

Untersuchungen zur circadianen Rhythmik und Photomorphogenese bei Höheren Pflanzen

Von dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Joachim Volk

geboren am 08.05.1964 in Neustadt/Rbg.

2004

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korrefferent: Prof. Dr. K. Kloppstech

Tag der Promotion: 18.2.2004

Kurzzusammenfassung

Stichworte: circadiane Rhythmik, Photomorphogenese, Temperatursignal

Für die durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss der endogenen Uhr auf die Photomorphogenese Höherer Pflanzen wurden Plexiglaskammern für die Pflanzenanzucht entwickelt, die eine präzise Temperaturregulierung ermöglichten ($\pm 0,1^\circ\text{C}$). Die Ergebnisse zeigen, dass Pflanzen in der Lage sind, unter dem Einfluss geringer zyklischer Temperaturänderungen während kontinuierlicher Dunkelanzucht die Deetiolierung einzuleiten. Ob der Temperaturwechsel ein-, zwei- oder zwölfstündlich erfolgte, ergab keinen signifikanten Unterschied. Geringe Temperaturänderungen beeinflussen deutlich auch die Genexpression und die „photomorphogenetische“ Ontogenese von Pflanzen. Nach Anzucht unter zyklischen Temperaturwechseln (12h/12h) erfolgte bei der untersuchten Gerste die Induktion oder Synchronisation der endogenen Uhr. Es fanden eine zeitlich koordinierte, circadian kontrollierte Pigment- (Chlorophyll, β -Carotin), mRNA- (LHCII und SSU) und Protein-Akkumulation (LHCII, D1, KF) statt.

Bei der Pigmentakkumulation lagen die Maxima zu Beginn der subjektiven Wärmephase und die Minima zu Beginn der subjektiven Kältephase. Die mRNA-Maxima lagen in der Mitte der subjektiven Kälteperiode und die Protein-Maxima von LHCII am Ende der subjektiven Kühlephase, d.h. am Morgen zum Zeitpunkt maximaler Chlorophyllsynthese. Dagegen haben D1 und KF (Kopplungsfaktor der ATP-Synthetase) Maxima zu Beginn der subjektiven Kältephase. SSU und ELIP zeigen auf Proteinniveau keine Rhythmik.

Die Akkumulationsmenge von mRNA und Protein war deutlich niedriger als bei Anzucht unter L/D-Wechsel. Die Maxima lagen in der (subjektiven) Kühlephase, während sie bei L/D-Anzucht in der (subjektiven) Lichtphase lagen. Bei kürzeren Temperaturwechseln (2h/2h) war keine Rhythmik nachweisbar. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eine Rhythmik zwar induziert, die Uhr bei jedem Temperaturwechsel aber neu verschoben (rückversetzt) wurde. Die Oszillationen könnten in etiolierten Pflanzen und den 2h/2h-Varianten auch durch weitere (Uhr-unabhängige) Signaltransduktionswege verborgen werden. Die Expression bei sowohl unter konstanten Bedingungen als auch unter 1h/1h- und 2h/2h-Temperaturwechseln gewachsenen Pflanzen war niedrig. Möglicherweise wird ein sehr empfindlicher Assay klarere Ergebnisse liefern. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Anzucht im L/D-Wechsel (2h/2h) unter freilaufenden Bedingungen (D/D) über vier Perioden eine Rhythmik bei der LHCII mRNA-Akkumulation ($\tau = 4,4 \text{ h}$). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass möglicherweise auch bei kurzen Temperaturwechseln eine hier nicht nachgewiesene Rhythmik induziert werden kann.

Die Bandbreite der Reaktionen und die Beschaffenheit und Dauer des Temperatursignals sind in vielen Einzelheiten noch unklar. Der Terminus „Photomorphogenese“ muss allerdings neu definiert werden. Einzelne Pflanzenarten reagieren sehr unterschiedlich auf Temperaturwechsel. Die Gründe dafür sind noch nicht bekannt.

Aufgrund der Ergebnisse lässt sich die These, dass die Kopplung von Genexpression an die Innere Uhr zu „photomorphogenetischen“ Wachstumsformen führt, nicht generalisieren. Allerdings wurde gezeigt, dass Reaktionen der Uhr auf Temperatursignale der Pflanze zusätzliche Informationen über ihre Umwelt liefern, die nützlich für Wachstum und Entwicklung sein können. Die Mechanismen, über die Licht und Temperatur circadiane Rhythmen beeinflussen, sind nicht aufgeklärt. Die Annahme der Existenz verschiedener Signalwege scheint sinnvoll. Wenn die Uhr eine ausschlaggebende Rolle bei der Photomorphogenese spielt, so konnte diese Annahme mit dem hier benutzten Versuchsaufbau nicht allgemeingültig belegt werden. Untersuchungen mit Mutanten der Inneren Uhr werden vermutlich zu einem näheren Verständnis führen, dabei ist das Augenmerk hauptsächlich auf die Verwendung von monokotylen Pflanzen zu richten.

Abstract

Keywords: circadian rhythm, photomorphogenesis, temperature signal

For the investigations of the hypothesis that an induced circadian rhythm might release a photomorphogenetic phenotype plexiglass chambers were developed to allow a precise temperature adjustment during the plant growth ($\pm 0.1^\circ\text{C}$). The results show that plants can perceive small temperature differences and process them similarly as light signals. Both signals control and coordinate plant growth and the morphologic development to a considerable part. Seedlings grown under cyclic temperature treatment (2:2 hrs, 12:12 hrs, resp.) in the dark developed a de-etiolated phenotype. Temperature changes every two or every twelve hours did not result in significant differences. Small changes of temperature affected clearly the expression of genes and the „photomorphogenetic“ ontogenesis of plants. Moderate cyclic temperature changes (12:12 hrs) induces circadian fluctuations on chlorophyll and β -carotene accumulation, mRNA levels (SSU and LHC II), and protein levels (LHCII, D1, KF) in barley plantlets. These results indicate the induction or synchronisation of the endogenous clock.

After a 12:12 hrs temperature program the maxima in the level of pigments (chlorophyll, β -carotene) and mRNAs (SSU, LHC II) were reached at the beginning of the subjective heat phase and in the middle of the subjective cooling phase, respectively. In accordance with the maxima in chlorophyll accumulation measurements of LHCII protein levels showed oscillations with maxima at the end of the subjective cold phase (i.e. early in the morning). In comparison D1 and KF developed maxima at the beginning of the subjective cold phase, whereas no oscillations of SSU and ELIP were found.

The amount of mRNA and protein in the primary leaves of barley grown under the different temperature programs (in particular under 2:2 hrs) is clearly lower than in seedlings grown under LD cycles. The peak levels were found in the subjective cooling phase whereas under LD cycles they were found within the subjective light phase (Beator and Kloppstech, 1996). At the other temperature programs (constant temperature, 1:1 hr, 2:2 hrs) no circadian rhythms were detected. However, it cannot be excluded that a rhythm was still induced, but every temperature change resulted in resetting the clock. Also, the coupling of the analysed parameters to an endogenous oscillator might not be tight enough to be visualized or the oscillations could be hidden by further (clock-independent) signal transduction pathways. A more sensitive assay can possibly supply clearer results. However, barley grown under 2:2 hrs LD cycles showed a rhythm in accumulation of LHCII mRNA with a period of 4.4 hrs under free running conditions (DD). This suggests that possibly a not proven rhythm can be induced also with short cyclic temperature changes.

The range of the responses and the condition and duration of the temperature signal are still unclear in many details. However, the term „photomorphogenesis“ must be redefined. Individual plant species response very differently to temperature changes. The reasons are not known yet.

The data obtained so far add additional information to the hypothesis that the induced circadian rhythm might release the photomorphogenetic phenotype. It was shown that responses of the clock to temperature signals supply additional data about the environment to the plant. This can be useful for growth and development. The mechanisms by which light and temperature affect circadian rhythms are not enlightened. The existence of different signaling pathways seems likely. If the clock plays a decisive role in the development of photomorphogenesis, it could not be generally verified. Investigations of mutants of the internal clock will probably lead to a closer understanding.

Inhaltsangabe

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | PHOTOMORPHOGENESE - LICHT ALS AUSLÖSENDE REIZ | 1 |
| 1.2 | CIRCADIANE RHYTHMEN UND DIE ENDOGENE UHR | 2 |
| 1.3 | MODELL DER INNEREN UHR..... | 5 |
| 1.4 | DIE BEDEUTUNG DER ENDOGENEN UHR..... | 8 |
| 1.5 | TEMPERATUR ALS ZEITGEBER..... | 10 |
| 1.6 | AUFGABENSTELLUNG | 11 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 13 |
| 2.1 | MATERIAL..... | 13 |
| 2.1.1 | <i>Puffersysteme u. a. Lösungen</i> | 13 |
| 2.1.2 | <i>Antikörper und Antiseren</i> | 21 |
| 2.1.3 | <i>Pflanzenmaterial</i> | 21 |
| 2.2 | METHODEN | 23 |
| 2.2.1 | <i>Pflanzenanzucht</i> | 23 |
| 2.2.1.1 | Anzuchtbedingungen | 23 |
| 2.2.1.2 | Experimente zur Morphologie | 24 |
| 2.2.1.2.1 | Zyklischer Hitzeschock..... | 24 |
| 2.2.1.2.2 | Temperaturoszillationen | 25 |
| 2.2.1.3 | Experimente zur Rhythmik | 27 |
| 2.2.1.3.1 | Zyklischer Hitzeschock..... | 28 |
| 2.2.1.3.2 | Temperaturoszillationen | 29 |
| 2.2.1.3.3 | Licht/Dunkel-Wechsel | 30 |
| 2.3 | PIGMENTANALYSE | 31 |
| 2.3.1 | <i>Spektralphotometrische Chlorophyllanalyse</i> | 31 |
| 2.3.2 | <i>HPLC-Pigmentanalyse (modifiziert nach Norris et al., 1995)</i> | 32 |
| 2.3.3 | <i>Trockengewichtsanteile (in % Frischgewicht)</i> | 34 |
| 2.4 | MRNA-ANALYSE..... | 34 |
| 2.4.1 | <i>RNA-Isolierung</i> | 34 |
| 2.4.1.1 | Isolierung von Gesamt-RNA (modifiziert nach Barlow et al., 1963) | 34 |
| 2.4.1.2 | Isolierung von poly(A) ⁺ RNA (modifiziert nach Pemberton et al., 1975) | 35 |
| 2.4.2 | <i>Blotting-Methoden</i> | 36 |
| 2.4.2.1 | RNA „Dot-Blot“-Verfahren (modifiziert nach Thomas, 1980)..... | 36 |
| 2.4.2.2 | Northern Blot (modifiziert nach Kroczeck und Siebert, 1990)..... | 36 |
| 2.4.3 | <i>Radioaktive Markierung spezifischer cDNAs</i> | 37 |
| 2.4.4 | <i>Hybridisierung mit radioaktiver Sonde (Sambrook et al., 1989)</i> | 38 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.4.5 | <i>Quantifizierung der Hybridisierungssignale</i> | 39 |
| 2.4.6 | <i>Plasmidamplifikation</i> | 39 |
| 2.4.6.1 | Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen..... | 39 |
| 2.4.6.1.1 | Kalziumchlorid-Methode..... | 39 |
| 2.4.6.1.2 | Elektroporation | 40 |
| 2.4.6.2 | Präparation von Plasmiden | 41 |
| 2.4.6.2.1 | Minipräparation von Plasmiden (Maniatis <i>et al.</i> , 1982)..... | 41 |
| 2.4.6.2.2 | Maxipräparation von Plasmiden (Birnboim und Doly, 1979)..... | 42 |
| 2.4.6.2.3 | Restriktionsabbau klonierter Plasmid-DNA und DNA-Gelelektrophorese..... | 44 |
| 2.4.6.3 | Insert-DNA Präparation (Geneclean™)..... | 44 |
| 2.5 | PROTEIN-ANALYSE | 45 |
| 2.5.1 | <i>Proteinisolierung</i> | 45 |
| 2.5.1.1 | Isolierung von Membranproteinen..... | 45 |
| 2.5.1.2 | Isolierung von Gesamtprotein..... | 46 |
| 2.5.2 | <i>Quantifizierung der Proteine (modifiziert nach Lowry et al., 1951)</i> | 46 |
| 2.5.3 | <i>Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE, Laemmli, 1970)</i> | 46 |
| 2.5.4 | <i>Färbung von Polyacrylamidgelen</i> | 47 |
| 2.5.4.1 | Coomassie-Färbung von PAGE-Gelen | 47 |
| 2.5.4.2 | Silberfärbung von PAGE-Gelen (modifiziert nach Blum <i>et al.</i> , 1987)..... | 47 |
| 2.5.5 | <i>Western Blot (modifiziert nach Towbin et al., 1979)</i> | 48 |
| 2.6 | STATISTIK | 49 |
| 2.6.1 | <i>Kosinor-Analyse</i> | 49 |
| 2.6.2 | <i>t-Test</i> | 50 |
| 3 | ERGEBNISSE | 51 |
| 3.1 | OPTIMIERUNG UND AUFBAU DER VERWENDETEN TEMPERATURKAMMERN | 51 |
| 3.2 | MORPHOLOGIE..... | 55 |
| 3.2.1 | <i>Einfluss von Hitzeschockbehandlungen</i> | 55 |
| 3.2.2 | <i>Einfluss verschiedener Temperaturprogramme</i> | 59 |
| 3.3 | DER EINFLUSS VON HITZESCHOCKBEHANDLUNG AUF DIE CHLOROPHYLLAKKUMULATION..... | 65 |
| 3.4 | DER EINFLUSS VERSCHIEDENER TEMPERATURPROGRAMME | 66 |
| 3.4.1 | <i>Spektralphotometrische Chlorophyllanalyse</i> | 66 |
| 3.4.1.1 | Ergrünungskinetik..... | 66 |
| 3.4.1.2 | Chlorophyllakkumulation | 67 |
| 3.4.2 | <i>HPLC-Pigmentanalyse</i> | 73 |
| 3.4.3 | <i>mRNA-Akkumulation</i> | 75 |
| 3.4.3.1 | Vergleich der relativen mRNA-Mengen bei verschiedenen Wachstumsbedingungen..... | 81 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.4.4 | <i>Proteinakkumulation</i> | 83 |
| 3.4.4.1 | Vergleich der relativen Proteinmengen bei verschiedenen Wachstumsbedingungen | 86 |
| 4 | DISKUSSION | 89 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 107 |
| 6 | LITERATUR | 109 |

Symbole und Abkürzungen

| | |
|----------------|--|
| A | Amplitude oder Ampere |
| Abb. | Abbildung |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| B | Steigung der Kosinuskurve |
| BCIP | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>) |
| cAMP | zyklisches Adenosin-3',5-monophosphat |
| cDNA | copyDNA |
| cGMP | zyklisches Guanosin-3',5-monophosphat |
| Chl | Chlorophyll |
| cpm | Impulse pro Minute |
| d | Tag |
| D/D | Dauerdunkel |
| D1 | Reaktionszentrumsprotein des PSII |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | 1,4-Dithio-DL-threit(ol) |
| E | Extinktion |
| EDTA | Ethylendiaminotetraessigsäure |
| ELIP | frühes lichtinduzierbares Protein (<i>early light-inducible protein</i>) |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| F | Farad |
| FG | Frischgewicht |
| g | Erdbeschleunigung oder Gramm |
| h | Stunde |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeitschromatographie |
| HS | Hitzeschock |
| Hz | Hertz |
| IgG | Immunglobulin G |
| K/P-Verhältnis | Koleoptile-Primärblatt-Verhältnis |
| KF | Kopplungsfaktor der ATP-Synthetase |

| | |
|--------------------------|--|
| L/D | Licht-Dunkel-Wechsel |
| L/L | Dauerlicht |
| LDP | Langtagpflanze (<i>long day plant</i>) |
| LHC II | Chlorophyll a/b-bindendes Protein des Photosystems II |
| M | Mesor (mittlerer Wert der Kosinuskurve) |
| m | Meter |
| min | Minute |
| MOPS | Morpholinopropansulfonsäure |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure |
| n | Anzahl der Stichproben |
| NDP | Tagneutrale Pflanze (<i>neutral day plant</i>) |
| NBT | Nitroblue Tetrazolium |
| OD | optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PK | Plexiglaskammer |
| poly(A) ⁺ RNA | polyadenylierte Ribonukleinsäure |
| PRC | Phasenresponskurve (<i>phase response curve</i>) |
| PVDF | Poly-Vinylidendifluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| SDP | Kurztagpflanze (<i>short day plant</i>) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SER | Sprosselongationsrate |
| SSU | kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase |
| t | Zeit |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TG | Trockengewicht |
| Tris | Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volumen oder Volt |
| Vol. | Volumeneinheiten |

griechische Symbole

| | |
|---------------|--|
| Ω | Ohm |
| Φ | Acrophase (Phasenwinkel des maximalen Wertes der Kosinuskurve) |
| ε | Extinktionskoeffizient |
| λ | Wellenlänge |
| τ | Periode |

1 Einleitung

1.1 *Photomorphogenese - Licht als auslösender Reiz*

Die Embryonalentwicklung der Höheren Pflanzen ist durch Entwicklungshomöostasis gekennzeichnet. Diese Situation ändert sich grundlegend bei der Samenkeimung und der weiteren Entwicklung der Keimpflanze. Als einer der wichtigsten Umweltfaktoren übt Licht in dieser Entwicklungsphase einen spezifischen Einfluss auf die Ontogenie aus. Dabei vermitteln morphogenetisch wirksame Pigmentsysteme, die Photorezeptoren, zwischen externem *input* und einem lichtgesteuerten Entwicklungsprozess, der Photomorphogenese (Nagy und Schäfer, 2002). Als Photomorphogenese bezeichnet man alle lichtgesteuerten Wachstums- und Entwicklungsprozesse bei Pflanzen von der Keimung und Deetiolierung, über vegetative Anpassungen des Phänotyps und der Blühinduktion. Sie ist auf allen Organisationsstufen, vom sichtbaren Phänotyp bis zur Genexpression, zu beobachten. Bei Belichtung der Keimpflanze erfolgt eine Deetiolierung. Bis dahin im Dunkeln gewachsene Pflanzen zeigen eine schnelle Hypokotylstreckung, einen geschlossenen Hypokotylhaken, kleine Kotyledonen, wenig entwickelte Blattanlagen und eine leichte Gelbfärbung. Bei Wachstum im Licht erfolgt eine Hemmung der Hypokotylstreckung, eine Streckung des Hypokotylhakens, eine Ausbildung und Entfaltung der Kotyledonen und Laubblätter und eine Ergrünung (Cosgrove, 1994; Quail *et al.*, 1995). Auf zellulärem Niveau bedeutet das eine durch Licht induzierte Hemmung des Elongationswachstums der Zellen des Hypokotyls, eine Stimulierung der Zellexpansion in den Kotyledonen und Laubblättern sowie die Auslösung der Chloroplastendifferenzierung. Die Pflanze wechselt vom heterotrophen, von Reservestoffen abhängigen zum autotrophen, photosynthetischen Wachstum. Auf molekularem Niveau sind dabei zahlreiche Gene betroffen (McNellis und Deng, 1995).

