermen einem diurnalen/circadianen Verlauf folgen. Sind Sequenzinformationen bekannt, so können sich für die Untersuchungen in Gymnospermen weitere Probleme ergeben, wie z. B. eine entwicklungsabhängige Expression in schlecht zugänglichen Geweben oder aber die sehr geringe Konzentration im Vergleich zu Angiospermen. So wird ein „germin-like protein“ in *Pinus caribaea* nur in den Embryonen exprimiert und verschwindet bei der Reifung (Neutelings et al. 1998).

Neben der Genexpression sind in Angiospermen auch die Stomata- und Blattbewegungen (Sweeney 1987) diurnal/circadian reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei allen sechs untersuchten Gymnospermen (*Ginkgo biloba*, *Pinus sylvestris*, *Picea abies*, *Taxus baccata*, *Araucaria heterophylla* und *Araucaria angustifolia*) circadiane Blattbewegungen im Dauerlicht detektiert werden, obwohl die Amplitude der Schwingungen bei den Gymnospermen mit Ausnahme von *Araucaria heterophylla* im Vergleich zu der bei den betrachteten Angiospermen wesentlich geringer war. Für die Angiospermen *Lycopersicon esculentum* und *Nicotiana tabacum* wurde für die Periodenlänge im Freilauf d. h. unter circadianen Bedingungen in dieser Arbeit ein Wert von 24 h ermittelt, die mit Literaturwerten von 22 bis 26 h gut übereinstimmen (zusammengefasst in: Gorton et al. 1989). Für die Gymnospermen konnten Periodenlängen von 17h und 32h ermittelt werden (Abb. 3.41). Von Angiospermen sind tagesperiodische Hebungs- und Senkungsbewegungen von Blättern schon seit langer Zeit bekannt. Erste Beschreibungen von Schmetterlingsblütlern stammen aus der Zeit des Alexanderzuges (etwa 300 v. Chr.). De Mairan entdeckte 1729 die endogen-

tagesperiodische (circadiane) Komponente, indem er die Fortsetzung dieser Bewegungen im Dauerdunkel messen konnte. Dabei können die Bewegungen durch unterschiedliches Wachstum vom oberen und unteren Teil des Blattes (Haupt 1977 und 1979) oder aber durch Turgoränderungen in den Blattgelenken (Pulvinus) verursacht werden. Für letztere zeigten Untersuchungen von Ueda und Yamamura (2000), dass die Position eines Blattes in verschiedenen Angiospermen durch die Einstellung eines bestimmten Konzentrationsverhältnisses von LOS (leaf opening substances) zu LCS (leaf closing substances) bestimmt wird. Die Einstellung dieses Konzentrationsverhältnisses wird wiederum auf die circadiane Expression einer beta-Glucosidase zurückgeführt. Über die Ursachen der Blattbewegungen von Gymnospermen ist bislang nicht bekannt, so dass hier weiterer Forschungsbedarf besteht. Die Bedeutung der Blattbewegung liegt nach Bünning und Moser (1969) in der Reduzierung der Lichtabsorption bei Mondlicht durch die senkrechte Position der Blätter. Dadurch wird vermieden, dass photoperiodische Reaktionen wie z. B. Blühen zur falschen Jahreszeit ausgelöst werden. Nach Darwin 1899 geht dagegen in kühlen Nächten weniger Wärme verloren, wenn die Blätter senkrecht stehen. Da die Nadeln der Pinopsida eine geringe Oberfläche aufweisen, die zudem im Vergleich zu den flächigen Blättern der meisten Angiospermen besser isoliert ist, könnte gefolgert werden, dass rhythmisch regulierte Blattbewegungen für Gymnospermen eine weniger wichtige Rolle spielen als bei Angiospermen und deshalb auch geringer ausgeprägt sind.

Auch die Stomatabewegung unterliegt in Angiospermen der Kontrolle der circadianen Uhr. Stomatäre Rhythmen in Blättern können direkt als Veränderungen in Länge und Breite der Spaltöffnung (z. B. Fukuda et al. 2000) oder indirekt über die Detektion der Abweichungen der Transpirationsrate oder der stomatären Leitfähigkeit (z. B. Holmes und Klein 1986, Pallas et al. 1974) bestimmt werden. In Gaswechseluntersuchungen konnte im Rahmen dieser Arbeit für *Ginkgo biloba* im Licht-Dunkel-Wechsel eine diurnale Schwankung der stomatären Leitfähigkeit und damit eine diurnale Stomatabewegung gemessen werden (Abb. 3.42). Durch EM-Bilder konnte ferner gezeigt werden, dass die Stomatabewegung in *Ginkgo biloba* diurnal und circadian erfolgt. Unter Dauerlichtbedingungen war aber bei *Ginkgo biloba* vermutlich die Amplitude zu gering, um Schwankungen mittels Gaswechsellmessungen zu detektieren. Ob im Lichtdunkelwechsel in *Ginkgo biloba* zahlenmäßig mehr Stomata geöffnet bzw. geschlossen oder ob sie im Vergleich zum Dauerlicht weiter geöffnet bzw. geschlossen sind, darüber kann aufgrund der eingesenkten Lage der Stomata mit Hilfe der EM-Bilder keine Aussage getroffen werden. Allerdings ist bekannt, dass sich bei vielen Pflanzenarten die

---

Stomata im Dunkeln nicht komplett schließen, wenn die Belastung des Wasserhaushaltes gering ist (K. Raschke, persönliche Mitteilung). Neben *Ginkgo biloba* wurde auch die Angiosperme *Nicotiana tabacum* untersucht. Die Ergebnisse (Abb. 3.42) stimmen mit Literaturdaten gut überein, die ebenfalls eine diurnal/circadian regulierte Stomatabewegung bei Tabak zeigten (Maddowall 1964). Aus der geringen Amplitude der Stomatabewegung in *Ginkgo biloba* lässt sich folgern, dass dieser Parameter für diese Gymnosperme nicht die gleiche Bedeutung zu haben scheint wie in Angiospermen. Festzuhalten ist, dass die Existenz von rhythmischen Phänomenen und damit einer inneren Uhr in Gymnospermen mit Hilfe der physiologischen Messungen bestätigt werden konnte.

