

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 CO₂-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.

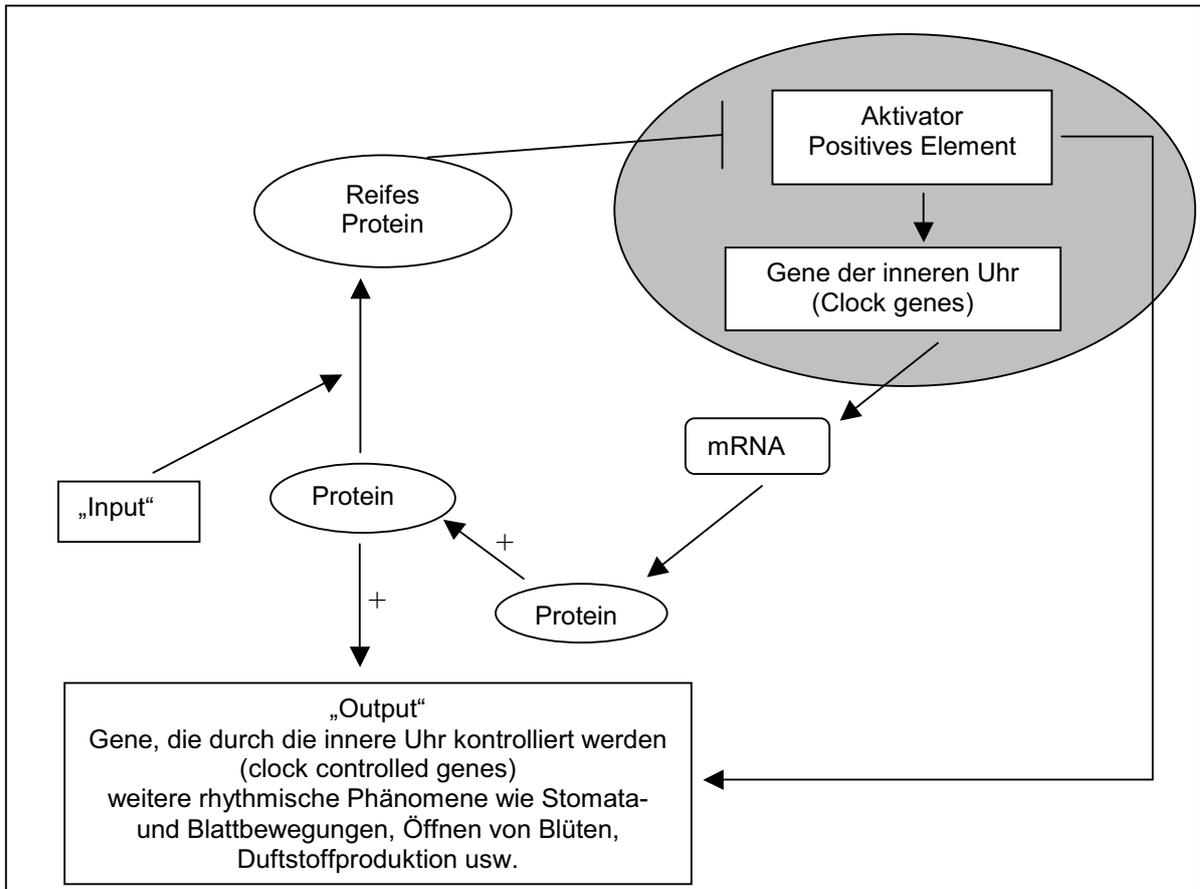


Abb. 1.2 Modell der inneren Uhr in Eukaryoten, modifiziert nach Kondo und Ishiura 1999
Nähere Erläuterungen siehe Text.

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.