Die an der Lichtwahrnehmung beteiligten Photorezeptoren werden in verschiedene Klassen eingeteilt. Die UVB-Photorezeptoren (Beggs und Wellmann, 1994) und die Phototropine PHOT1 und PHOT2 (Briggs *et al.*, 2001) sind für eine ganze Reihe spezifischer Reaktionen auf Blaulicht, wie z.B. Chloroplastenbewegung (Jarillo *et al.*, 2001) und lichtregulierte Ionenfluxe (Babourina *et al.*, 2002), verantwortlich. Die UVA-Photorezeptoren oder Cryptochrome CRY1 und CRY2 (Ahmad und Cashmore, 1993; Lin *et al.*, 1998) und die rot/dunkelrot reversiblen Phytochrome A bis E (Clack *et al.*, 1994; Sharrock und Quail, 1989) haben wichtige Funktionen u.a. für die Keimblatt- und Blattentwicklung, das Längenwachstum durch Regulierung der Zellteilung und Zellexpansion, für den Übergang

vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum (Batschauer, 1999; Cashmore *et al.*, 1999; Lin, 2000; Neff *et al.*, 2000). Für die Einleitung der Deetiolierung (Photomorphogenese) und des *Entrainments* der endogenen Uhr durch Licht werden ebenfalls Phytochrome und Cryptochrome benötigt (Casal, 2000; Devlin und Kay, 2001; Quail, 2002). Möglicherweise besteht zwischen beiden Prozessen ein kausaler Zusammenhang.

1.2 Circadiane Rhythmen und die endogene Uhr

Auf allen Organisationsebenen von Organismen werden Mechanismen entdeckt, die biologische Vorgänge zeitlich regeln und koordinieren. Das Spektrum biologischer Rhythmen reicht von hochfrequenten Oszillationen im Bereich von Millisekunden, wie bei der Generierung von Aktionspotentialen von Nervenzellen, bis zu mehrjährigen Populations- bzw. Blütezyklen (Engelmann, 1988). Nach ihrer zeitlichen Länge können ultradiane (Perioden unterhalb des circadianen Fensters), circadiane (Perioden von ca. 24 h), infradiane (Periode > 32 Stunden) und circannale Rhythmen (Jahresrhythmen) unterschieden werden. Diese Mechanismen optimaler zeitlicher Steuerung werden als endogene Uhren bezeichnet. Die metaphorische Bezeichnung „Uhr“ wurde für circadiane Rhythmen (= endogene Tagesrhythmen) hauptsächlich gewählt, weil dieser Mechanismus wie ein Uhrwerk weitere Funktionen rhythmisch steuert. Bei Tieren wurden zentrale Schrittmacher lokalisiert. Orte der circadianen Rhythmogenese sind bei Insekten hauptsächlich die lateral-ventralen Neuronen (Renn *et al.*, 1999), bei Vögeln u.a. das Pinealorgan (Gwinner und Brandstätter, 2001) und bei Säugetieren der *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) im Zwischenhirn (Moore und Eichler, 1972; Stephan und Zucker, 1972), die neben weiteren Strukturen Bestandteil der endogenen Uhr sind. Bei Pflanzen sind keine solchen zentralen Schrittmacher bekannt. Bei *Arabidopsis* und möglicherweise bei allen Höheren Pflanzen wird die Genexpression durch autonome circadiane Uhren gesteuert (Thain *et al.*, 2000). Da scheinbar kein zentraler Schrittmacher wie z.B. bei Vertebraten existiert, ist die zeitliche Abstimmung in Pflanzen möglicherweise weniger genau, dafür aber flexibler. Circadiane Rhythmen sind durch alle Taxa weit verbreitet. Sie sind endogen generiert, biochemischer, physiologischer oder verhaltensspezifischer Natur und an exogene Zeitgeber wie z.B. Licht und Temperatur gekoppelt, bei deren Abwesenheit ein spontaner, sog. *free running* Rhythmus mit einer definierten Periode τ eintritt (Aschoff, 1960). Bei Pflanzen sind z.B. die Stomataöffnung, die Blattbewegung und die Photosynthese circadian reguliert (McClung, 2001; Barak *et al.*,

2000). Die Uhr steuert neben makroskopisch sichtbaren Prozessen auch die Aktivität bestimmter Gene (Kloppstech, 1985), d.h., die Menge an Transkripten schwankt periodisch im Tagesverlauf.

Ein Rhythmus kann durch vier Parameter definiert werden. Die Periode τ gibt die Zeit an, die für einen kompletten Zyklus benötigt wird, der Mesor gibt den Durchschnitt aller Werte innerhalb eines Zyklus an und die Amplitude bezeichnet die maximale Abweichung des Rhythmus vom Mesor (Abb. 1). Die Phase schließlich gibt das *timing* des Rhythmus in Referenz zu einem externen Standard wieder. Die „*steady-state*“ Synchronisierung zwischen endogenem und exogenem Rhythmus des Zeitgebers wird durch einen täglichen Phasenverschub (*phase shift*, Acrophase, Abb. 1) erreicht (Pittendrigh und Minis, 1964).

Die wesentlichen Kriterien für einen circadianen Rhythmus sind folgende:

- Der Rhythmus muss ohne externen Zeitgeber unter konstanten Bedingungen beibehalten werden (*free-running*).

Obwohl endogene Rhythmen ohne exogene periodisch wechselnde Einflüsse persistieren (Aschoff, 1960), kann es z.B. bei photosynthetisch aktiven Organismen besonders unter Dauerdunkel (D/D) oft zum (sofortigen) Verlust der Rhythmik kommen (Johnson, 2001). Oszillationen von nur wenigen bei Pflanzen entdeckten circadian regulierten Genen werden dagegen auch im Dauerlicht (L/L) unterdrückt. Sage-Ono *et al.* (1998) isolierten aus der Kurztagpflanze *Pharbitis nil* ein solches Transkript (*PnC401*), das circadian in der Dunkelphase maximal akkumuliert und zu Beginn der Lichtphase sein Akkumulationsminimum aufweist. Die mRNA wird über die Phytochromaktivität reguliert. Zheng *et al.* (1998) wiesen ebenfalls bei *Pharbitis nil* für die circadian oszillierende mRNA von PNZIP, ein Protein mit einem *leucine zipper motif*, eine ähnliches Rhythmikverhalten mit Phytochromregulierung nach. Eine solche Arrhythmie bedeutet allerdings nicht unbedingt den Stillstand des endogenen Rhythmus (Njus *et al.*, 1977; Pangerl *et al.*, 1990). Möglich wären auch eine Desynchronisation normalerweise gekoppelter Schrittmacher (Pittendrigh, 1974) oder eine Entkopplung des untersuchten Parameters von der endogenen Uhr (Honma *et al.*, 1996).

- Ein circadianer Rhythmus ist temperaturkompensiert. Die Periode (τ) bleibt über einen weiten Temperaturbereich annähernd konstant (Pittendrigh, 1954).

Die Geschwindigkeit der meisten biochemischen Reaktionen steigt bei einer Temperaturerhöhung von 10°C um den Faktor 2 bis 3 ($Q_{10}=2-3$). Bei circadianen Rhythmen ändert sich die Reaktionsgeschwindigkeit und damit die Frequenz dagegen kaum. Somers *et*

al. (1998) zeigten z.B. bei *A. thaliana*, dass *CAB:LUC* Rhythmen bei höherer Temperatur nur mit geringfügig kürzeren Perioden oszillierten ($Q_{10}=1,0-1,1$).

Die genannten Merkmale garantieren auf der einen Seite die Stabilität und Verlässlichkeit der Uhr und die relative Unabhängigkeit freilaufender Rhythmen von externen Faktoren (Engelmann, 1988). Auf der anderen Seite muss die Uhr auf solche Änderungen in der Umwelt reagieren können und die endogene Zeit und Ortszeit angleichen (*phase resetting*).

- Der Rhythmus muss mit einem exogenen Rhythmus der Umwelt synchronisiert werden können (*Entrainment*).

Dazu geeignete Signale werden Zeitgeber genannt und können u.a. Änderungen des Lichtes (Quantität, Qualität), der Temperatur und der Nährstoffverfügbarkeit sein (Gooch *et al.*, 1994; Roenneberg und Rehmann, 1996). Je nach Zeitpunkt und Dauer bzw. Intensität von Zeitgeberpulsen kann die Phase eines circadianen Rhythmus verschoben werden (*phase shift*). Sugiyama *et al.* (2001) erreichten bei transgenen Reiskeimlingen ein *resetting* durch Applikation eines kurzen Lichtpulses zu Beginn der Nachtphase, d.h. die Phase des Rhythmus wurde in die Tagphase zurück versetzt. Entsprechend kann durch vorzeitiges Licht am Ende der Dunkelphase die Uhr vorgestellt werden. In Abhängigkeit von der Phasendifferenz benötigt eine Phasenverschiebung ggf. auch mehrere Zyklen bis zur vollständigen Synchronisation. Das Ausmaß einer Phasenverschiebung wird in sog. Phasenresponskurven (PRC) dargestellt. Eine Änderung der Periodenlänge kann dabei nur bis zu einem bestimmten Grad erfolgen (Mitnahmebereich). Beim Überschreiten dieses Bereichs kann der circadiane Oszillator nicht mehr folgen und der Organismus wird arhythmisch.

Der fundamentale Mechanismus der Rhythmusgenerierung läuft zellautonom ab (Dunlap, 1999). Erstmals konnten bei Höheren Pflanzen (*A. thaliana*) in einer Zelllinie (T87) diurnale und circadiane Rhythmen in konstanter Dunkelheit in einer Reihe von Genen, darunter *CCA1* (*circadian clock associated 1*), *LHY* (*late elongated hypocotyl*) und *CCR2* (*cold circadian rhythm RNA binding 2*) nachgewiesen werden (Nakamichi *et al.*, 2003).

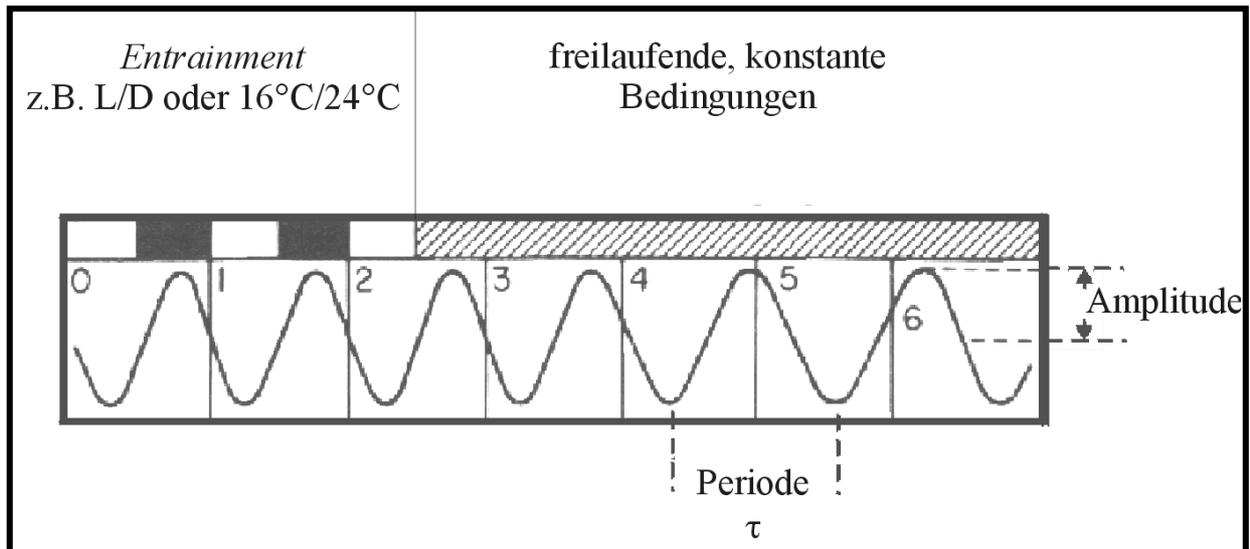


Abb. 1: Charakteristika circadianer Rhythmen. Die Abbildung zeigt einen idealisierten Rhythmus während des *Entrainments* (weiße und schwarze Balken) und während freilaufender, konstanter Bedingungen (gestrichelter Balken). In diesem Beispiel ist die freilaufende Periode länger, als die Periode während des *Entrainments*. Solange z.B. L/D-Zyklen vorgegeben werden, ist die Periode des Oszillators mit der Periode der vorgegebenen Rhythmik identisch (tägliches *resetting*). Während der freilaufenden Bedingungen verschiebt sich die Periode des Oszillators hin zu seiner endogenen Periode und der *Maximum-peak* entfernt sich von der Mitte z.B. der „subjektiven“ Dunkelheit.

1.3 Modell der Inneren Uhr

Die Identifikationen von Rhythmusmutanten bei *Drosophila* (*period*) und *Neurospora* (*frequency*) deckten die genetische Grundlage der Inneren Uhr auf (Konopka und Benzer, 1971; Feldman und Hoyle, 1973). Mittlerweile wurden auch in weiteren Organismen eine Reihe von Genen entdeckt, die Komponenten der Uhr darstellen oder direkt oder indirekt mit dem circadianen Oszillator in Verbindung stehen. Ein Modell der Inneren Uhr zeigt Abb. 2. Es besteht aus einem endogenen Schrittmacher, der den Rhythmus generiert, und über ein *input* System zur Synchronisation der endogenen Zyklen mit der Umwelt verbunden ist. Der exogene Stimulus, der die Synchronisation ermöglicht, wird als Zeitgeber bezeichnet. Ein *output* System setzt den synchronisierten Rhythmus des Schrittmachers um (Takahashi und Zatz, 1982; Wollnik, 1992).

Der bisher am besten untersuchte Zeitgeber bei pflanzlichen als auch tierischen Organismen ist Licht. Tiere haben in der Regel mehrere Photorezeptoren, die einen circadianen *input* liefern. Bei *Drosophila* befinden sich Cryptochrome in den Schrittmacherzellen. Darüber hinaus werden über das Komplexauge und über eine extraokulare Photorezeption Lichtreize weitergeleitet (Helfrich-Forster *et al.*, 2001). Bei Säugetieren übernehmen Opsine im Auge und Cryptochrome diese Aufgaben (Selby *et al.*, 2000) Letztere scheinen auch gleichzeitig

Teil des Oszillators selbst zu sein (van der Horst *et al.*, 1999). Bei Pflanzen wird die Synchronisation über Phytochrome und Cryptochrome vermittelt. McClung (2001) zeigte bei *Arabidopsis*, dass das Cryptochrom zudem rhythmisch exprimiert wird und so die Uhr ihre Empfindlichkeit gegenüber Lichtreize selbst regulieren kann.