## 5. Zusammenfassung

Die Gymnospermen *Pinus sylvestris*, *Pinus contorta* und *Ginkgo biloba* zeigten im Licht-Dunkel-Wechsel keine diurnale *Lhc*-mRNA-Akkumulation im Tagesverlauf. Ebenso folgten die Transkriptkonzentrationen der RuBisCO-Aktivase (*rca*) bzw. der Glutaminsynthetase (*gs*) im Tagesgang bei den Gymnospermen *Gnetum gnemon* und *Pinus sylvestris* keinem bzw. nur einem gering ausgeprägtem diurnalen Rhythmus. Daraus ergibt sich, dass diese drei Gene, die in Angiospermen diurnal bzw. circadian reguliert werden, in Gymnospermen wahrscheinlich anderen Regulationsmechanismen unterliegen. Die Regulation der *Lhc*-Transkription bei der Reaktion auf Licht in den Gymnospermen *Ginkgo biloba* und *Pinus sylvestris* erfolgte tageszeitabhängig wie bei Angiospermen. Licht bewirkte dabei eine Zunahme (*Pinus sylvestris*) bzw. eine Abnahme (*Ginkgo biloba*) der *Lhc*-mRNA-Menge.

In dieser Arbeit wurden mögliche Gründe für die unterschiedlichen Muster der mRNA-Gehalte im Tagesgang zwischen Angiospermen und Gymnospermen analysiert:

So vermittelte ein Gymnospermenpromotor (*Lhcb* aus *Pinus contorta*) in transgenen Angiospermen (Tabak) eine circadiane Rhythmik der Expression eines Reporter-Gen-Transkriptes (*uidA*). Unterschiede der Promotoren zwischen Angiospermen und Gymnospermen kommen somit als Erklärung der Differenzen nicht in Betracht. Bei Dauerdunkelversuchen mit *Ginkgo biloba* und *Pinus sylvestris* zeigten sich am 4. bzw. 6. Tag circadiane *Lhc*-mRNA-Oszillationen. Diese beiden Ergebnisse sprechen für eine circadiane Kontrolle der *Lhc*-Genexpression auf transkriptionaler Ebene in den Gymnospermen *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba*.

mRNA-Stabilitätsuntersuchungen ergaben Halbwertszeiten von 23,9 h bis 36,7 h für die *Lhc*-Transkripte in *Pinus sylvestris* und *Ginkgo biloba*, während in *Nicotiana tabacum* und *Lycopersicon esculentum* diese 3,1-3,5 h betragen. Auch in transgenen Tomatenlinien, die das *Lhcb*-Gen von *Pinus contorta* exprimierten, wurde eine deutlich erhöhte Halbwertszeit der transgenen mRNA im Vergleich zu den Transkripten der endogenen *Lhc*-Gene detektiert. Verantwortlich für die hohen Halbwertszeiten der *Lhc*-mRNA in Gymnospermen sind wahrscheinlich folgende Parameter:

a) die Möglichkeit der Ausbildung von stabilisierenden Sekundärstrukturen (So war die freie Energie  $\Delta G_0$  pro Nukleotid bei der *Pinus-Lhc*-mRNA mit 0,98 kJ/mol um mehr als 30% höher im Vergleich zur Tomaten-*Lhc*-mRNA mit 0,73 kJ/mol.) und

b) das Nicht-Vorhandensein von destabilisierenden Elementen (AUUUA) im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA.

Es kann geschlussfolgert werden, dass die erhöhten Halbwertszeiten (posttranskriptionale Kontrolle) für die nicht oszillierenden *Lhc*-mRNA-Muster verantwortlich sind, indem sie eine wahrscheinlich existierende circadiane Transkriptionskontrolle überdecken.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die grundsätzliche Frage offen, ob Gymnospermen eine circadiane Uhr besitzen oder nicht. Bei allen sechs betrachteten Gymnospermen (*Ginkgo biloba*, *Pinus sylvestris*, *Picea abies*, *Taxus baccata*, *Araucaria heterophylla* und *Araucaria angustifolia*) wurden wie bei den Angiospermen *Lycopersicon esculentum* und *Nicotiana tabacum* circadiane Blattbewegungen im Dauerlicht für mehr als 5 Tage detektiert. Ebenso unterlagen die Stomatabewegungen in *Ginkgo biloba* und *Nicotiana tabacum* einer circadianen Kontrolle, wie durch EM-Aufnahmen gezeigt werden konnte. Gaswechseluntersuchungen mit *Ginkgo biloba* im Licht-Dunkel-Wechsel ergaben diurnale Schwankungen der stomatären Leitfähigkeit, deren Amplitude unter Dauerlichtbedingungen vermutlich zu gering für die Detektion war, so dass hier keine Aussage über eine circadiane Kontrolle getroffen werden kann. Durch diese physiologischen Daten wurde die Existenz einer inneren Uhr in Gymnospermen eindeutig nachgewiesen.



## Literaturverzeichnis

**Abler, M. L.; Green, P. J. (1996):**

Control of mRNA stability in higher plants.  
Plant Mol. Biol. 32: 63-78

**Alabadi, D.; Oyama, T.; Yanovsky, M. J.; Harmon, F.G.; Mas, P.; Kay, S.A. (2001):**

Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock.  
Science 293: 880-883

**Alosi, M.; Neale, B.; Kinlaw, C. (1990):**

Expression of *cab* genes in Douglas-Fir is not strongly regulated by light.  
Plant Physiol. 93: 829-832

**Anderson, S.L.; Kay, S. A. (1995):**

Functional dissection of circadian clock- and phytochrome-regulated transcription of the *Arabidopsis* CAB2 gene.  
Proc. Nat. Acad. Sci USA, 92: 1500-04

**Apel, K.; Kloppstech, K. (1978):**

The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*).  
Eur. J. Biochem. 85: 581-88

**Baumgartner, B. J.; Rapp, J. C.; Mullet, J. E. (1989):**

Plastid transcript activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development.  
Plant Physiol. 89: 1011-18

**Beator, J.; Kloppstech, K. (1994):**

Circadian rhythmicity in the expression of genes in higher plants.  
Plant Mol. Biol. 13: 203-19

**Becker, T.W.; Caboche, M.; Carrayol, E.; Hirel, B. (1992):**

Nucleotide sequence of a tobacco cDNA encoding plastidic glutamine synthetase and light inducibly, organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato.  
Plant Mol. Biol., 19: 367-79

**Brinker, M. (1999):**

Untersuchungen zur Spezifität von Promotoren.  
Studie im Auftrag des Bundesumweltamtes

**Brusslan, J.A.; Karlin-Neumann, G.A.; Huang, L.; Tobin, E. M. (1993):**

An *Arabidopsis* mutant with a reduced level of *cab140* RNA is a result of cosuppression.  
Plant Cell Jun. 5:667-77

**Brusslan, J. A.; Tobin, E. M. (1992):**

Light-independent developmental regulation of *cab* gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 89: 7791-95

**Bünning, E. (1977):**

Die physiologische Uhr.

Springer-Verlag, Berlin/ Heidelberg/ New York

**Bünning, E.; Moser, I. (1969):**

Interference of moonlight with the photoperiodic measurement of time by plants and their adaptive reaction.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62: 1018-22

**Chan, M. T.; Yu, S. M. (1998):**

The 3'utr of a rice alpha-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95, 6543-47

**Chang, S., Puryear, J, Caine, J, (1993):**

A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees.

Plant Mol.Cell Reporter 11: 113-116

**Chen, C.-Ya.; Shyu, A. B. (1995):**

AU-rich elements: characterisation and importance in mRNA degradation.

Trends Biochem. Sci. 20: 465-70

**Chiba, Y.; Ishikawa, M.; Kijima, F.; Tyson, R. H.; Kim, Y.; Yamamoto, A.; Nambara, E.; Leustek, T.; Wallsgrove, R. M.; Naito, S. (1999):**

Evidence for autoregulation of cystathione synthase mRNA stability in *Arabidopsis*

Science 286: 1371-74

**Chinn, E.; Silverthorne, J.; Hotola; A. (1995):**

Light-regulated and organ-specific expression of types 1,2 and 3 light-harvesting complex b mRNA in *Ginkgo biloba*.

Plant Physiol. 107: 593-602

**Clapham, D.; Ekberg, I.; Dormling, I.; Eriksson, G.; Quamaruddin, M.; Vince-Prue (1997):**

Dormancy: Night timekeeping and day timekeeping for the photoperiodic control of budset in Norway spruce. Chapter 12: 1-24

**Darwin, C. (1899):**

Das Bewegungsvermögen der Pflanzen.

Übersetzung Carus, J., 2. Auflage (gesammelte Werke Band 13) Schweizerbart, Stuttgart

**De Mairan (1729):**

Observation botanique, histoire de l' Academie royale des sciences Paris, 35

**Depicker, A.; Van Montagu, M. (1997):**

Post-transcriptional gene silencing in plants.

Current Opinion in Cell Biology, 373-82

**De Rocher, E.J.; Vargo-Gogola, T.C.; Diehn, S.H.; Green, P. J. (1998):**

Direct evidence for rapid degradation of *Bacillus thuringiensis* toxin mRNA as a cause of poor expression in plants.  
Plant Physiol. 117: 1445-61

**Ding, S. W. (2000):**

RNA silencing.  
Current Opinion in Biotechnology, 11: 152-156

**Dunlap, J. C. (1999):**

Molecular bases for circadian clocks.  
Cell 96: 271-90

**Ellis, D. D.; Mc Cab, D.; Russell, D.; Martinell, B.; Mc Cown, B. H. (1991):**

Expression of inducible angiosperm promoter in a gymnosperm, *Picea glauca* (white spruce).  
Plant Mol. Biol., 17: 19-27

**Filatti, J. J.; Kiser, J.; Rose, R.; Comai, L. (1987):**

Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector.  
Biotechnology 5: 726-30

**Fowler, S., Lee, K.; Onuchi, H.; Samach, A.; Richardson, K., Moris, B., Coupland, G.; Puttrill, J. (1999):**

GIGANTEA: A circadian-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains.  
EMBO J. 18: 4679-88

**Fritz, C. C.; Herget, T.; Wolter, F. P.; Schell, J.; Schreier, P. H. (1991):**

Reduced steady-state levels of *rbcS* mRNA in plants kept in the dark are due to differential degradation.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 4458-62

**Fukunda, M.; Hasezawa, S.; Nakajima, N.; Kondo, N. (2000):**

Changes in tubulin protein expression in guard cells of *Vicia faba* L. accompanied with dynamic organization of microtubules during the diurnal cycle.  
Plant Cell Physiol. 41: 600-607