Die Periodik von ca. 24 Stunden wird bei bisher allen vom Mechanismus her bekannten circadianen Uhren (Cyanobakterien, *Neurospora*, *Drosophila*, Maus) durch die Aktivierung ein oder mehrerer Gene („Urgene“, z.B. *PER* und *TIM* bei *Drosophila*) durch positiv wirkende Transkriptionsfaktoren (z.B. *CLK* bei *Drosophila*) zu einer bestimmten Zeit erzeugt. Die „Uhrproteine“ (*PER* und *TIM*) inhibieren mit einer gewissen Zeitverzögerung wiederum ihre eigenen Gene. Nach dem Abbau der „Uhrproteine“ kann ein neuer Zyklus entstehen. Bei *Arabidopsis* bilden wahrscheinlich *TOC1* (*timing of CAB expression 1*) und *CCA1/LHY* (*circadian clock associated 1 / late elongated hypocotyl*) die Elemente einer solchen Rückkopplungsschleife. Young und Kay (2001) schlagen ein Modell vor, in dem die beiden Transkriptionsfaktoren *CCA1* und *LHY* direkt an den Promotor von *TOC1* binden und dessen Transkription reprimieren. *TOC1* wirkt wiederum über einen noch unbekanntem Mechanismus positiv auf die Transkription von *CCA1* und *LHY*.

Dieses sehr vereinfachte Rückkopplungsschema lässt unberücksichtigt, dass *input* Komponenten wie Photorezeptoren ebenso als *output* Komponenten fungieren (Bognar *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 1998) und *outputs* wiederum über *feedback loops* die Uhr selbst beeinflussen (Lopez-Molina *et al.*, 1997). Zudem scheint es so, dass in Pflanzen wie auch anderen Organismen multiple circadiane Uhren sowohl in unterschiedlichen Geweben, als wahrscheinlich auch in individuellen Zellen existieren (Roenneberg und Mellow, 1998). Dies lässt einen hohen Grad an Komplexität mit einem hohen Potential für Interaktionen zwischen diesen multiplen Oszillatoren erwarten. Die Ausgangsseite des Oszillators ist schließlich für die Vermittlung der endogenen Schwingung zur Ausprägung eines circadianen Ereignisses verantwortlich. Die Genexpression wird in allen eukaryontischen Organismen auf alternativ unterschiedlichen Ebenen circadian transkriptional, posttranskriptional, translational und auch posttranslational reguliert. Mit Hilfe der differentiellen Genexpression konnten beispielsweise bei *Arabidopsis* zahlreiche Gene identifiziert werden, die circadian transkribiert werden (Harmer *et al.*, 2000). Mittag *et al.* (1994) zeigten, dass bei *Gonyaulax* das rhythmische Leuchten u.a. über die circadiane Kontrolle der Translation des Luziferinbindeproteins gesteuert wird. Posttranskriptionale Mechanismen sind *RNA-splicing* und *RNA-Stabilisierung* (Pilgrim *et al.*, 1993; Majercak *et al.*, 1999) und translationale Kontrolle zeigten z.B. Lee *et al.* (2000) und Kume *et al.* (1999) bei *WC-1* und *mCRY2* in *Neurospora*

und Maus. Als posttranslationale Modifikationen kommen Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung, die schon bei den Oszillatorkomponenten (FRQ, PER, TIM) selbst eine Rolle spielen, in Betracht (Liu *et al.*, 2000; Nishiwaki *et al.*, 2000). Bei *Kalanchoë* wird z.B. die Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPc) durch diesen Mechanismus circadian reguliert (Wilkins, 1992). Die Einschleusung von Proteinen in den Zellkern (Luo *et al.*, 1998) und die Proteolyse (Kloss *et al.*, 1998; Deshaies und Meyerowitz, 2000) sind weitere posttranslationale Regulierungsmöglichkeiten. Die Rhythmik kann allerdings auch komplexer über mehrere dieser Kontrollstellen vermittelt werden. Die Uhrproteine FRQ und TIM werden beispielsweise über die Transkription ihrer Gene, ihre differentiell initiierte Translation und Proteinphosphorylierung reguliert (Dunlap, 1999).

Die Mechanismen, die den endogenen Jahresuhren (z.B. Winterruhe bei Tieren; Körtner und Geiser, 2000) oder den ultradianen Uhren (z.B. ultradiane Blattbewegungen; Engelmann und Antkowiak, 1998) zugrunde liegen, sind bisher unbekannt.

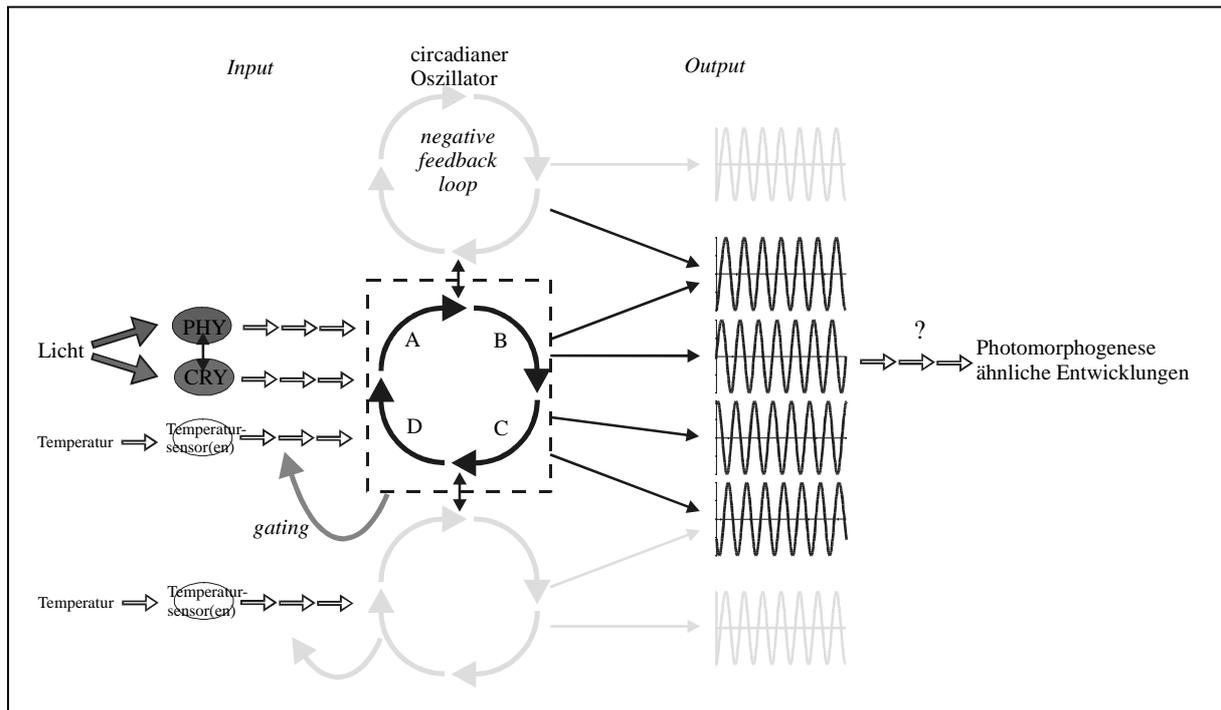


Abb. 2: Vereinfachtes (lineares) Modell eines einfachen circadianen Systems bestehend aus *input* Stoffwechselwegen (*Entrainment*), circadianen Oszillatoren und *output* Stoffwechselwegen. Das *Entrainment* erfolgt u.a. durch über Phytochrome (PHY) und Cryptochrome (CRY) vermittelte Lichtreize oder über (bisher hypothetische) Temperatursensoren vermittelte Temperatursignale. Im Falle der Lichtreizung interagieren viele PHY und CRY und durch sie eingeleitete Signalkaskaden (*downstream signaling pathways*) miteinander. Wechselwirkungen zwischen den Komponenten eines zentralen Oszillators (A, B, C, D, z.B. Gen, Transkript, Protein, modifiziertes Protein) erzeugen eine negative, rückgekoppelte Autoregulation (*negative feedback loop*), aus der eine ca. 24-stündige, sich selbst erhaltende Oszillation resultiert. Die Doppelpfeile weisen auf mögliche Kopplungen zwischen den Oszillatoren hin. Oszillatoren könnten zueinander phasenverschobene Rhythmen erzeugen. Einige Rhythmen könnten von einem einzelnen Oszillator, andere durch Interaktion mehrerer Oszillatoren entstehen. Möglicherweise synchronisieren Licht und Temperatur unterschiedliche Oszillatoren (Roenneberg und Merrow, 2000). Ob solche Rhythmen Photomorphogenese ähnliche Entwicklungen induzieren können, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.4 Die Bedeutung der endogenen Uhr

Die Phylogenie biologischer Rhythmen ist nicht sicher geklärt. Viele Aspekte zellulärer und allgemeiner Physiologie erfolgen oszillatorisch. Sie reichen von hochfrequenten Oszillationen (Nervenaktivität, Enzymsysteme), über Periodenlängen von Stunden und Tagen (z.B. Zellzyklen), bis zu Lebenszyklen. Die ursprüngliche Bedeutung von circadianen Rhythmen lag nach Pittendrigh (1966) möglicherweise darin, das Replizieren der genetischen Information in eukaryontischen Zellen zur Vermeidung von Schäden durch die UV-Strahlung

ausschließlich in der Dunkelheit ablaufen zu lassen. Daneben könnte ein Selektivdruck die Evolution eines Systems zur optimalen Lichtausbeute vorangetrieben haben. Prozesse, die unmittelbar auf L/D- und Temperaturübergänge reagieren, wie die, die zur Expression von durch Licht, Dunkelheit, oder Temperatur regulierter Gene führen, könnten sich weiter entwickelt und so aus den Signaltransduktionswegen vom Rezeptor bis zum regulierten Gen circadiane Oszillatoren entwickelt haben. Diese circadianen Oszillationen ermöglichten zunächst eine optimalere Anpassung an den Wechsel von Umweltbedingungen und schließlich eine zeitliche Programmierung von verschiedenen Stoffwechsellleistungen innerhalb des täglichen Kreislaufs ermöglichten. Möglicherweise waren Oszillationen also anfänglich „Hilfsmittel“ zur temporären Organisation von Zellen, bevor sie schließlich zur photoperiodischen Zeitmessung und zu Schrittmachern (*pacemaker*) wurden.

Eine wesentliche Bedeutung der circadianen Uhr liegt offenbar in der Optimierung der Anpassung eines Organismus an seine tagesperiodische Umwelt. Die zeitliche Organisation durch die Innere Uhr ermöglicht es Organismen, für die zu einer bestimmten Tageszeit mit der höchsten Wahrscheinlichkeit vorherrschenden Bedingungen gerüstet zu sein und auf diese Weise einen adaptiven Vorteil zu erzielen (Ouyang *et al.*, 1998). Unvereinbare physiologische Vorgänge, wie Stickstofffixierung und Photosynthese bei Cyanobakterien (Mitsui *et al.*, 1986), können zeitlich getrennt und die Übergänge effektiv koordiniert werden. Ouyang *et al.* (1998) testeten an Cyanobakterien, die unterschiedliche circadiane Perioden besitzen, die adaptive Signifikanz circadianer Programme, indem sie die relative Fitness unter Konkurrenzbedingungen analysierten. Die Stämme wurden zusammen in L/D-Zyklen mit variierenden Frequenzen kultiviert, und es konnte gezeigt werden, dass der Stamm sich am stärksten vermehrte und durchsetzte, dessen endogene Periodenlänge den externen Tageslängen jeweils am nächsten kam (Selektion). In der Monokultur waren dagegen die Wachstumsraten unter verschiedenen Tageslängen nahezu identisch. Die adaptiven Vorteile am Beispiel höherer Pflanzen zeigten Green *et al.* (2002) an verschiedenen Rhythmusmutanten von *Arabidopsis* (CCA1-ox, LHY-ox, *elf3*). Pflanzen, die sich aufgrund ihres nicht funktionierenden circadianen Systems nicht rechtzeitig auf die folgende Lichtphase vorbereiten konnten, erfahren besonders unter limitierenden Lichtbedingungen (Kurztag) entscheidende Nachteile gegenüber dem Wildtyp.

Ein weiterer selektiver Vorteil besteht offensichtlich in der Fähigkeit, die Tageslängen zu messen. Damit ist für die Organismen die Möglichkeit gegeben, sich rechtzeitig auf den Wechsel der Jahreszeiten vorzubereiten (Thomas, 1998). Über diesen Photoperiodismus werden in vielen Organismen die Reproduktion und die Blütezeit bei Pflanzen kontrolliert

(Thomas und Vince-Prue, 1997). Beispielsweise wird bei Pflanzen, die in höheren Breitengraden heimisch sind (z.B. *Arabidopsis*), die Blütenbildung durch lange Tage induziert. Sie blühen und bilden Samen, bevor der Winter einsetzt. Zudem wird durch die photoperiodische Kontrolle sichergestellt, dass alle Pflanzen einer Population nahezu gleichzeitig blühen und damit die Möglichkeit der erfolgreichen Pollenübertragung ansteigt. Es ist noch nicht geklärt, wie die Messung der Zeitdauer zustande kommt. Die Anzahl der Schwingungen könnte z.B. über die Akkumulation einer Substanz bei jeder Schwingung registriert werden.

1.5 Temperatur als Zeitgeber

Licht ist zwar der am besten charakterisierte Zeitgeber, aber, obwohl der circadiane Uhrmechanismus Temperatur kompensiert ist, kann er auch äußerst sensitiv auf Temperaturänderungen reagieren (Bünning, 1973). Bei Insekten, Eidechsen und Pilzen konnte ein *Entrainment* mit Temperaturosillationen von nur 1°C bis 2°C nachgewiesen werden (Harlow *et al.*, 1976; Underwood und Calaban, 1987; Wheeler *et al.*, 1993). Die Zellteilung bei *Euglena* kann durch Temperaturzyklen von 7°C Differenz synchronisiert werden (Terry und Edmunds, 1970). Bei *Synechococcus* können durch periodische Temperaturwechsel von nur 5°C circadiane Rhythmen in der Aktivität der Nitrogenase als auch der Proteinsynthese induziert werden (Lin *et al.*, 1999) und bei *Oedogonium* erfolgt ein *Entrainment* unter Temperaturdifferenzen von 2,5°C (Bühnemann, 1955). In höheren Pflanzen wurden bereits sehr früh Temperatur induzierte circadiane Rhythmen entdeckt. Stern und Bünning (1929) wiesen einen solchen Einfluss auf die tagesperiodischen Bewegungen von *Phaseolus multiflorus* nach. Oltmanns (1960) erzeugte bei *Kalanchoë* durch Temperaturwechsel von nur 1°C diurnale Petalenbewegungen. Bereits kurze Temperaturpulse von 30 Minuten von 15°C auf 35°C induzieren circadiane Rhythmen im CO₂-Stoffwechsel von *Bryophyllum fedtschenkoi* (Wilkins, 1983). Beator und Kloppstech (1993) wiesen eine circadiane Kontrolle der Ergrünungsfähigkeit etiolierter Pflanzen nach einem einstündigen Hitzeschock von 42°C nach.

Durch Temperaturpulse verursachte PRCs wurden für viele Pflanzen erzeugt (Johnson, 2000) und bei Kälte empfindlichen Pflanzen wie der Tomate scheinen Kältepulse die Uhr augenblicklich anzuhalten (Martino-Catt und Ort, 1992; Jones *et al.*, 1998). Trotz dieser Sensitivität gegenüber Temperaturänderungen in der Umwelt erzeugt der Übergang von der

Stratifikation bei 4°C zum Wachstum bei 22°C keine Phasenverschiebung in *Arabidopsis* (Zhong *et al.*, 1998). Scheinbar existiert bei sehr jungen Keimpflanzen eine Refraktionsphase, innerhalb derer Temperatur nicht als Zeitgeber wirken kann. Entsprechend zeigten Kolar *et al.* (1998), dass Tabakkeimlinge in einer sehr frühen Phase nicht auf Lichtpulse reagieren, die die Uhr bei etwas älteren Keimpflanzen wiederum stellen. Während Hennessey und Field (1991) zeigten, dass Licht ein effektiverer Zeitgeber bei der Synchronisation stomatärer Rhythmen als Temperatur ist, wurde bei der rhythmischen Ethylenentwicklung bei *Sorghum* (Finlayson *et al.*, 1998) und bei *Neurospora* (Liu *et al.*, 1998) nachgewiesen, dass Temperatur der dominanterer Zeitgeber ist. Auch bei der circadian regulierten Phototaxis von *Euglena* dominiert nicht Licht als Zeitgeber über die Temperatur, sondern die Phase wird bei gleichzeitig einwirkenden Temperatur- ($\Delta t = 13^\circ\text{C}$) und L/D-Wechseln von beiden Zeitgebern beeinflusst (Bruce, 1960). Während Temperatureffekte auf das circadiane System von *Neurospora* in Einzelheiten beschrieben wurden (Nakashima, 1986; Nakashima und Hastings, 1989; Gooch *et al.*, 1994; Liu *et al.*; 1998; Liu, 2003), ist bisher nicht geklärt, durch welche Mechanismen ein eukaryotischer Oszillator durch Temperaturänderungen gestellt werden kann.

Entrainment durch Temperaturänderungen wurde bei Untersuchungen von Mutationen angewendet, um ihre Bedeutung innerhalb des circadianen Systems zu bestimmen. So zeigten Merrow *et al.* (1999), dass die *frq* Nullmutante von *Neurospora crassa* unter konstanten Bedingungen arrhythmisch ist und nicht durch L/D-Zyklen, wohl aber durch Temperaturzyklen synchronisiert werden kann. Scheinbar ist *frq* eine essentielle Komponente für die Kopplung des Lichtsignals mit der Uhr, während ein anderer *frq*-unabhängiger Oszillator verantwortlich für die durch Temperatur erzeugten Rhythmen ist (Loros und Feldman, 1986). Ähnliches konnte für die *elf3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden (McWatters *et al.*, 2000). Die Mutante *elf3* scheint ebenfalls spezifisch bei *input*-Stoffwechselwegen nach Lichtrezeption mitzuwirken.

1.6 Aufgabenstellung

Umweltsignale bestimmen wesentlich die Morphologie und den Stoffwechsel von Pflanzen. Die ganze Bandbreite an möglichen Signalen, auf die die Pflanze reagiert, ist noch nicht untersucht. Bei vielen im Dunkeln wachsenden Pflanzen wurde durch die Applikation von zyklischem Hitzeschock eine morphologische Abweichung vom *Etiollement* erzielt, die einer

Photomorphogenese ähnelt (Kloppstech *et al.*, 1991; Beator *et al.*, 1992) und abhängig von der Spezies mehr oder weniger stark ausgeprägt ist. Verschiedene Pflanzen entwickeln außerdem circadiane Oszillationen auf Pigment-, Protein- und mRNA-Ebene. Alle im Dunkeln angezogenen Pflanzen zeigen weder Photomorphogenese noch circadiane Oszillationen, obwohl nicht auszuschließen ist, dass ein zentraler Oszillator schwingt, aber keine Synchronisation der Rhythmik erfolgte.

Ziel dieser Arbeit ist es zu klären, ob es durch an die Innere Uhr gekoppelte Genexpression zu definierten Wachstumsformen kommt, die bisher als Photomorphogenese beschrieben wurden, oder ob andererseits Bedingungen zu finden sind, die keine Oszillationen und damit auch keine Photomorphogenese erkennen lassen. Dazu wurden morphologische und molekulare Wirkungen bei Pflanzen untersucht, die moderaten, rhythmischen Temperaturschwankungen ausgesetzt wurden.

In ersten Experimenten wurde geprüft, inwieweit sich durch Hitzeschockbehandlungen morphologische Variationen induzieren lassen. Arten, die eindeutige Reaktionen zeigten, wurden in folgenden Versuchen unter verschiedenen Temperaturprogrammen angezogen, die teils so gewählt werden sollten, dass die biologische Uhr dem exogenen Rhythmus nicht mehr folgen könnte. Gorton *et al.* (1993) zeigten, dass Pflanzen unter einem zweistündigen L/D-Wechsel einen freilaufenden Rhythmus beibehalten. Daher wurde zunächst ein Temperaturprogramm mit einer Phasenlänge von 4 Stunden gewählt (2h/2h = niedere Temperatur/höhere Temperatur). Als Vergleich dienten Pflanzen, die unter einem 12h/12h-Temperaturwechsel gewachsen sind, bei denen wir eine Synchronisation der circadianen Komponenten erwarteten, und schließlich unter konstanten Temperaturen gewachsene etiolierte Pflanzen, die im Falle einer Kopplung der endogenen Uhr keine Oszillationen zeigen sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffersysteme u. a. Lösungen

Isolierung von Gesamt-RNA

Lysispuffer

| | |
|----------------------------|----------|
| Tris/HCl, pH 8 | 100 mM |
| Na ₂ EDTA, pH 8 | 10 mM |
| NaCl | 600 mM |
| SDS | 4% (w/v) |

PCI

| | |
|----------------|---------|
| Phenol | 25 Vol. |
| Chloroform | 24 Vol. |
| Isoamylalkohol | 1 Vol. |

Isolierung von poly(A)⁺ RNA

Lysispuffer

| | |
|----------------------------|----------|
| Tris/HCl, pH 9,5 | 50 mM |
| Na ₂ EDTA, pH 8 | 10 mM |
| NaCl | 100 mM |
| SDS | 3% (w/v) |

Bindungspuffer

| | |
|----------------------------|------------|
| Tris/HCl, pH 7,5 | 10 mM |
| NaCl | 400 mM |
| Na ₂ EDTA, pH 8 | 1 mM |
| SDS | 0,2% (w/v) |

Säulenpuffer

| | |
|----------------------------|------------|
| Tris/HCl, pH 7,5 | 10 mM |
| NaCl | 100 mM |
| Na ₂ EDTA, pH 8 | 1 mM |
| SDS | 0,2% (w/v) |

Elutionspuffer

| | |
|----------------------------|-------|
| Tris/HCl, pH 7,5 | 10 mM |
| Na ₂ EDTA, pH 8 | 1 mM |

Blotting20 x SSC (pH 7)

| | |
|--------------------------------|-------|
| NaCl | 3,0 M |
| Na-Citrat · 2 H ₂ O | 0,3 M |

10 x MOPS (Gelpuffer)

| | |
|----------------------|--------|
| MOPS, pH 7 | 0,20 M |
| Na-Acetat | 0,05 M |
| Na ₂ EDTA | 0,01 M |

6 x Auftragspuffer

| | |
|------------------------------|-------|
| Bromphenolblau | 0,25% |
| Xylencyanol | 0,25% |
| Glycerin | 50% |
| Na ₂ EDTA, pH 8,0 | 1 mM |

Probenpuffer

| | |
|-------------|-----------|
| 1 x MOPS | |
| Formamid | 50% (v/v) |
| Formaldehyd | 18% (v/v) |

Northern-Mix:

| | |
|-------------------------------|-------|
| Probenpuffer | 5 mL |
| 6 x Auftragspuffer | 1 mL |
| EtBr (5 mg·mL ⁻¹) | 40 µL |

Radioaktive Markierung spezifischer cDNAs und HybridisierungTE-Puffer

| | |
|----------------------------|-------|
| Tris/HCl, pH 8 | 10 mM |
| Na ₂ EDTA, pH 8 | 1 mM |

50 x Denhardt's Lösung

| | |
|---------------------|----------|
| Ficoll | 1% (w/v) |
| Rinderserumalbumin | 1% (w/v) |
| Polyvinylpyrrolidon | 1% (w/v) |

Hybridisierungslösung

| | |
|------------------------|-------------------------|
| Formamid | 50% (v/v) |
| 20 x SSC | 25% (v/v) |
| SDS | 1% (w/v) |
| 50 x Denhardt's Lösung | 5% (v/v) |
| Lachssperma-DNA | 100 µg·mL ⁻¹ |

Die Lachssperma-DNA wurde bei 50°C-60°C in ddH₂O unter gelegentlichem Schütteln zu einer Endkonzentration von 10 mg·mL⁻¹ (w/v) gelöst und durch Ultraschall fragmentiert.

Die warme Lösung wurde aliquotiert, 10 min gekocht und auf Eis abgekühlt. Die DNA kann bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden. Vor Benutzung wurde die DNA nochmals 10 min bei 95°C-100°C denaturiert.

Herstellung und Transformation kompetenter BakterienzellenAntibiotikallösungen

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| Tetracyclinlösung | 50 mg·mL ⁻¹ (in EtOH) |
|-------------------|----------------------------------|

CaCl₂/Tris-Lösung (pH 8):

| | |
|-------------------|-------|
| CaCl ₂ | 50 mM |
| Tris | 10 mM |

Einfrierlösung:

| | |
|--------------------------------|--------|
| CaCl ₂ /Tris-Lösung | 5,6 mL |
| Glyzerin | 1 mL |

LB-Medium:

| | |
|---------------------------------|------|
| Bacto-Trypton | 10 g |
| Hefe-Extrakt | 10 g |
| NaCl | 10 g |
| in 1 L ddH ₂ O lösen | |

LB-Agarplatten:

| | |
|---|----------------|
| LB-Medium | 500 mL |
| Bacto-Agar | 7,5 g (1,5%ig) |
| Tetracyclinlösung (50 mg·mL ⁻¹) | 0,5 mL |

Plasmidpräparation:GTE-Lösung (pH 8):

| | |
|--------------------|-------|
| Glucose-Monohydrat | 50 mM |
| EDTA | 10 mM |
| Tris | 25 mM |

Lysozym-Stammlösung:

| | |
|------------------|-----------------------|
| Minipräparation: | 40 mg Lysozym/mL GTE |
| Maxipräparation: | 120 mg Lysozym/mL GTE |

| | |
|-----------------------------|-----|
| Natriumacetatlösung, pH 4,8 | 3 M |
|-----------------------------|-----|

TE-Lösung (pH 7):

| | |
|------|-------|
| Tris | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

| | |
|-----------------|------------------------|
| Proteinkinase K | 10 mg·mL ⁻¹ |
|-----------------|------------------------|

Farbmarker:

| | |
|----------------|------|
| Glyzerin | 50% |
| EDTA | 1 nM |
| Bromphenolblau | 0,4% |
| Xylencyanol | 0,4% |

5 x TBE-Puffer (pH 8):

| | |
|----------|-------|
| Tris | 89 mM |
| Borsäure | 89 mM |
| EDTA | 20 mM |

Proteinisolierung1 x reduzierender Probenpuffer:

| | |
|----------------------|-------------|
| Tris/HCl, pH 6,8 | 12,5 mM |
| SDS | 1% (w/v) |
| Na ₂ EDTA | 0,08 mM |
| Saccharose | 12% (w/v) |
| Bromphenolblau | 0,01% (w/v) |
| DTT | 26 mM |

Extraktionspuffer:

| | |
|-------------------|-------|
| Tris/HCl, pH 8 | 50 mM |
| MgCl ₂ | 1 mM |

Quantifizierung der Proteine (modifiziert nach Lowry *et al.*, 1951)Lösung I:

| | |
|---------------------------------|--------|
| Na ₂ CO ₃ | 10 g |
| Na ₂ -tartrat | 100 mg |

in 500 mL 0,1 M NaOH lösen

Lösung II:

| | |
|---------------------------------------|--------|
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 500 mg |
| in 100 mL ddH ₂ O lösen | |

Lösung III:

| | |
|-----------------------|---------|
| Lösung I | 49 Vol. |
| Lösung II | 1 Vol. |
| vor Gebrauch ansetzen | |

Lösung IV:

| | |
|-------------------------------|--------|
| Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz | 1 Vol. |
| ddH ₂ O | 1 Vol. |
| vor Gebrauch ansetzen | |

Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)Laemmli-Gel (Volumina für 4 Gele, 15%ig):

| | |
|--|----------|
| Acrylamid (30%)/N,N-Methylen-Bisacrylamid (0,8%) | 12,5 mL |
| Tris/HCL (3 M, pH 8,8) | 3,125 mL |
| ddH ₂ O | 9,125 mL |
| SDS (10%) | 0,25 mL |
| APS (10%) | 200 µL |
| TEMED | 20 µL |

Laemmli-Sammelgel (3,5%ig):Vorlösung:

| | |
|--|-------|
| Acrylamid (30%)/N,N-Methylen-Bisacrylamid (0,8%) | 25 mL |
| Tris/HCL (0,5 M, pH 6,8) | 38 mL |
| ddH ₂ O | 78 mL |

Sammelgel (Volumina für 4 Gele):

| | |
|-----------|-------|
| Vorlösung | 4 mL |
| SDS (10%) | 40 µL |
| APS (10%) | 40 µL |
| TEMED | 4 µL |

5 x Laemmli-Puffer:

| | |
|--------|------|
| Glyzin | 72 g |
| Tris | 15 g |
| SDS | 0,1% |

mit ddH₂O auf 1 L auffüllen

1 x Laemmli-Laufpuffer:

| | |
|--------------------|-------|
| 5 x Laemmli-Puffer | 80 mL |
| SDS (10%) | 4 mL |

mit ddH₂O auf 400 mL auffüllen

Färbung von PolyacrylamidgelenCoomassie-Färbung:Färbelösung:

| | |
|---------------------|--------|
| Coomassie Blue R250 | 1,6 g |
| Methanol | 600 mL |
| ddH ₂ O | 600 mL |
| Eisessig | 120 mL |

Entfärber:

| | |
|----------|-----------|
| Eisessig | 7% (v/v) |
| Methanol | 10% (v/v) |

Silberfärbung:Fixierlösung:

| | |
|------------|-----------|
| Essigsäure | 12% (v/v) |
| Methanol | 50% (v/v) |

Imprägnierungslösung:

| | |
|---|--------|
| Na ₂ S ₂ O ₃ (43 mg·mL ⁻¹) | 150 µL |
| Formaldehyd (37%) | 200 µL |

mit ddH₂O auf 30 mL auffüllen

Färbelösung:

| | |
|--|-------|
| AgNO ₃ (2 g·L ⁻¹) | 30 mL |
| Formaldehyd (37%) | 20 µL |

Entwickler:

| | |
|---|-------|
| Na ₂ CO ₃ (60 g·L ⁻¹) | 30 mL |
| Formaldehyd (37%) | 15 µL |
| Na ₂ S ₂ O ₃ (43 mg·mL ⁻¹) | 3 µL |

Westernblot:Transferpuffer:

| | |
|----------|-------------|
| Tris | 25 mM |
| Glyzin | 192 mM |
| Methanol | 20% (v/v) |
| SDS | 0,02% (w/v) |

PBST (pH 7,6):

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 130 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 7 mM |
| NaH ₂ PO ₄ | 3 mM |
| Tween 20 | 0,1% |
| NaN ₃ | 0,02% |

Blockierungspuffer:

| | |
|------------------|------------------|
| Magermilchpulver | 5% (w/v) in PBST |
|------------------|------------------|

TMN-Puffer

| | |
|-------------------|--------|
| Tris/HCl, pH 9,5 | 100 mM |
| NaCl | 100 mM |
| MgCl ₂ | 5 mM |

NBT- Stammlösung:

50 mg Nitroblue Tetrazoliumsalz pro mL 70% N,N-Dimethylformamid

BCIP-Stammlösung:

50 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat pro mL N,N-Dimethylformamid

Färbelösung:

| | |
|------------------------------|-------|
| BCIP-Lösung | 33 µL |
| NBT-Stammlösung | 66 µL |
| TMN | 10 mL |
| frisch vor Gebrauch ansetzen | |

2.1.2 Antikörper und Antiseren

primäre Antikörper und verwendete Verdünnungen:

- Ziegen-Anti-SSU (Gerste), 1:500
- Kaninchen-Anti-LHC II (Gerste), 1:500
- Ziegen-Anti-LHC II (Euglena), 1:500
- Kaninchen-Anti-D1 (Gerste), 1:10000
- Kaninchen-Anti-KF, ATP-Synthase (Hafer), 1:10000
- Kaninchen-Anti-GST-ELIP, #275 (Gerste), V = 1:1000

sekundäre Antikörper und verwendete Verdünnungen:

- Ziege-Anti-Kaninchen IgG Alkalische Phosphatase konjugiert (Sigma), 1:20000
- Esel-Anti-Ziege IgG Alkalische Phosphatase konjugiert (Sigma), 1:20000

2.1.3 Pflanzenmaterial

Für die Experimente wurde Saatgut folgender Pflanzen verwendet:

Poaceae:

- Hordeum vulgare* cv. Apex
(Lochow-Petkus, Bergen-Wohlde, Deutschland)
- Secale cereale* cv. Petka
(KWS AG, Einbeck, Deutschland)

Triticum aestivum cv. Sorbas

(Fa. Strube Saatzucht, Söllingen, Deutschland)

Zea mays cv. Gaucho

(KWS AG, Einbeck, Deutschland)

Fabaceae:

Glycine soja cv. Quito

(Monsanto GmbH, Düsseldorf, Deutschland)

Phaseolus vulgaris cv. Saxa

(Kober GmbH, Wien, Österreich)

Pisum sativum

cv. Rosakrone (OSG Saatzucht, Deutschland)

cv. Lancet, Maxigold, Rheinische Zucker, Rheinperle, Wunder von Kelvedon, Jumbo, Sugar Bon und Excellenz (Terra Pflanzenzucht GmbH, Rosdorf, Deutschland)

cv. Catania, Sponsor, Laser und Granada (Lochow-Petkus, Bergen-Wohlde, Deutschland)

Vicia faba ssp. *faba* cv. Cargo

(DLF-Trifolium, Roskilde, Dänemark)

Brassicaceae:

Sinapis alba cv. Mustang

(Norddeutsche Pflanzenzucht, Holtsee, Deutschland)

Brassica napus ssp. *napus* cv. Petranova

(Lochow-Petkus, Bergen-Wohlde, Deutschland)

Lepidium sativum ssp. *sativum*

(Botanischer Garten der Universität Bayreuth, Deutschland)

Arabidopsis thaliana

(Botanischer Garten der Universität Ulm, Deutschland)

Chenopodiaceae:

Beta vulgaris ssp. *vulgaris* var. *altissima* cv. Kawetina

(KWS AG, Einbeck, Deutschland)

Spinacia oleracea

(Botanischer Garten der Universität Göttingen, Deutschland)

Asteraceae:

Helianthus annuus cv. Frankasol

(Semences Cargill, Peyrehorade, Frankreich)

Bei allen verwendeten Dikotylen handelt es sich um im Dunkeln keimende Therophyten, die unter den gewählten Bedingungen relativ schnell und gleichmäßig keimen. Wenn nicht anders angegeben, wurde für Experimente mit Erbse die Sorte `Rosakrone` verwendet. Die Keimung erfolgte bei den verwendeten Pflanzen bei einer durchschnittlichen Temperatur von 17,5°C bzw. 20°C nach 7 Tagen bis maximal 14 Tagen.