**Gallie, D. R. (1991):**

The cap and poly A tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency.  
Genes Devel. 5: 2108-16

**Garcia-Dominguez, M.; Muro-Pastor, M. I.; Reyes J. C.; Florencio, F. J. (2000):**

Light-dependent regulation of cyanobacterial phytochrome expression.  
J. Bacteriol. 182: 38-44

**Gatz, C.; Frohberg, C.; Wendenburg, R. (1992):**

Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants.  
Plant J., 2: 397-404

**Giuliano, G.; Hoffmann, N. E.; Ko, K.; Scolni, P.; Cashmore, A. R. (1988):**  
Light-entrained circadian clock controls transcription of several plant genes.  
EMBO J. 7: 3635- 3642

**Golden, S. S.; Johnson, C. H.; Kondo, T. (1998):**  
The cyanobacterial circadian system: a clock apart.  
Current Opinion in Microbiology 1: 669-73

**Gorton, H. L.; Williams, W. E.; Gemmell, C. N.; Leheny, E. A.; Shepherd, A. C. (1989):**  
Circadian stomatal rhythms in epidermal peels from *Vicia faba*.  
Plant Physiol. 90, 1329-34

**Green, B. R.; Pichersky, E.; Kloppstech, K. (1991):**  
Chlorophyll a/b binding proteins: an extended family.  
TIBS 16: 181-186

**Gutierrez, R. A., Gustavo C. M.; Green, P. J. (1999):**  
Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control.  
Trends in plant science, No.11: 429-438

**Hanahan, D. (1983):**  
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.  
J. Mol. Biol. 166: 557-60

**Harmer, S. L.; Hogenesch, J. B.; Staume, M.; Chang, H. S.; Han, B.; Zhu, T.; Wang, X.; Kreps, J. A.; Kay, S. A. (2000):**  
Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by circadian clock.  
Science 290: 2110-2113

**Haupt, W.; Feinleib, M. E. (1979):**  
Physiology of movements.  
Encycl. Plant Physiology

**Haupt, W. (1977):**  
Bewegungsphysiologie der Pflanzen.  
Thieme Verlag, Stuttgart, 323-51

**Heizten, C.; Nater, M.; Apel, K.; Staiger, D. (1997):**  
AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 94: 8515-20

**Higgs, D.C.; Barnes, L. J.; Colbert, J. T. (1995):**  
Abundance and half-life of the distinct oat phytochrome A3 and A4 mRNAs.  
Plant Mol. Biol. 29: 367-77

**Holtorf, H.; Schöb, H. P.; Kunz, C.; Waldvogel, R.; Meins, F. (1998):**  
Stochastic and nonstochastic post-transcriptional silencing of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase genes involved increase RNA turnover-possible role for ribosome-independent RNA degradation.  
Plant Cell, 11: 471-83

**Holmes, M. G.; Klein, W. H. (1986):**

Photocontrol of dark circadian rhythms in stomata of *Phaseolus vulgaris* L.  
Plant Physiol. 82: 28-33

**Hwang, S.; Herrin, D. L. (1994):**

Control of *Lhc* gene transcription by the circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*.  
Plant Mol. Biol. 26: 557-569

**Jäschke, K. (1996):**

Untersuchungen zur Genexpression in Gymnospermen und Angiospermen.  
Diplomarbeit, Math. Nat. Fachbereich, Universität Göttingen

**Jansson, S.; Gustafsson, P. (1990):**

Type I and type II genes for the chlorophyll a/b-binding proteins in the gymnosperm *Pinus sylvestris* (Scots Pine): cDNA cloning and sequence analysis.  
Plant Mol. Biol. 14: 287-96

**Jansson, S. (1994):**

The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins.  
Biochim. Biophys. Acta 1184: 1-19

**Jefferson, R. A. (1987):**

Assaying chimeric genes in plants: The gus gene fusion system.  
Plant Mol. Biol. Reporter 5/4: 387-405

**Johnsson, M.A.; Baker, E. J.; Colbert, J. T.; Green, P. (1998):**

Determinants of mRNA stability in plants.  
A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants, Julia Bailey-Serres, D. R. Gallie eds, American Society of Plant Physiologists, 40-53

**Jorgensen, R. A.; Cuellar, R. E.; Thompson, W. F. (1981):**

Modes and tempos in the evolution of nuclear encoded ribosomal genes in legumes.  
Carnegie Inst. Washington Yearb. 81: 98-101

**Karlin-Neumann, G. A.; Sun, L.; Tobin, E. M. (1988):**

Expression on light-harvesting chlorophyll a/b-Protein genes is phytochrome-regulated in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings.  
Plant Physiol 88: 1323-31

**Kay, S.; Millar, A. (1993):**

In the molecular genetics of biological rhythms.  
ed. Young, M. W. (Dekker, NY), Vol. 4: 73-90

**Kellmann, J. W.; Merforth, N.; Wiese, M.; Pichersky, E., Piechulla, B. (1993):**

Concerted circadian oscillations in transcript levels of nineteen Lha/b (cab) genes in *Lycopersicon esculentum* (tomato).  
Mol. Gen. Genet., 237: 439-48

**Klaff, P.; Riesner, D.; Steger, G. (1996):**

RNA structure and regulation of gene expression.  
Plant Mol. Biol. 32: 89-106

**Klaff, P.; Gruissem, W. (1991):**

Changes in chloroplast mRNA stability during leaf development.  
Plant Cell 3: 517-529

**Kojima, K.; Sakaki, S., Yamamoto, N. (1994):**

Light-independent and tissue-specific expression of a reporter gene mediated by the pine cab-6 promoter in transgenic tobacco.  
Plant J., 6: 591-96