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

2.2.1.1 Anzuchtbedingungen

Für die Anzucht der Pflanzen wurden selbstgebaute Plexiglaskammern verwendet, die schon für Hitzeschockversuche benutzt wurden (Beator, 1993). Drei dieser Kammern wurden in einer großen Klimakammer untergebracht, die auf 2°C bis 3°C unter die niedrigste, für die Experimente benötigte Temperatur eingestellt war. Die benötigten Minimum- und Maximumtemperaturen wurden durch Gegenheizen in den Plexiglaskammern erreicht, die exakter als die großen Kammer temperiert werden konnten. Die Aufheizung erfolgte mit einer Glühwendel, die über ein Kontaktthermometer gesteuert wurde. Die Luftzirkulation und damit die möglichst gleichmäßige Verteilung der temperierten Luft, wurde mit einem Ventilator erreicht, der in der oberen rechten Ecke der Kammer, direkt hinter der Glühwendel montiert war.

Bei der Durchführung der Experimente, bei denen die Pflanzen unter oszillierenden Temperaturen angezogen wurden, traten schnell Unzulänglichkeiten der vorhandenen Plexiglaskammern zu Tage, so dass neue Kammern konzipiert und gebaut werden mussten (3.1).

2.2.1.2 Experimente zur Morphologie

Für die Experimente wurden Karyopsen von Sommer-Gerste (*Hordeum vulgare* cv. Apex), Sommer-Roggen (*Secale cereale* cv. Petka), Winter-Weizen (*Triticum aestivum* cv. Sorbas), Hybrid-Mais (*Zea mays* cv. Gaucho) und Saatgut von Soja (*Glycine soja* cv. Quito), Buschbohne (*Phaseolus vulgaris nanus* cv.), Erbse (*Pisum sativum* cv. Rosakrone), Ackerbohne (*Vicia faba* ssp. *faba* cv. Cargo), Gelbsenf (*Sinapis arvensis* ssp. *alba* cv. Mustang), Raps (*Brassica napus* ssp. *napus* cv. Petranova), Gartenkresse (*Lepidium sativum* ssp. *sativum*), Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), Zuckerrübe (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* cv. Kawetina), Spinat (*Spinacia oleracea* cv.) und Sonnenblume (*Helianthus annuus* cv. Frankasol) verwendet. Die Samen wurden in Töpfen auf nassem Vermiculit ausgesät, mit ca. 1 cm Vermiculit überdeckt und sofort in die jeweiligen Anzuchtkammern verbracht. Während der Wachstumsperiode wurden die Pflanzen nach Bedarf zwei- bis dreimal mit Leitungswasser gegossen. Die Temperaturen in den Kammern wurden mit Datenloggern (Testo 175-0, Testo GmbH & Co., Lenzkirch, Deutschland) überwacht. Teilweise wurden zur simultanen Überwachung von Temperatur und relativer Luftfeuchte elektronische Thermohygrographen mit Feuchtesensor eingesetzt (Testo 175-3, Testo GmbH & Co., Lenzkirch, Deutschland). Das Arbeiten in den Dunkelkammern und die Kontrolle des Wachstums der Versuchspflanzen wurde mit einem Nachtsichtgerät erleichtert (BM 8028, Leihgerät des BWB, Koblenz, Deutschland).

2.2.1.2.1 Zyklischer Hitzeschock

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Dunkeln bei 25°C ($\pm 0,05^\circ\text{C}$) und einer relativen Luftfeuchte von ca. 60% bis 70%. Mit Beginn der Aussaat und alle weiteren 24 Stunden erhielten die Pflanzen eine einstündige Hitzebehandlung von 42°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Die Dauer des Temperaturübergangs von 25°C auf 42°C betrug etwa 50 Minuten, die 42°C-Phase dauerte 45 Minuten und die Abkühlung von 42°C auf 25°C ca. 90 Minuten. Ein typischer Verlauf der Temperatur und der relativen Feuchte ist in Abb. 3 dargestellt. Als Vergleich wurden grüne Pflanzen bei 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) im L/D-Wechsel von jeweils 12 Stunden ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Skye-Luxmeter, Skye-Instruments, GB) und etiolierte Pflanzen bei 25°C ($\pm 0,05^\circ\text{C}$) im Dunkeln angezogen. Nach 6 bis 20 Tagen (abhängig von der Pflanzenart) wurde die Morphologie der Pflanzen untersucht.

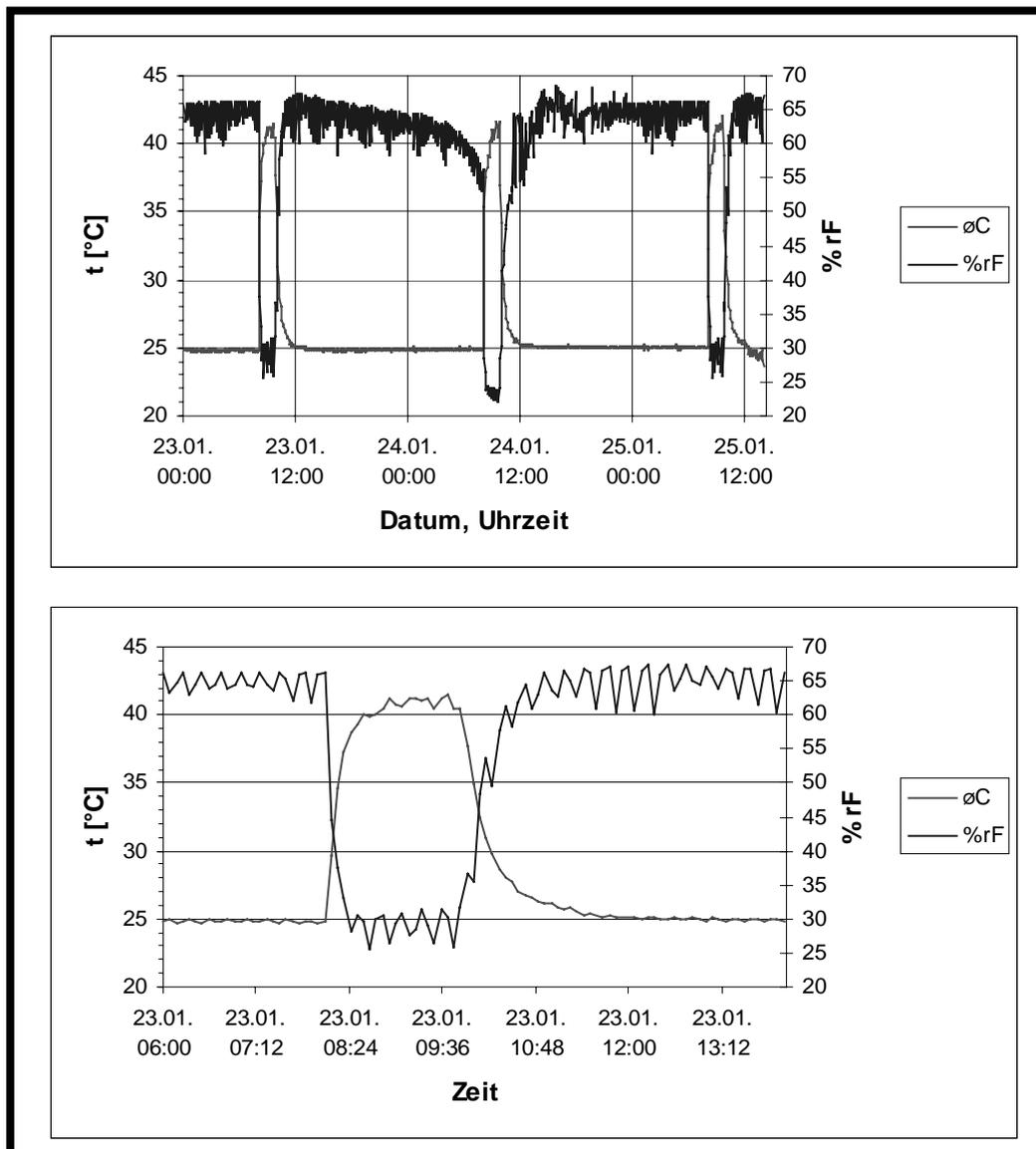


Abb. 3: Verlauf der Temperatur und der relativen Feuchte. Die obere Grafik zeigt exemplarisch den Verlauf über 3 Tage, die untere Grafik den Verlauf des ersten HS im Ausschnitt.

2.2.1.2.2 Temperaturoszillationen

Die Pflanzen wurden im Dunkeln bei oszillierenden Temperaturen und einer relativen Luftfeuchte von ca. 95% am Temperaturmaximum und ca. 55% am Temperaturminimum angezogen. Dazu wurden in einer auf 8°C bzw. 14°C temperierten Klimakammer drei Plexiglas-kammern (ca. 1m·1m·1m) aufgestellt, in denen zur Einstellung der angestrebten Minimum- und Maximumtemperaturen gegengeheizt wurde. Die Temperaturprogramme wurden wie folgt gewählt:

| | |
|--------------------------|------------------------------------|
| Plexiglaskammer 1 (PK1): | 1h/1h = 16°C/24°C |
| oder: | 2h/2h = 10°C/25°C bzw. 16°C/24°C |
| Plexiglaskammer 2 (PK2): | 12h/12h = 10°C/25°C bzw. 16°C/24°C |
| Plexiglaskammer 3 (PK3): | konstant, 17,5°C bzw. 20°C |

Die Temperatursummen in allen drei Kammern waren identisch. Typische Temperaturverläufe sind in Abb. 4 und Abb. 5 dargestellt. Nach 6 bis 20 Tagen (abhängig von der Pflanzenart) wurde die Morphologie der Pflanzen untersucht.

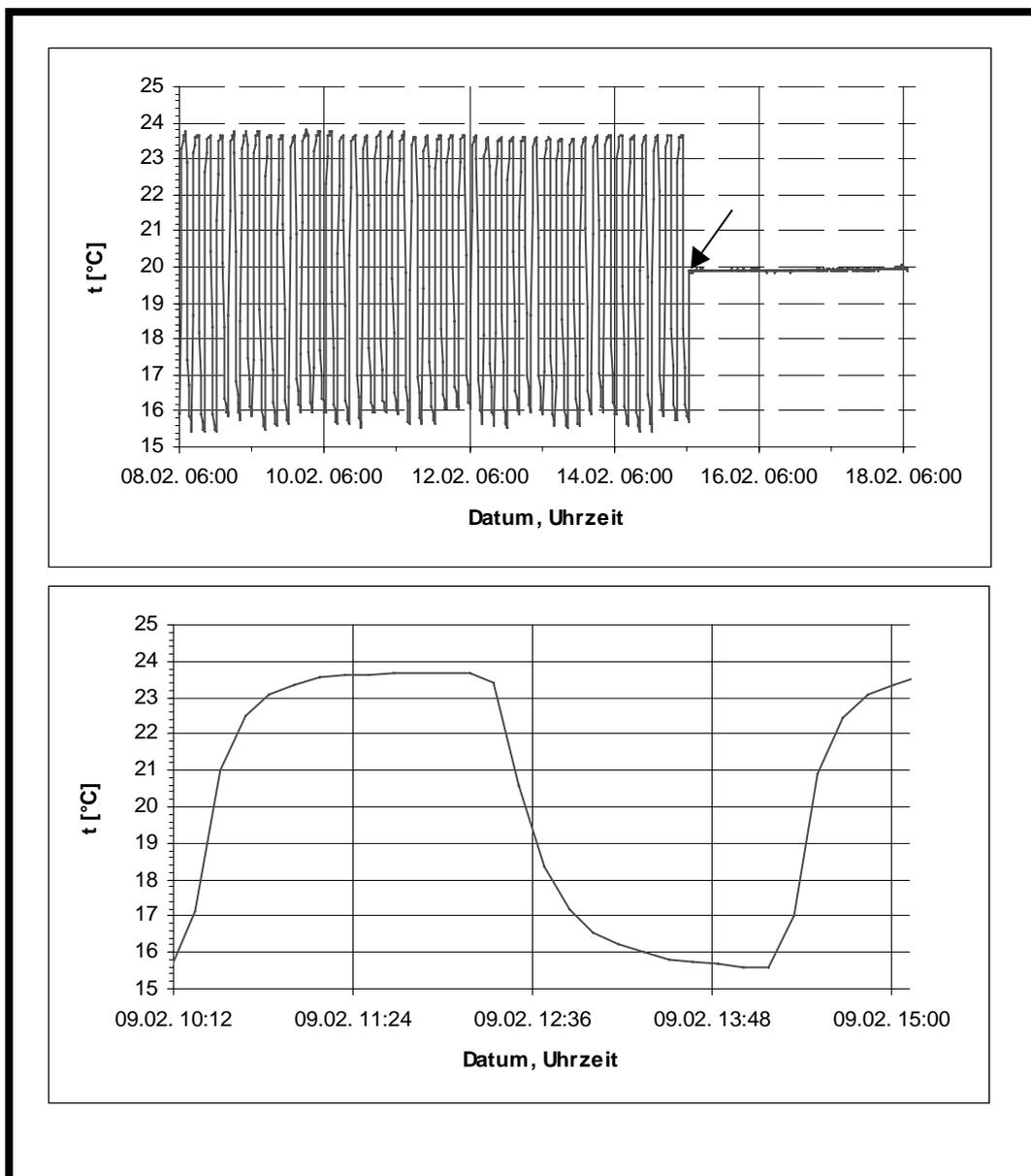


Abb. 4: Temperaturverlauf: 2h/2h = 16°C/24°C. Die obere Grafik zeigt exemplarisch den Verlauf über 10 Tage, die untere Grafik den Verlauf einer Temperaturperiode im Ausschnitt (→ morphologische Auswertung bzw. Beginn der Probennahme).

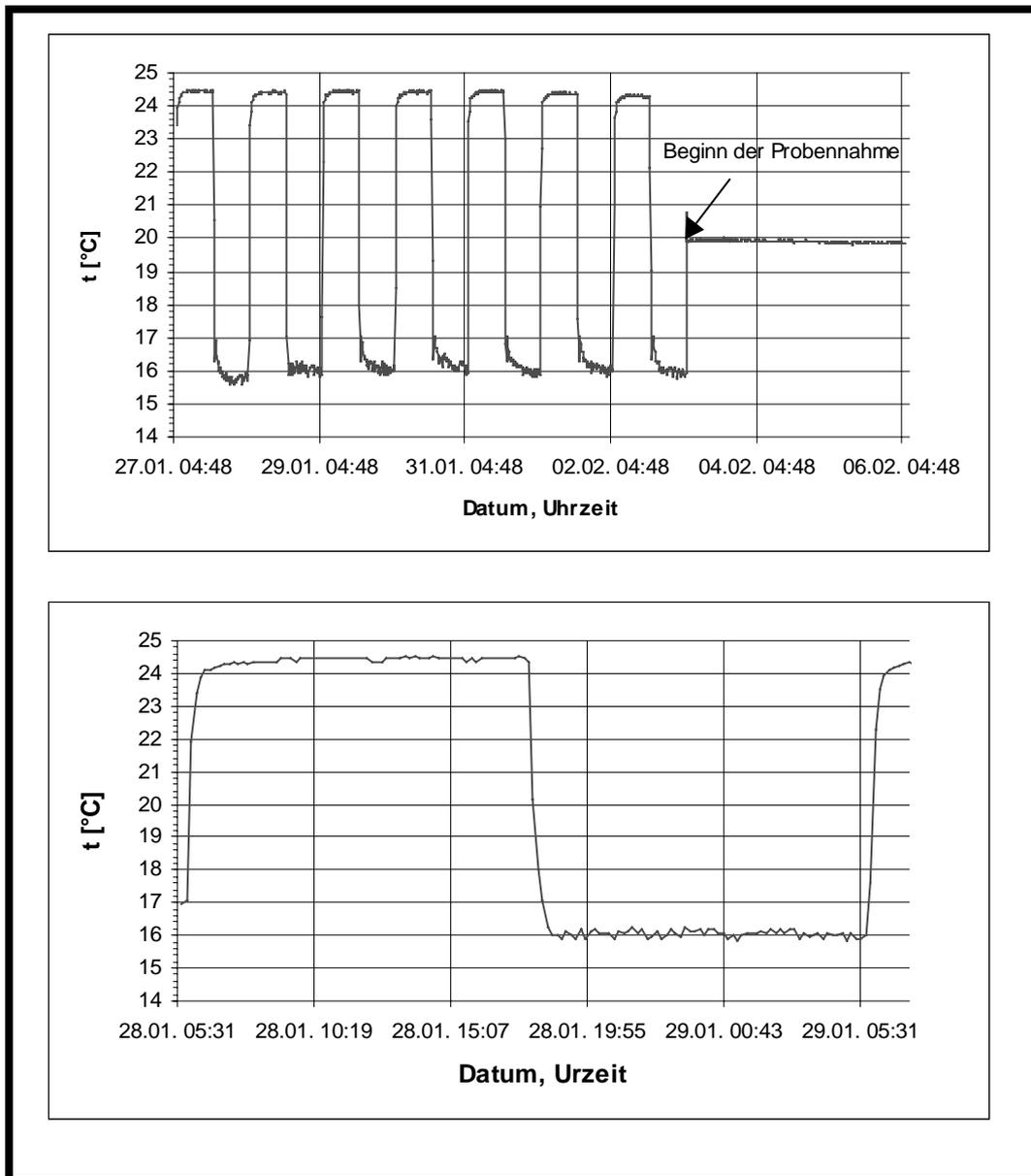


Abb. 5: Temperaturverlauf: 12h/12h = 16°C/24°C. Die obere Grafik zeigt exemplarisch den Verlauf über 10 Tage, die untere Grafik den Verlauf einer Temperaturperiode im Ausschnitt (→ morphologische Auswertung bzw. Beginn der Probennahme).

2.2.1.3 Experimente zur Rhythmik

Bei Gerste und teilweise auch bei Mais und Erbse wurden neben den morphologischen Parametern Untersuchungen auf Pigment-, RNA- und Proteinniveau durchgeführt. Hierzu wurden die Pflanzen unter den unter 2.2.1.2.1 und 2.2.1.2.2 beschriebenen Temperaturprogrammen je nach Ansatz 7 bis 9 Tage bis zu einer Höhe von ca. 10 cm angezogen.

Außerdem wurden Experimente mit Gerste durchgeführt, die 7 Tage im L/D-Wechsel und bei einer konstanten Temperatur von 20°C ($\pm 0,05^\circ\text{C}$) bis zu einer Höhe von ca. 10 cm angezogen wurde.

Jede Einzelprobe bestand aus den apikalen 6 cm von ca. 20 Primärblättern mit eingeschlossenem Sekundärblatt. Mit etwas über 1g Frischgewicht (FG) pro Probe konnten jeweils Pigment-, RNA- und Proteinanalysen durchgeführt werden. Die Messwerte einer Messreihe wurden bei Bedarf einer Zeitreihenanalyse unterworfen (SciLab Vers. 2.3.1 beta, INRIA, Frankreich, 2.6.1). Die Temperaturen in den Kammern wurden mit Datenloggern überwacht (Testo 175-0, Testo GmbH & Co., Lenzkirch, Deutschland).

Zum besseren Verständnis der im folgenden beschriebenen Experimente dienen die Abb. 6 bis 8, die die Schemata zum zeitlichen Ablauf der Standardanzucht- und Erntebedingungen zeigen.

2.2.1.3.1 Zyklischer Hitzeschock

Bei den unter zyklischem HS gewachsenen Pflanzen (2.2.1.2.1) wurde nach der Anzucht die Temperatur auf konstant 25°C ($\pm 0,05^\circ\text{C}$) eingestellt und sofort mit der Ernte begonnen (Abb. 6). Dazu wurde über 1½ bis maximal 3 Tage alle 4 Stunden jeweils ein Topf mit Gerste für genau 4 Stunden belichtet ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), um die Ergrünung zu induzieren (Leuchtstoffröhren, Phillips, TLD 36W/25, Niederlande). Danach wurde Probenmaterial für die Pigmentbestimmung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -70°C gelagert.

Als Kontrolle dienten etiolierte Pflanzen, die bei 25°C ($\pm 0,05^\circ\text{C}$) angezogen wurden.

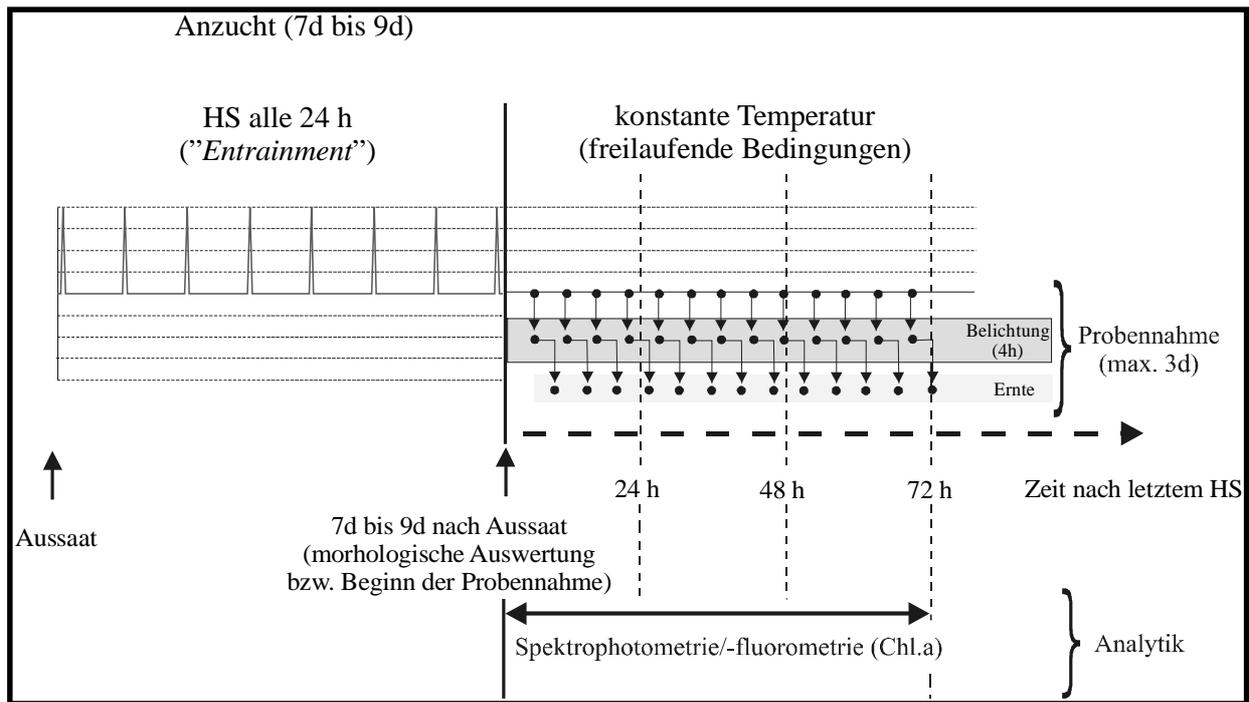


Abb. 6: Schema zur zeitlichen Durchführung der HS-Experimente. (● Stichprobe)

2.2.1.3.2 Temperaturoszillationen

Bei den unter oszillierenden Temperaturen gewachsenen Pflanzen (2.2.1.2.2) wurde nach der Anzucht die Temperatur in allen Kammern auf einen konstanten mittleren Wert von 17,5°C bzw. 20°C eingestellt und sofort mit der Ernte begonnen (Abb. 7). Dazu wurde über 1½ bis maximal 3 Tage in definierten Zeitintervallen aus jeder Plexigaskammer jeweils ein Pflanzentopf für genau 4 Stunden bei von 17,5°C bzw. 20°C belichtet, um die Ergrünung zu induzieren. Die Intervalle wurden so gewählt, dass in einem Zeitraum, der der Dauer einer Periode des Temperaturverlaufs während der Anzucht entsprach, mindestens vier in gleichen Abständen verteilte Probennahmen erfolgten. So konnte eine eventuell induzierte oder synchronisierte Rhythmik entdeckt werden. Die Belichtung erfolgte in Klimakammern mit Leuchtstoffröhren (Phillips, TLD 36W/25, Niederlande) bei $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Danach wurde Probenmaterial für die Pigment- und Proteinbestimmung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -70°C gelagert. Probematerial für die RNA-Isolation wurde vor der Belichtung geerntet.

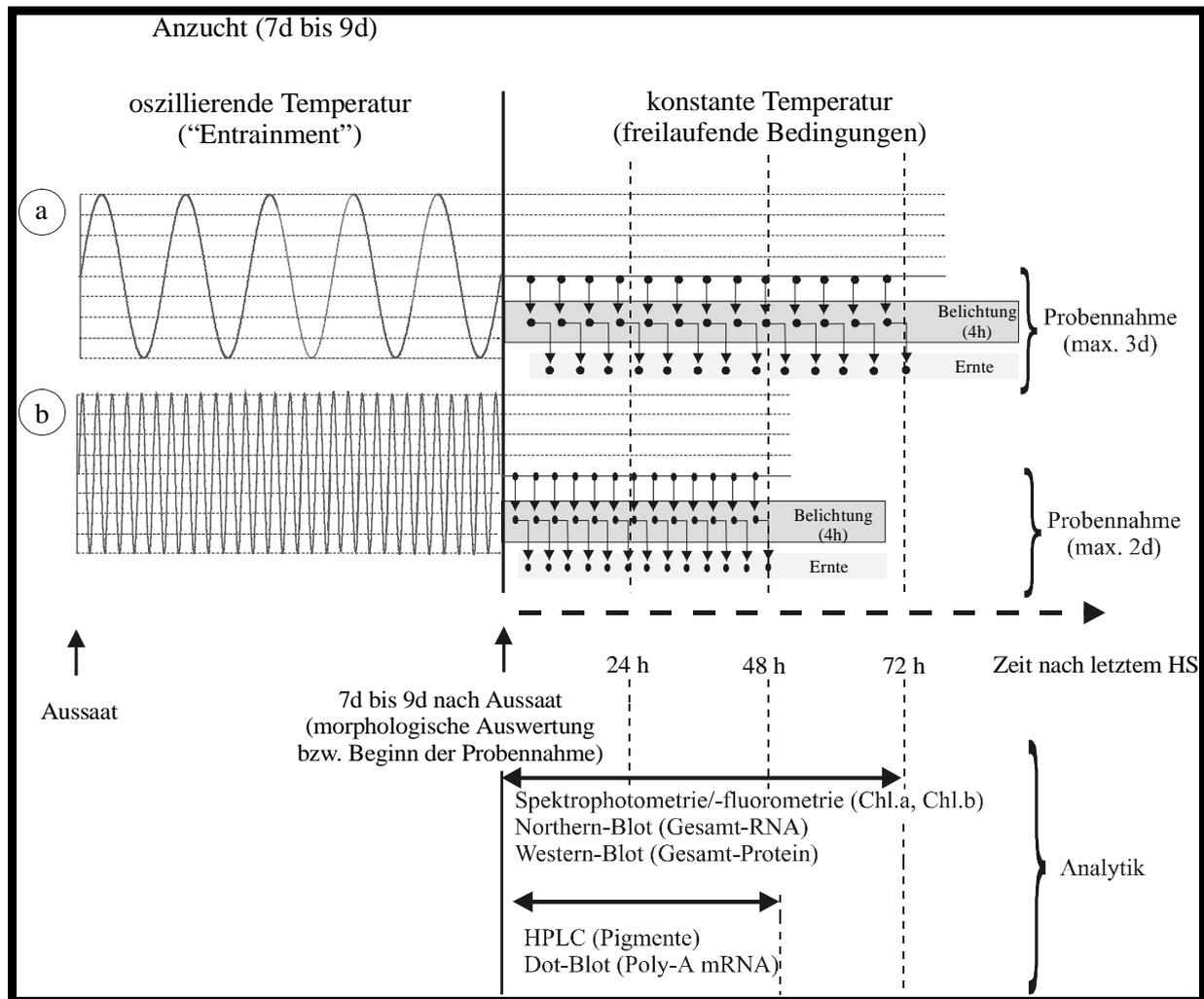


Abb. 7: Schema zur zeitlichen Durchführung der Experimente zur Temperaturoszillation. a) 12h/12h = 10°C/25°C bzw. 16°C/24°C, b) 1h/1h bzw. 2h/2h = 10°C/25°C bzw. 16°C/24°C. Vor der mRNA-Analytik erfolgte keine Belichtung. Dargestellt ist die Ernte unter freilaufenden Bedingungen. (● Stichprobe)

2.2.1.3.3 Licht/Dunkel-Wechsel

Gerste wurde im L/D-Wechsel von 2h/2h und 12h/12h bei 20°C angezogen. Die Belichtung erfolgte in Klimakammern mit $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Phillips, TLD 36W/25, Niederlande). Ab dem 8. Tag wurden die Pflanzen im D/D bzw. L/L ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) kultiviert. Während des letzten L/D-Wechsels und während der konstanten Dunkelheit bzw. des konstanten Schwachlichts wurden die Pflanzen in definierten Zeitintervallen geerntet (Abb. 8). Die Intervalle wurden so gewählt, dass in einem Zeitraum, der der Dauer einer Periode des L/D-Wechsels während der Anzucht entsprach, mindestens vier in gleichen Abständen verteilte

Probennahmen erfolgten. Das Probenmaterial für die RNA-Bestimmung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -70°C gelagert.