**Kondo, T.; Ishiura, M. (1999):**

The circadian clocks of plants and cyanobacteria.  
Trends in Plant Science 4/5: 171-176

**Kulkarni, R. D.; Golden, S. S. (1997):**

mRNA stability is regulated by a coding-region element and the unique 5' untranslated leader sequences of the tree *Synechococcus psbA* transcripts.  
Mol. Microbiol. 24: 1131-42

**Kreps, J. A.; Simon, A. E. (1997):**

Environmental and genetic effects on circadian clock-regulated gene expression in *Arabidopsis*.  
Plant Cell 9: 297-304

**Lagnado, C. A.; Brown, C. V., Goodall, G. J. (1994):**

AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA.  
Mol Cell Biol. 14: 7984-95

**Liu, Z.; Taub, C. C.; McClung, C. R. (1996):**

Identification of an *Arabidopsis thaliana* ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activase (*rca*) minimal promoter regulated by light and the circadian clock.  
Plant Physiol. 112: 43-51

**Macdowall, F. D. H. (1964):**

Reversible effects of chemical treatments on the rhythmic exudation of sap by tobacco roots.  
Can. J. Bot. 42: 115-122

**Makino, S.; Kiba, T.; Imamura, A.; Hanaki, N.; Nakamura, A.; Suzuki, T.; Taniguchi, M.; Ueguchi, C.; Sugiyama, T.; Mizuno, T. (2000):**

Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phoshorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*.  
Plant Cell Physiol. 41: 791-803

**Marcotte, W. R. (1998):**

A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants. Julia Bailey-Serres, D.R. Gallie eds., American Society of Plant Physiologists s. 64-67

**McBride, K.; Summerfelt, K. R. (1990):**

Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation.  
Plant Mol. Biol. 14: 69-76

**Mc Clure (1989):**

Transcription, organisation and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean.  
Plant Cell 1: 229-39

**Mehdy, M. C.; Brodl, M. R. (1998):**

The role of stress in regulating mRNA stability.

A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants, Julia Bailey-Serres, D. R. Gallie eds., American Society of Plant Physiologists, S.54-63

**Merforth, N. (1996):**

Herstellung und Analyse von 5'-Deletionen in Promotoren ausgewählter Lhc-Gene von *Lycopersicon esculentum* Mill. Dissertation, Math. Nat. Fachbereich, Universität Göttingen

**Mergenhagen, D.; Schweiger, H. G. (1975):**

The effect of different inhibitors of transcription and translation on the expression and control of circadian rhythm in individual cells of *Acetabularia*.

Exp. Cell Res. 94: 321-326

**Meyer, H.; Thienel, U.; Piechulla, B. (1989):**

Molecular characterisation of the diurnal/circadian expression of the chlorophyll a/b-binding proteins in the leaves of tomato and other dicotyledonous and monocotyledonous plant species.

Planta 180: 5-15

**Millar, A. J.; Kay, S. A. (1996):**

Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling CAB gene transcription in *Arabidopsis*.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93: 15491-96

**Millar, A. J.; Kay, S. A. (1991):**

Circadian control of *cab* gene transcription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*.

Plant Cell 3: 541-550

**Millar, A. J.; Short, S.; Chua, N.; Kay, S. A. (1992):**

A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants.

Plant Cell 4: 1075-1087

**ModelMaker, Version 3.0.3, cherwell scientific publishing ltd. (1993-1997)****Murashige, T.; Skoog, F. (1962):**

A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.

Physiol. Plant 15: 473-97

**Mrosovsky, N., (1988):**

Phase response curves for social entrainment.

J. Comp. Physiol. A 126: 35-46

**Nagy, F.; Fejes, E.; Wehmeyer, B.; Dallmann, G.; Schäfer, E. (1993):**

The circadian oscillator is regulated by a very low fluence response of phytochrome in wheat.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6290-94

**Nechustai, R.; Cohen, Y.; Chitis, P. R. (1995):**

Assembly of chlorophyll-protein complex.  
Photosyn. Res. 44: 165-81

**Nelson, D. C.; Lasswell, J.; Rogg, L. E.; Cohen, M. A.; Bartel, B. (2000):**

FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*  
Cell 101: 331-40

**Neutelings, G; Domon, J. M.; Mebre, N.; Bernir, F.; Meyer, Y.; David, A.; David, H. (1998):**

Characterization of a germin-like protein gene expressed in somatic and zygotic embryos of pine (*Pinus Caribibaea* Morelet).  
Plant Mol. Biol. 38: 1179-90

**Newman, T. C., Ohme-Takagi, M.; Taylor, C. B.; Green, P. J. (1993):**

DTS sequences highly conserved among plant SAUR genes target reporter transcripts for rapid decay in tobacco.  
Plant Cell 5: 701-714

**Oberschmidt, O.; Hücking, C.; Piechulla, B. (1995):**

Diurnal *Lhc* gene expression is present in many but not all species in the plant kingdom.  
Plant Mol. Biol. 27: 147 - 153

**Oelmüller, R.; Schneiderbauer, A.; Herrmann, R. G. (1995):**

The steady-state mRNA levels for the thylakoid proteins exhibit coordinate diurnal regulation.  
Mol. Gen. Genet. 246: 478-84

**Ohme-Takagi, M.; Taylor, C. B.; Newman, T. C.; Green P. J. (1993):**

The effect of sequences with high au content on mRNA stability in tobacco.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 11811-15

**Ouyang, Y.; Andersson, C. R.; Kondo, T.; Golden, S.; Johnson, C. H. (1998):**

Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 8660-8664

**Park, D. H.; Somers, D. E.; Kim, Y. S.; Choy, Y. H.; Lim, H. K.; Soh, M. S.; Kim, H. J.; Kay, S. A.; Nam, H. G. (1999):**

Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis* GIGANTEA gene.  
Science 285: 1579-82

**Pallas, J. E.; Samish, Y. B.; Willmer, C. M. (1974):**

Endogenous rhythmic activity of photosynthesis, transpiration, dark respiration and carbon dioxide compensation point of peanut leaves.  
Plant Physiol. 53: 907-11

**Paulsen, H.; Bogorad, L. (1988):**

Diurnal and circadian rhythms in the accumulation and synthesis of mRNA for the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein in tobacco.  
Plant Physiol. 88: 1104-09

**Peer, W.; Silverthorne, J.; Peters, J. L. (1996):**

Developmental and light-regulated expression of individual members of the light-harvesting complex b gene family in *Pinus palustris*.  
Plant Physiol. 111: 627-34

**Peltz, S. W.; Brewer, G.; Bernstein, P.; Hart, P. A.; Ross, J. (1991):**

Regulation of mRNA turnover in eukaryotic cells.  
Crit. Rev. Euk. Gene Exp. 1: 99-126

**Petracek, M. E.; Nuygen, T.; Thompson, W. F.; Dickey, L. F. (2000):**

Premature termination codons destabilize ferredoxin-1 mRNA when ferredoxin1 is translated  
Plant J. 21: 563-69

**Phillips, J. R.; Dunn, M. A.; Hughes, M. A. (1997):**

mRNA stability and localisation of the low-temperature-responsive barley gene family btl14.  
Plant Mol. Biol. 33: 1013-23

**Piechulla, B. (1989):**

Changes of the diurnal and circadian (endogenous) mRNA oscillations of the chlorophyll a/b binding protein in tomato leaves during altered day/night (light/dark) regimes.  
Plant Mol. Biol. 12: 317-27

**Piechulla, B. (1999):**

Circadian expression of the light harvesting complex protein genes in plants.  
Chronobiology International 16: 115-128

**Piechulla, B.; Brinker, M.; Jäschke, K.; Kellmann, J. W.; Wissel, K. (2001):**

Circadian gene expression in angiosperms and gymnosperms.  
International Journal of Endocytosis and Cell Research 14: 33-44

**Piechulla, B.; Merforth, N.; Rudolph, B. (1998):**

Identification of tomato *Lhc* promoter necessary for circadian expression.  
Plant Mol. Biol. 38: 655-662

**Piechulla, B.; Pichersky, E.; Cashmore A. R.; Gruissem, W. (1996):**

Expression of nuclear and plastid genes for photosynthesis-specific proteins during tomato fruit development and ripening.  
Plant Mol. Biol 7: 367-76

**Pilgrim, M.; McClung, C. R. (1993):**

Differential involvement of the circadian clock in the expression of genes required for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesis, assembly, and activation in *Arabidopsis thaliana*.  
Plant Physiol. 103: 553-564

**Plotnikov, V. K.; Balkaldina, N. B. (1996):**

Differential stability of zein mRNA in developing corn kernel.  
Plant Mol. Biol. 31-3: 507-15

**Riesselmann, S.; Piechulla, B. (1990):**

Effects of dark phases and temperature on the chlorophyll a/b binding protein mRNA level oscillations in tomato seedlings.

Plant Mol. Biol. 14: 605-16

**Riesselmann, S.; Piechulla, B. (1992):**

Diurnal and circadian light-harvesting complex and quinone B-binding protein mRNA level oscillations in tomato seedlings.

Plant Mol. Biol. 14: 605-16

**Roenneberg, T.; Morse (1993):**

Two circadian oscillators in one cell.

Nature 362: 362-64

**Sabala, I.; Elfstrand, M.; Farbos, I.; Clapham, D.; von Arnold, S. (2000):**

Tissue-specific expression of PA18, a putative lipid transfer protein gene, during embryo development in Norway spruce (*Picea abies*).

Plant Mol. Biol., 42: 461-78

**Schaffer, R.; Ramsay, N.; Samach, A.; Corden, S.; Putterill, I.; Carre, I. A.; Coupland, G. (1998):**

The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering.

Cell 93: 1219-29

**Schmitz, M.; Steger, G., (1992):**

Base-pair probability profiles of RNA secondary structure.

Comp. Appl. Biol. Sci. 8: 389-99

**Schuster, J.; Engelmann, W. (1990):**

Recording of rhythms in organisms using video digitizing.

In: Chronobiology: Its role in clinical medicine, general biology and agriculture. Part b (Hayes, D.K.; Parly, J.E. and Reiter, R.J. eds), Wiley-Liss, New York, 389-96

**Salvador, M. L.; Klein, U.; Bogorad, L. (1993):**

Light-regulated and endogenous fluctuations of chloroplast transcript levels in *Chlamydomonas*. Regulation by transcription and RNA degradation.

Plant J. 3: 213-19

**Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989):**

Molecular cloning, a laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

**Shiina, T.; Allison, L.; Maliga, P. (1998):**

rbcL transcript levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability

Plant Cell 10, 1713-22

**Shinohara, K.; Honma, S.; Katsuno, Y; Abe, K.; Honma, K., (1995):**

Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92: 7396-7400

**Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. (1992):**

Lehrbuch der Botanik für Hochschulen.

Von Strasburger, E.; Noll, F.; Schenck, A;

33. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

**Skinner, J. S.; Timko, M. P. (1998):**

Loblolly pine (*Pinus taeda*) contains multiple expressed genes encoding light-dependent NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase (POR).

Plant Cell Physiol. 39, 795-806

**Somers, D. E.; Webb, A. A.; Pearson, M.; Kay, S. A. (1998):**

The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*.