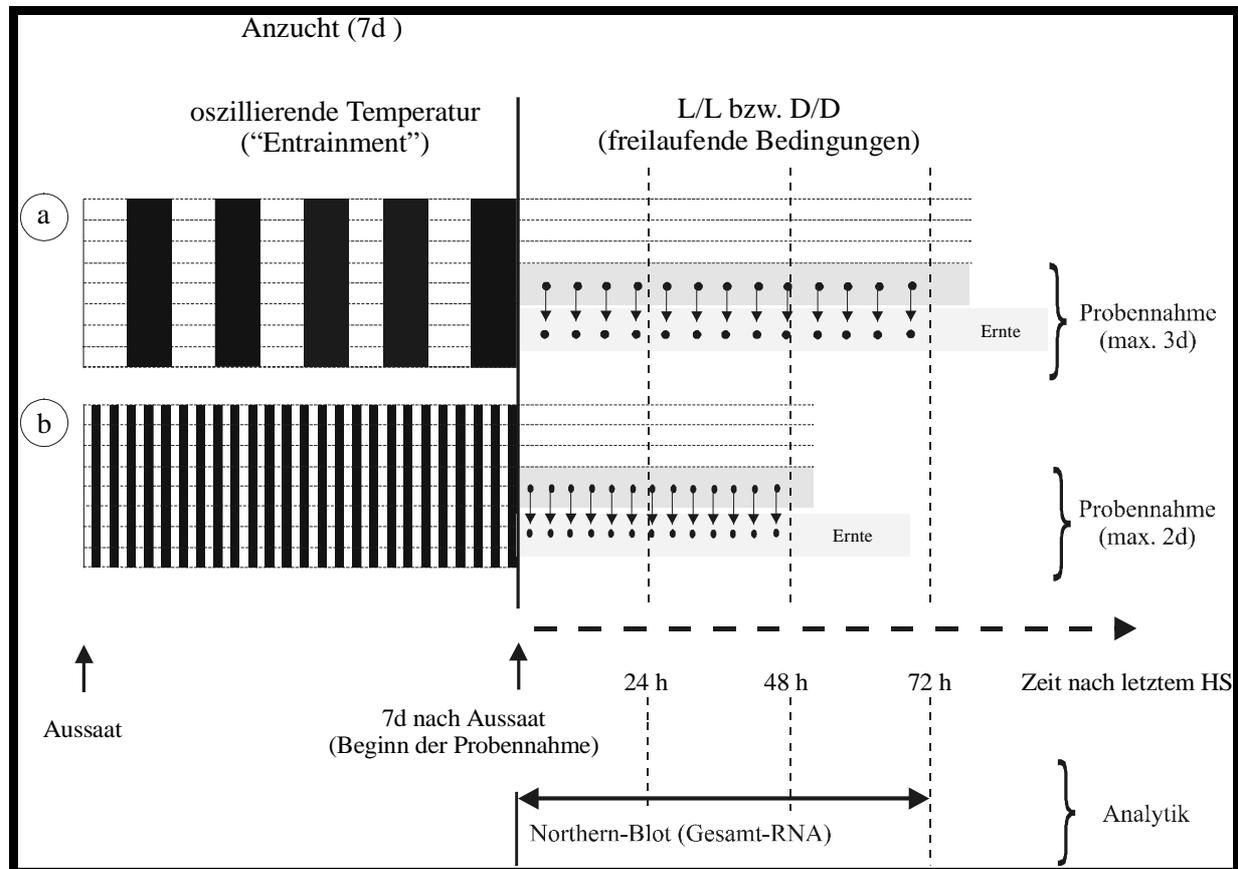


Abb. 8: Schema zur zeitlichen Durchführung der L/D-Experimente. a) L/D = 12h/12h, b) L/D = 2h/2h. Dargestellt ist die Ernte unter freilaufenden Bedingungen. (● Stichprobe)

2.3 Pigmentanalyse

2.3.1 Spektralphotometrische Chlorophyllanalyse

Zur Chlorophyllbestimmung wurden die apikalen 6,5 cm von ca. 20 Primärblättern in der Kugelmühle bei 250 Upm in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Genau 100 mg bis 200 mg wurden anschließend in 5 mL 80%igem (v/v) ammoniakalischen Aceton aufgenommen, 60 min im Dunkeln inkubiert und danach 15 min bei 17000-g zentrifugiert (Centrikon H-401B, Kontron Instruments, Hannover, Deutschland). Der Überstand wurde in einen 10 mL Messzylinder dekantiert. Das Pellet wurde in 2 mL 80%igem (v/v) ammoniakalischen Aceton homogenisiert und wieder zentrifugiert (15 min, 17000-g). Dieser Schritt wurde nochmals mit

95%igem ammoniakalischen Aceton wiederholt, die gesammelten Extrakte auf ein Gesamtvolumen von 10 mL aufgefüllt und die Extinktion bei Wellenlängen von 645 nm, 663 nm und 750 nm mit dem Spektralphotometer (DU 7500 Spectrophotometer, Beckmann, Fullerton, USA) gemessen. Die Extinktion bei 750 nm zeigte unspezifische Verunreinigungen der Probe an. Die Chlorophyllgehalte wurden wie folgt berechnet (Lichtenthaler, 1987):

$$c_{Chla} = (12,25 \cdot A_{663,2} - 2,79 \cdot A_{646,8}) \cdot \frac{V_{Aceton}}{1000} \cdot FG^{-1} \quad (\text{in mg} \cdot \text{g FG}^{-1})$$

$$c_{Chlb} = (21,50 \cdot A_{663,2} - 5,10 \cdot A_{646,8}) \cdot \frac{V_{Aceton}}{1000} \cdot FG^{-1} \quad (\text{in mg} \cdot \text{g FG}^{-1})$$

c_{Chla} , c_{Chlb} = Konzentration Chlorophyll a bzw. b, $A_{646,8}$, $A_{663,2}$ = Absorptionswerte bei 646,8 nm bzw. 663,2 nm; V_{Aceton} = Volumen des Chlorophyllextraktes (in mL); FG = Frischgewicht der Blattprobe (in g)

2.3.2 HPLC-Pigmentanalyse (modifiziert nach Norris *et al.*, 1995)

Zur Pigmentbestimmung wurden die apikalen 6,5 cm von ca. 20 Primärblättern in der Kugelmühle bei 250 Upm in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Genau 100 mg bis 130 mg wurden in eisgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße eingewogen und in 400 μL Aceton suspendiert. Nach Zugabe von 200 μL Ethylacetat und 290 μL ddH₂O wurde 10 min bei 17000-g zentrifugiert (Centrikon H-401B, Kontron Instruments, Hannover, Deutschland) und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Eindampfen der Proben im Rotationsverdampfer (Univapo 100H, Uniequipe) wurden die Pigmente in 100 μL Ethylacetat aufgenommen, in ein 2 mL Glasgefäß überführt und bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die computergeregelte HPLC-Anlage (KONTRON, Zürich, Schweiz), bestehend aus einem Gradientenmischer (HPLC Gradient Former GF 425), einer Zweikolbenpumpe (HPLC Pump 420) und einem Durchflussphotometer (HPLC Detector 430), wurde mit dem Data-Apex-Analyseprogramm (CSW, V. 1.7) gesteuert. Zur Trennung der Pigmente wurde eine „reversed phase“-HPLC durchgeführt. Der analytischen Trennsäule (Spherisorb ODS II, 5 μm , C18,

Bischoff Chromatographie) wurde eine Vorsäule mit identischem Material vorgeschaltet. Der Probeneintrag erfolgte über ein Multiport-Schleifenventil (Rheodyne), das mit einer 25 μL Schleife bestückt war. Die Proben wurden 2 min mit 10000-g zentrifugiert (Centrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und die 25 μL Probenschleife mit einer 100 μL Hamiltonpipette gefüllt, um eine vollständige Befüllung der Schleife zu gewährleisten (Meyer, 1990). Alle verwendeten Lösungsmittel hatten HPLC-Qualität. Das verwendete Wasser wurde einer Reinstwasseranlage entnommen (Milli Q-UF plus, Millipore). Die Lösungsmittel wurden während der Analysen schwach mit Helium begast.

Der Gradientenverlauf der mobilen Phase startete mit 60% Acetonitril/ H_2O (9:1) und 40% Ethylacetat. Im Laufe von 25 min wurde der Acetonitril/ H_2O -Gehalt gleichmäßig auf 30%, nach weiteren 3 min auf 0% reduziert. Nach einer Gesamtlaufdauer von 35 min wurde der zu Beginn des Laufes bestehende Gradient wieder aufgebaut und die Säule vor dem erneuten Probenauftrag 5 min äquilibriert. Als Laufgeschwindigkeit wurden $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ bei einem Druck von ca. 180 bar gewählt. Ein typisches Chromatogramm ist in Abb. 34 dargestellt.

Für Chlorophyll a und Chlorophyll b wurde eine Kalibrierung vorgenommen. Dazu wurde aus einem hochkonzentrierten Extrakt eine Verdünnungsreihe hergestellt und durch HPLC aufgetrennt. Die benötigten Fraktionen wurden gesammelt, die Pigmente im Vakuum eingengt und in wenig Aceton aufgenommen. Die Volumina wurden gravimetrisch bestimmt und im Spektralphotometer bei folgenden Wellenlängen gemessen (Lichtenthaler, 1987):

| | Wellenlänge [nm] | spez. Koeffizient [$\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$] | Masse/Peakfläche [$\text{ng}\cdot\text{mV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] |
|-------|---------------------|--|--|
| Chl a | 429,6 | 112,36 | 0,382 |
| Chl b | 455,8 | 145,36 | 0,312 |

Es wurden Eichgeraden erstellt, mit deren Hilfe die gemessenen Chlorophyllpeaks quantifiziert und mit den im Gesamtextrakt photometrisch bestimmten Messwerten verglichen werden konnten.

2.3.3 Trockengewichtsanteile (in % Frischgewicht)

300 mg (± 5 mg) Probe wurden ungefähr 48 Stunden im Trockenschrank bei 80°C getrocknet und anschließend im Exsikkator abgekühlt.

Der Trockengewichtsanteil am Frischgewicht (TG) wurde wie folgt berechnet:

$$TG - \text{Anteil} = \frac{TG \cdot 100}{FG} \quad (\text{in } \%)$$

TG = Trockengewichtsanteil am Frischgewicht

FG = Frischgewicht

2.4 mRNA-Analyse

2.4.1 RNA-Isolierung

2.4.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA (modifiziert nach Barlow *et al.*, 1963)

Zur Gesamt-RNA Isolierung wurden die apikalen 6,5 cm von ca. 20 Primärblättern in der Kugelmühle (Pulverisette 5, Fa. Fritsch, Idar-Oberstein, Deutschland) bei 250 Upm in flüssigem Stickstoff zerkleinert und ca. 600 mg in 2 mL Eppendorfgefäße überführt, in denen jeweils 750 μ L Lysispuffer und PCI vorgelegt waren. Die Proben wurden sofort mindestens 20 min geschüttelt und anschließend bei 18000·g und Raumtemperatur (RT) für 20 min zentrifugiert (Jouan Multi-Funktions-Zentrifuge CR 3i mit Rotor AC 2.14, Jouan GmbH, Unterhaching, Deutschland). Der wässrige Überstand wurde mit 750 μ L PCI wenige Minuten geschüttelt und nochmals für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Fällung der Nukleinsäuren mit 0,75 Volumeneinheiten (Vol.) 8 M LiCl bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach 20 Minuten Zentrifugation mit 18000·g bei 4°C wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 500 μ L ddH₂O gelöst. Anschließend wurden 50 μ L 3 M Na-Acetat, pH 5,2 und 3 Vol. Ethanol zugegeben. Nach dem Mischen wurde mindestens 1 Stunde bei -20°C inkubiert und im Anschluss 20 min bei 4°C und 18000·g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Ethanols wurde das RNA-Pellet im Vakuum getrocknet und anschließend in ddH₂O gelöst. Die Konzentration der RNA wurde durch Messung der Extinktion eines 1:50 verdünnten Aliquots bei 260 nm

bestimmt (Beckmann DU 7500 Spectrophotometer, Beckmann Instruments, Fullerton, USA). Eine $OD_{260nm} = 1$ entspricht einer RNA-Konzentration von $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Die Proben wurden mit ddH₂O auf die gleiche Konzentration eingestellt und anschließend bei -20°C gelagert.

2.4.1.2 Isolierung von poly(A)⁺ RNA (modifiziert nach Pemberton *et al.*, 1975)

Zur Isolierung von poly (A)⁺ RNA angereicherter RNA wurde eine nach Pemberton *et al.* (1975) modifizierte, wenig zeitaufwendige Methode angewandt. Zur Inhibition von endogenen RNasen wurde das Probenmaterial in einem Lysispuffer aufgenommen, der zur Inhibierung endogener RNasen SDS enthielt und einen hohen pH-Wert von 9,5 aufwies.

Die apikalen 6,5 cm von ca. 20 Primärblättern wurden in der Kugelmühle bei 250 Upm in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert. Das gemörserte Material wurde in einen GSA-Becher gegeben, in dem 50 mL Aufschlusspuffer vorgelegt waren. Danach wurde Proteinase K bis zu einer Konzentration von $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ zugesetzt und 30 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurde 10 min bei 20°C mit 10000 Upm im GSA-Rotor zentrifugiert (Centrikon H-401 B, Kontron Instruments, Zürich, Schweiz). Der klare Überstand wurde durch ein Faltenfilter filtriert und das Filtrat mit 5 mL 4M NaCl-Lösung gemischt. Ausgefallenes SDS wurde durch kurzes Erwärmen in Lösung gebracht. Danach wurde oligo(dT)-Cellulose hinzugegeben. Die Suspension wurde 30 min auf dem Schüttler inkubiert, anschließend in einen Glasbecher überführt und in einer Ausschwingzentrifuge kurz abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei zwischenzeitlicher Zentrifugation 3 mal mit Bindungspuffer und 2 mal mit Säulenpuffer gewaschen. Das mit poly (A)⁺ RNA angereicherte Pellet wurde in 4 mL vorgewärmtem Elutionspuffer für 5 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Vorgang mit weiteren 4 mL Elutionspuffer wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden mit 1/20 Vol. 4 M NaCl-Lösung und 3 Vol. EtOH (96%) versetzt und die RNA über Nacht bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die RNA im SS-34-Rotor zentrifugiert (15000 Upm, 4°C , 40 min), das Pellet in 1 mL 70% Ethanol/200 mM Na-Acetat resuspendiert und in Eppendorfgefäße überführt. Die Suspension wurde 15 min bei 4°C und 14000 Upm in der Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 C, Eppendorf, Köln, Deutschland) pelletiert. Anschließend wurden die Pellets noch mit 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Absaugen der

Überstände und Trocknen unter Vakuum wurde die RNA in 50 μL ddH₂O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter 2.4.1.1 beschrieben.

2.4.2 Blotting-Methoden

2.4.2.1 RNA „Dot-Blot“-Verfahren (modifiziert nach Thomas, 1980)

In der „Dot-Blot“-Analyse wurden Proben aus poly(A)⁺ RNA Präparationen verwendet.

Zum quantitativen Nachweis einzelner mRNA-Spezies wurden pro Probe und Sonde 0,5 μg poly(A)⁺ RNA eingesetzt, die mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 10 μL aufgefüllt wurde. Nach Zugabe von 43 μL Formaldehyd (37%) und 80 μL 20x SSC wurde die RNA bei 60°C für 15 min denaturiert. Anschließend wurde mit 267 μL 10x SSC auf 400 μL Gesamtvolumen aufgefüllt. In eine „Dot-Blot“-Apparatur (GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland) wurde eine in 10x SSC eingeweichte Biodyne B Transfer Membran mit einem Porendurchmesser von 0,45 μm eingespannt (Pall Europe Limited, Portsmouth, England) und für jeden Zeitwert ein Aliquot von 200 μL , 100 μL und 50 μL pipettiert (entsprach 250 ng, 125 ng und 62,5 ng RNA). Durch das Anlegen eines schwachen Unterdrucks wurden die Lösungen durch die Membran gesaugt. Jeder „Dot“ wurde zweimal mit je 200 μL 10x SSC gewaschen und danach die Membran zur Fixierung der gebundenen RNA 30 min bei 80°C gebacken. Es wurden mehrere Replikafilter hergestellt. Bis zur Hybridisierung (2.4.4) wurden die Filter trocken zwischen Filterpapier aufbewahrt.

2.4.2.2 Northern Blot (modifiziert nach Kroczeck und Siebert, 1990)

In der Northern-Blot-Analyse wurden Proben aus Gesamt-RNA-Präparationen mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anschließend durch Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen.

Die nach 2.4.1.1 isolierte Gesamt-RNA wurde mit mindestens 3 Vol. Northern-Mix gemischt und anschließend 15 min bei 65°C im Wasserbad denaturiert. Für die Elektrophorese wurden 1,5%ige Agarose/2,2 M Formaldehyd-Gele in 1x Gelpuffer verwendet. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde eine Spannung von 2,5 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ angelegt. Diese wurde anschließend auf

5 V·cm⁻¹ erhöht. Nach der Elektrophorese wurde mit Hilfe eines Transilluminators die gleichmäßige Beladung der Spuren geprüft.

Der Transfer auf eine Biodyne B Transfer Membran mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm (Pall Europe Limited, Portsmouth, England) erfolgte nach dem Prinzip des Kapillartransfers über Nacht. Als Transferpuffer diente 20 x SSC, pH 7,0. Die Membran wurde anschließend zur Fixierung der gebundenen RNA 30 min bei 80°C gebacken oder alternativ an der Luft getrocknet und 2 min mit UV-Licht bestrahlt (314 nm). Mit dem Transilluminator konnte gleichzeitig der gleichmäßige Transfer der RNA geprüft werden. Es wurden mehrere Replikafilter hergestellt. Bis zur Hybridisierung (2.4.4) wurden die Filter trocken zwischen Filterpapier aufbewahrt.

2.4.3 Radioaktive Markierung spezifischer cDNAs

Die zu markierenden cDNA-Moleküle wurden durch Herausschneiden der cDNA mit geeigneten Restriktionsenzymen aus dem entsprechenden Plasmid, anschließender Agarosegelelektrophorese und Isolierung der cDNA aus dem Gel (2.4.6.3) gewonnen.