Development 125 : 485-494

**Somers, D. E.; Schultz, T. F.; Milnamow, M.; Kay, S.A. (2000) :**

ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*.

Cell 101: 319-29

**Spiller, S. C.; Kaufmann, L. S.; Thompson, W. F.; Briggs, W. R. (1987):**

Specific mRNA and rRNA levels in greening pea leaves during recovery from iron-stress.

Plant Physiol. 84: 409-14

**Stayton, M. M.; Brosio, P.; Dunsmuir, P. (1989):**

Photosynthetic genes of *Petunia* (Mitchell) are differentially expressed during the diurnal cycle.

Plant Physiol. 89: 776-82

**Strayer C., Oyama, T.; Schlutz, T. F.; Raman, R.; Somers, D. E.; Mas, P.; Pnada, S.; Kreps, J. A.; Kay, S. A. (2000):**

Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog.

Science 289: 768-771

**Sullivan, T. D.; Christensen, A. H.; Quail, P. H. (1989):**

Isolation and characterisation of a maize chlorophyll a/b binding protein gene that produces high levels of mRNA in the dark.

Mol. Gen. Genet. 215: 431-440

**Sweeney, B. M.; Borgese, M. B. (1989):**

A circadian rhythm in cell division in a prokaryote, The Cyanobacterium *Synechococcus* WH7803.

J. Phycol. 25: 183-186

**Sweeney, B. M. (1987):**

Rhythmic Phenomena in plants.

Academic press, San Diego

**Takahashi, J. S. (1993):**

Circadian-clock regulation of gene expression.

Curr. Op. Gen. Devel. 3: 301 – 309

**Taylor, W. C. (1989):**

Transcriptional regulation by a circadian rhythm.  
Plant Cell 1: 259-264

**Tavladoraki, P.; Kloppstech, K.; Argyroudi-Akoyunoglu, J. (1989):**

Circadian rhythm in the expression of the mRNA coding for the apoprotein of the Light harvesting complex of photosystem II.  
Plant Physiol. 90: 665-672

**Thompson, W. F.; Everett, M.; Polans, N. O.; Jorgensen, R. A.; Palmer, J. D. (1983):**

Phytochrom control of RNA levels in developing pea and mung bean leaves  
Planta 158: 487-500

**Ueda, M.; Yamamura, S. (2000):**

Chemistry and biology of plant leaf movements.  
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 39 (8), 1400-14

**van Hoof, A.; Green, P. J. (1996):**

Premature nonsense codons decrease the stability of phytohemagglutinin mRNA in a position-dependent manner.  
Plant J., 10: 415-24

**Van Hoof, A.; Green, P. J. (1997):**

Rare codons are not sufficient to destabilize a reporter gene transcript in tobacco.  
Plant Mol. Biol. 35: 383-87

**Wang, Z.-Y.; Tobin E. (1998):**

Constitutive Expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression.  
Cell 93: 1207-1217

**Walter, C.; Smith, D. R. (1995):**

Transformed *Pinus radiata* now growing in greenhouses at the New Zealand Forest Research Institute.  
Dendrome 2: 1-4

**Wehmeyer, B.; Cashmore, A.; Schäfer, E. (1990):**

Photocontrol of the expression of genes encoding chlorophyll a/b binding proteins and small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in etiolated seedlings of *Lycopersicon esculentum* and *Nicotiana tabacum*.  
Plant Physiol. 93: 990-997

**Wenck, A.R.; Quinn, M.; Whetten, R.W.; Pullman, G.; Sederoff, R. (1999):**

High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*).  
Plant Mol. Biol. 39: 407-416

**Wu, H.; Echt, C. S.; Popp, M. P.; Davis, J. M. (1997):**

Molecular cloning, structure and expression of an elicitor-inducible chitinase gene from pine trees.  
Plant Mol. Biol. 33: 979-87

**Yamamoto, N.; Tada, Y.; Fujimura, T. (1994):**

The promoter of a pine photosynthetic gene allows expression of a beta-glucuronidase reporter gene in transgenic rice plants in a light-independent but tissue-specific manner.  
Plant Cell Physiol. 35: 773-778

**Yamamoto, N.; Mukai, Y.; Matsuoka, M.; Kano-Murakami, Y.; Tanaka, Y. (1991):**

Light-independent expression of cab and rbcS genes in dark-grown pine seedlings.  
Plant Physiol. 95: 379-83

**Ylstra, B.; McCormick, S. (1999):**

Analysis of mRNA stabilities during pollen development in BY2 cells.  
Plant J., 20: 101-08

**Zhang, S.; Sheng, J.; Liu, Y.; Mehdy, M. C. (1993):**

Fungal elicitor-induced bean proline-rich protein mRNA down-regulation is due to destabilisation that is transcription and translation dependent.  
Plant Cell 5: 1089-99

**Zhong, H. H.; Resnick, A. S.; Straume, M.; McClung, C. R. (1997):**

Effects of synergistic signaling by phytochrome A and cryptochrome1 on circadian clock-regulated catalase expression.  
Plant Cell 9: 947-55

**Zhong, H. H.; Young, J. C.; Pease, E. A.; Hangarter, R. P.; McClung, C. R. (1994):**

Interactions between light and the circadian clock in the regulation of cat2 expression in *Arabidopsis*.  
Plant Physiol. 104: 1-10

**Zubiaga, A. M.; Belasco, G. J.; Greenberg, M. E. (1995):**

The nonamer uuauuuuu is the key au-rich sequence motif that mediates mRNA degradation  
Molecular and cellular biology: 2219-30



## **Danksagung**

Frau Prof. Dr. Birgit Piechulla-Bahl möchte ich für die interessante Themenstellung und die sehr gute Betreuung herzlichst danken.

Für die nette Laboratmosphäre und die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Biochemie bedanken. Ein riesengroßes Dankeschön geht an Frau Menzel für die tatkräftige Unterstützung bei den molekularbiologischen Versuchen. Ich danke Jan W. Kellmann für viele gute Ratschläge und die ständige Ansprechbereitschaft, Susanne von Bargen für zahlreiche „Nein-Doch“-Diskussionen, Raimund Hoffrogge für die Tatsache, nicht der einzige Emsländer in der Ferne zu sein, Uta Effmert für viele aufmunternde Worte, Martina Paape und Conny Ganz für die „Blödeleien“, die den Laboralltag verschönerten, Christel Bauer als „Sequenzierungsexpertin“, Marcella Pott für das „Mitstreiten“ bei der Praktikumsbetreuung und Rene Niesner und Kirsten Wissel für die prakti(kanti)sche Hilfe.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. David Clapham und Prof. Dr. Engelmann für die (Arbeits-)aufenthalte in Uppsala (Schweden) und Tübingen. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit und bei den Gärtnern, besonders Herrn Neubert, für die Betreuung der Pflanzen.

Uta Effmert, Jan W. Kellmann, Katja Henning und Kathrin Mackensen danke ich für das Korrekturlesen und die kritische Diskussion dieser Arbeit. An Mathias Meyer geht ein Danke für die computertechnische Hilfe. Dankeschön auch für den Beistand und ablenkende Unternehmungen von allen Freunden und Bekannten.

Dem Land Mecklenburg-Vorpommern danke ich für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium der Landesgraduiertenförderung.



## **Aus dieser Arbeit wurden folgende Teile veröffentlicht:**

### **Rezensierte Publikationen:**

Circadian rhythms of leaf and stomata movement in gymnosperm species (2001):  
Brinker, M.; Engelmann, W.; Kellmann, J.W.; Piechulla, B.  
Biological Rhythm Research, 32 (4), 471-78

Distinct *Lhc* stabilities in several vascular plant species (2001):  
Brinker, M.; Klaff, P.; Wissel, K.; Kellmann, J.W.; Piechulla, B.  
Journal of Plant Physiology, 158, 1479-85

Circadian gene expression in angiosperms and gymnosperms (2001):  
Piechulla, B.; Brinker, M.; Jäschke, K.; Kellmann, J.W.; Wissel, K.  
International Journal of Endocytosis and Cell Research  
14: 33-44

### **Vorträge:**

Circadian rhythms in gymnosperms?  
Brinker, M.; Engelmann, W.; Piechulla, B.  
7. Treffen der „Society for Research on Biological Rhythms“ Jacksonville (Florida, USA),  
Mai 2000

Gibt es eine circadiane Uhr in Gymnospermen?  
Brinker, M.; Piechulla, B.  
„Modern aspects in photosynthesis research“ in Wallenfels (bei Bayreuth, Deutschland),  
Mai 1999

Time dependent gene expression in higher plants,  
Piechulla, B.; Brinker, M.; Jäschke, K.; Kellmann, J. W.  
Turku, März 1999

Regulation of *Lhc* gene expression in higher plants,  
Piechulla, B.; Brinker, M.; Kellmann, J. W.; Menzel, H.  
JEP 12539-97, Intensive course on chronobiology, Freiburg, Dezember 1998

### **Präsentationen:**

Distinct *Lhc* stabilities in different plant species,  
Brinker, M.; Wissel, K.; Kellmann, J. W.; Klaff, P.; Piechulla, B.  
Mosbacher Kolloquium, April 2001

Diurnal and circadian rhythms of leaf and stomata movement in gymnosperm species,  
Brinker, M.; Engelmann, W.; Piechulla, B.  
Workshop of the European Society for Chronobiology, Markgrafenheide 2000

Circadian *Lhc* gene expression in gymnosperms and angiosperms,  
Brinker, M.; Jäschke, K.; Menzel, H.; Piechulla, B.  
SPP München, März 1999

Circadian *Lhc* gene expression in gymnosperms and angiosperms: comparison of regulatory  
elements,  
Brinker, M.; Menzel, H.; Jäschke, K.; Kellmann, J. W.; Piechulla, B.  
Workshop of the European Society for Chronobiology, Markgrafenheide 1998

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich diese Arbeit selbständig angefertigt und keine als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle übernommenen Abbildungen und Zeichnungen wurden unter Angabe der Quellen in diese Arbeit eingefügt.

**Rostock, den 29.11.01**

Monika Brinker



# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Monika Brinker  
Am Kabutzenhof 7  
18057 Rostock  
0381/4908829  
MBrinker@gmx.de  
geb. am 31.05.1971 in Sögel, ledig

## Schulbildung:

1977-1981 Grundschole Surwold-Börgermoor  
1981-1990 Mariengymnasium Papenburg

## Hochschulbildung:

1990-1997 Studium der Fächer Biologie und Chemie für das Lehramt an  
Gymnasien an der Georg-August-Universität Göttingen  
Examensarbeit am Lehrstuhl Biochemie an der Universität Göttingen  
zu Thema: „Einfluss von Acetat und Butyrat auf die Expression der  
Licht-Sammelkomplex-Proteine bei Tomate“  
Abschluss: Erstes Staatsexamen im Juni 1997

August 1997-  
September 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fachbereich Biowissenschaften  
am Lehrstuhl Biochemie an der Universität Rostock

seit Oktober 1999 Arbeiten zur Promotion im Fachbereich Biowissenschaften am  
Lehrstuhl Biochemie an der Universität Rostock, finanziert durch ein  
Stipendium der Landesgraduierföderung