Die cDNA-Sonden wurden mit Hilfe eines *random primer labeling kits* nach Vorschrift radioaktiv markiert (Prime It II, Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Das *random priming* erfolgte mit ca. 12 ng cDNA-Restriktionsfragmenten pro Ansatz. Zu 12 µL DNA-Lösung wurden 5 µL Oligonukleotidprimer pipettiert, der Ansatz für 5 min bei 95°C - 100°C erhitzt und anschließend nach Abkühlung auf RT kurz zentrifugiert. Danach wurden 5 µL Reaktionspuffer, 2,5 µL α-³²P-dCTP (1 MBq, spezifische Aktivität von 120 TBq·mmol⁻¹, Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) und 0,5 µl Klenow-Polymerase (5 U·µL⁻¹) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

Währenddessen wurde eine Sephadex-Säule vorbereitet (Pharmacia, Uppsala, Schweden), mit derer Hilfe die nichteingebauten Mononukleotide von den markierten hochmolekularen cDNA-Molekülen abgetrennt werden können. Erstere dringen in die Matrix ein und werden so bei einer kurzen Zentrifugation zurückgehalten, letztere passieren die Säule im Totvolumen, außerhalb der Matrix, und finden sich im Eluat wieder. Eine in ein 2 mL Eppendorfgefäß gestellte Mini-Säule mit einem 35 µm Filter (MoBiTec, Göttingen Deutschland) wurde dazu mit 800 µL in TE (pH 8) äquilibriertem Sephadex-G50 beladen und 5 min bei 3000 Upm in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und die Säule in ein neues Eppendorfgefäß gestellt.

Nach beendeter Inkubationszeit wurde die *labeling*-Reaktion durch Zugabe von 1 μL Stop-Lösung gestoppt und der Reaktionsansatz mit ddH_2O auf 100 μL aufgefüllt. Davon wurde 1 μL zur Messung der Gesamtradioaktivität abgenommen und das restliche Volumen mittig auf die Säule pipettiert. Es wurde erneut 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert, 1 μL des Eluats zur Bestimmung der Einbaurrate entnommen und die restliche radioaktiv markierte cDNA direkt zur Hybridisierung eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Einbaurrate von $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ wurde mittels Cerenkov-Zählung bestimmt (Beckmann LS 1801, Fullerton, USA). Sie gibt einen Hinweis darauf, ob die Reaktion störungsfrei abgelaufen ist. Aus den Messwerten der Proben, die vor und nach der Eluierung über die Säule vom Reaktionsansatz genommen wurden, wurde der prozentuale Einbau an $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ berechnet. Für jede Probe wurde das arithmetische Mittel von 3 Messungen ermittelt. Die Einbauraten lagen zwischen 60% bis 85%.

2.4.4 Hybridisierung mit radioaktiver Sonde (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde. Anhand der Stärke der in der Autoradiographie erhaltenen Signale lässt sich die Menge der zu untersuchenden RNA-Spezies durch densitometrische Methoden bestimmen.

Die Prähybridisierungslösung wurde ca. 30 min bei 70°C erwärmt und die Membranen einige Minuten in ddH_2O gespült, um Salzkristalle abzulösen. Danach wurden die Membranen drei bis vier Stunden bei 42°C unter leichtem Schütteln prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die bei -20°C gelagerte, radioaktiv markierte cDNA-Sonde wurde 5 min bei 95°C bis 100°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zu den Membranen pipettiert (spezifische Aktivität ca. $2 \cdot 10^6$ cpm pro mL Hybridisierungslösung). Die Hybridisierung erfolgte unter leichtem Schütteln bei 42°C . Nach 16 Stunden bis 20 Stunden wurden die Membranen zweimal ca. 15 min mit 2 x SSC und 0,1% (w/v) SDS bei RT und zweimal ca. 15 min mit 0,1 x SSC und 0,1% (w/v) SDS bei 60°C unter leichtem Schütteln gewaschen, um überschüssige radioaktiv markierte Sonde zu entfernen. Die feuchten Membranen wurden in Plastikfolie eingeschweißt und bei -80°C exponiert (Kodak Scientific Imaging Film, X-Omat AR). Nach ein bis drei Tagen wurde der Röntgenfilm entwickelt.

2.4.5 Quantifizierung der Hybridisierungssignale

Die Stärke der Hybridisierung an eine RNA-Probe ist ein Maß für die Häufigkeit der mRNA. Die Höhe der Signale lassen Aussagen über die relative RNA-Anhäufung in einer Probe im Vergleich zu einer anderen Probe zu.

Die Auswertung der entwickelten Röntgenfilme erfolgte durch die Messung der Schwärzung des Röntgenfilms mit Hilfe des Scanners und der Software „GelDoc1000“ von der Firma BioRad. Die Intensitäten der Signale wurden densitometrisch bestimmt. Das Hintergrundsignal wurde subtrahiert. Zur vergleichenden Auswertung wurde das maximale Signal eines Films gleich 100% gesetzt und die übrigen Signale darauf normiert.

Es wurden nur Autoradiogramme ausgewertet, deren Signale im Bereich einer linearen Beziehung von RNA-Menge und Schwärzung des Films liegen. Wenn in einem Hybridisierungsschritt mehrere Membranen gleichzeitig behandelt wurden, dienten Kontrollen dem Abgleich dieser Membranen untereinander.

2.4.6 Plasmidamplifikation

2.4.6.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen

Zur Amplifikation der DNA-Sonden wurde der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α [®] mit folgendem Genotyp transformiert: ϕ 80 Δ lacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-arg F*)U169.

Als Plasmide wurden eingesetzt:

| Plasmid | Gen | Größe | Enzym | Herkunft |
|---------|-------|--------|-------|----------------------------------|
| pKG1490 | LHCII | 962 BP | Pst I | Barkadottir <i>et al.</i> (1987) |
| pKG4626 | SSU | 840 BP | Pst I | Barkadottir <i>et al.</i> (1987) |

Die Vektoren tragen ein Tetracyclinresistenzgen.

2.4.6.1.1 Kalziumchlorid-Methode

Die Herstellung kompetenter Zellen und deren Transformation wurden nach Maniatis *et al.* (1989) mit der Kalziumchlorid-Methode durchgeführt.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 2 mL bis 4 mL steriles LB-Medium mit einigen Stammzellen von *E. coli* DH5 α [®] beimpft. Diese Flüssigkultur inkubierte über Nacht bei 37°C. Dann wurden 100 mL LB-Medium mit 1 mL dieser Übernachtskultur versetzt und 2 Stunden bis 4 Stunden bei 37°C unter leichtem Schwenken bis zu einer OD_{550nm} von 0,5 (5·10⁷ Zellen·mL⁻¹) inkubiert. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis gestellt und dann in autoklavierten GS-3-Bechern 15 min im GS-3-Rotor (3000 Upm, 4°C) abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 50 mL sterilem, eiskaltem CaCl₂/Tris (50 mM/10 mM) resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Danach wurde nochmals bei 4000·g abzentrifugiert und das Pellet in 6,6 mL eiskalter CaCl₂/Tris-Lösung aufgenommen. Zum Einfrieren wurden die Bakterien mit 15% sterilem Glycerin (v/v) versetzt, in sterile Reaktionsgefäße zu 300 μ L portioniert und bei -80°C eingefroren.

Zu je 100 ng Plasmid-DNA wurden 300 μ L der kompetenten Zellen gegeben und für 30 min auf Eis gestellt. Der anschließend erfolgte Temperaturschock (2 min bei 42°C, 1 min auf Eis) beeinträchtigte die Durchlässigkeit der Bakterienmembran in Bezug auf die Plasmid-DNA positiv. Durch Zugabe von 1 mL LB-Medium und einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C im Rundschüttler regenerierten sich die Zellen. Von diesen Kulturen wurden Aliquots auf LB-Agarplatten (Selektivnährboden: enthielt 50 μ g·mL⁻¹ Tetracyclin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden Vorkulturen in 5 mL LB-Medium mit 5 μ L Tetracyclin angesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. 850 μ L dieser Vorkultur wurden mit 150 μ L Glycerin gemischt, in Trockeneis/Ethanol eingefroren und bei -70°C als Glycerolstämme eingefroren.

2.4.6.1.2 Elektroporation

Als Alternative für die mit vergleichsweise geringer Effizienz ablaufende CaCl₂-Methode (2.4.6.1.1) wurde die Transformation mit Hilfe der Elektroporation durchgeführt.

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation wurde zunächst wie in 2.4.6.1 beschrieben verfahren. Die Zellpellets wurden schließlich anstatt in CaCl₂/Tris-Lösung in je 250 mL eiskaltem Glycerin (10% (v/v)) resuspendiert. Dann wurde erneut bei 4°C und 3000 Upm zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 125 ml Glycerin (10% (v/v)) resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Das Sediment wurden auf zwei GS-3-Becher vereinigt und in je 125 ml Glycerin resuspendiert. Dann wurde wie zuvor zentrifugiert. Die Zellen wurden vereinigt und in 60 mL Glycerin (10% (v/v)) resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Pellet in

2 mL Glycerin (10% (v/v)) aufgenommen und in Aliquots zu je 50 μL aufgeteilt. Diese wurden in Trockeneis/Ethanol eingefroren und bei -70°C gelagert.

An die 0,2 cm Küvetten wurde eine Spannung von 2,5 kV angelegt ($12,5 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$). Der parallel geschaltete Kontrollwiderstand wurde auf 200Ω und die Kapazität des Kondensators auf $25 \mu\text{F}$ eingestellt. Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der DNA wurde 1 min bis 2 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz in eine im Eis vorgekühlte Küvette pipettiert und nach Einsetzen in den Elektroporator (GenePulser, BioRad Laboratories, München, Deutschland) der Impuls gesetzt. Unmittelbar danach wurde 1 mL LB-Medium auf den Ansatz pipettiert und dieser nach Überführung in Falcon-Röhrchen 75 min auf dem Schüttler ($200 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$, 37°C) bewegt. Danach wurde ein Aliquot auf LB-Medium mit Tetracyclin ausplattiert. Kolonien wurden mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und in 10 mL LB-Medium bei 28°C auf dem Rundschtüttler angezogen. Von den gewachsenen Zellkulturen wurden Glycerinkulturen angelegt und bei -70°C gelagert.

2.4.6.2 Präparation von Plasmiden

2.4.6.2.1 Minipräparation von Plasmiden (Maniatis *et al.*, 1982)

Ob eine Transformation erfolgreich stattgefunden hat, konnte durch eine Schnell- oder Minipräparation von Plasmiden kontrolliert werden (Maniatis *et al.*, 1982; Birnboim und Doly, 1979). Es wurde eine Übernacht-Flüssigkultur in 2 mL bis 5 mL LB-Medium und $10 \mu\text{L}$ Tetracyclin von den transformierten *E.coli* oder vom Glycerol-Stamm ($10 \mu\text{L}$, nur angetaut) bei 37°C im Rundschtüttler angesetzt. Die Bakterienkultur wurde 5 min bei 1000 Upm abzentrifugiert, das Pellet in 100 mL GTE-Lösung aufgenommen und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. $10 \mu\text{L}$ einer frisch angesetzten Lysozymlösung (Stammlösung $40 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurden dazupipettiert, die Probe gut geschüttelt und zum Zellaufschluss bei RT 5 min inkubiert. Dann wurden $200 \mu\text{L}$ frisch angesetzte alkalische SDS-Lösung dazupipettiert und die Probe 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von $150 \mu\text{L}$ Natriumacetat-Lösung und leichtem Schwenken wurde die Probe erneut 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Die sich im Präzipitat befindliche chromosomale DNA wurde verworfen. Der Überstand (ca. $400 \mu\text{L}$) mit Plasmid-DNA wurde mit einer Chloroform/Phenol-Lösung (je $225 \mu\text{L}$) versetzt, gemixt und bei 13000 Upm 2 min abzentrifugiert. Die denaturierten Proteine bildeten ein Pellet. Der Überstand wurde in einem

neuen Eppendorfreaktionsgefäß mit 2 Vol. absolutem Ethanol (ca. 800 µL) versetzt, gemischt und bei RT 2 min inkubiert. Die Probe wurde 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die konzentrierte Plasmid-DNA, die als Pellet vorlag, 5 min bei RT getrocknet. Danach wurde das Pellet in ca. 60 µL TE resuspendiert. Die Probe wurde entweder bei -20°C eingefroren oder die Präparation sofort durch einen Restriktionsabbau mit anschließender Gelelektrophorese überprüft (2.4.6.2.3).

2.4.6.2.2 Maxipräparation von Plasmiden (Birnboim und Doly, 1979)

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurde eine Maxipräparation durchgeführt (Birnboim und Doly, 1979). Durch eine CsCl-Dichtegradienten-Gleichgewichtszentrifugation in Anwesenheit von Ethidiumbromid (EtBr) wurde die Plasmid-DNA von der bakteriellen DNA getrennt.

Es wurde eine Vorkultur von dem transformierten Bakterienstamm angesetzt. Dazu wurden 2 mL bis 5 mL steriles LB-Medium mit 10 µL Tetracyclin und einer Kolonie transformierter Bakterien oder mit ca. 10 µL angetautem Glycerolstamm versetzt. Es wurde über Nacht bei 37°C im Rundschüttler inkubiert und aus dieser Suspension eine Hauptkultur angesetzt. Hierfür wurden 750 mL LB-Medium mit 2 mL bis 5 mL der Vorkultur und 750 µL Tetracyclin versetzt und bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Die Hauptkultur wurde in Sorvallbecher überführt und im Sorvallrotor GS-3 10 min bei 4°C und 6000 Upm abzentrifugiert. Die Pellets wurden in einem Gesamtvolumen von 30 mL GTE-Lösung resuspendiert, vereinigt und mit 1 mL frisch angesetzter Lysozymlösung versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte bei einer Reaktionszeit von 30 min auf Eis. Durch Zugabe von 30 mL alkalischer SDS-Lösung (frisch angesetzt) und leichtem Schwenken wurde die Gesamt-DNA freigesetzt. Die Reaktion erfolgte 5 min auf Eis. Durch Zugabe von 30 mL Natriumacetat-Lösung wurden die Proteine bei einer Reaktionsdauer von 15 min auf Eis gefällt. Die Proben wurden 20 min bei 4°C und 9000 Upm in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in saubere Sorvallbecher überführt, mit 2/3 Vol. 8 M Lithiumchlorid-Lösung versetzt (ca. 60 mL), um weitere Proteine und RNA bei einer Stunde im Eisbad auszufällen. Diese wurden bei 9000 Upm, 4°C und 20 min abzentrifugiert. Dann folgte ein enzymatischer Abbau von restlicher RNA, indem 150 µL DNase-freie RNase zum Überstand pipettiert wurden. Nach einer Reaktionszeit von 1h bei 37°C im Schüttler wurde 450 µL Proteinkinase K (10 mg·mL⁻¹, Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt und

erneut 1h bei 37°C inkubiert, um weitere Proteine abzubauen. Der Reaktionsansatz wurde über eine dreilagige Mullbinde abfiltriert, erneut 20 min bei 4°C und 9000 Upm in der Sorvallzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, mit 2/3 Vol. 2-Propanol versetzt (ca. 90 mL) und die präparierte DNA über Nacht bei RT gefällt. Der Niederschlag wurde wieder bei 9000 Upm und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 1 mL TE resuspendiert. Dann wurde die DNA-Lösung auf zwei Eppendorfgeläße verteilt und mit 500 µL Chloroform/Phenol (1:1, frisch angesetzt) ausgeschüttelt. Zur besseren Phasentrennung wurden die Gefäße kurz anzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde ca. viermal wiederholt bis der Überstand klar war. Er wurde anschließend zur DNA-Fällung mit 2 Vol. 2-Propanol und 0,1 Vol. Natriumacetat versetzt (10 min, auf Eis). Die Proben wurden 2 min zentrifugiert, bei RT getrocknet und in 1 mL TE resuspendiert. Die erhaltene DNA konnte eingefroren (-20°C) oder in einem CsCl-EtBr-Gradienten aufgereinigt werden. Dazu wurden 12 g CsCl in 10 mL TE gelöst. Die in 1 mL TE resuspendierte DNA und 500 µL EtBr wurden hinzupipettiert und gut gemischt. Als die Lösung nach 15 min noch klar blieb, wurde sie mit einer Pasteurpipette luftblasenfrei in ein *quick-seal*-Zentrifugenröhrchen pipettiert und nach dem Austarieren zugeschweißt. Die Ultrazentrifugation erfolgte über 2,5 h bei 88000 Upm und 20°C in der Mini Ultrazentrifuge TL-100 (Beckmann, München, Deutschland). Unter einer UV-Lampe wurden die beiden DNA-Banden sichtbar gemacht. Es kam zur Interkalation der EtBr-Moleküle zwischen die Basenpaare. Bei der intakten circulären Plasmid-DNA konnten sich weniger EtBr-Moleküle einlagern, sie besaß deshalb eine höhere Dichte und stellte die untere der beiden Banden dar. In der oberen Bande mit geringerer Dichte befand sich die chromosomale DNA. Die untere Bande wurde über eine 18-G Kanüle in eine Tuberkulinspritze abgezogen (zweite Kanüle zum Druckausgleich). Die ca. 1 mL wurden auf zwei Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt und zu gleichen Teilen mit Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Zur besseren Phasentrennung wurden die Proben kurz anzentrifugiert. In der organischen Phase befand sich dann das EtBr, das abpipettiert und gesammelt wurde. Die Extraktion wurde drei- bis viermal wiederholt bis keine EtBr-Färbung mehr zu erkennen war. Der organische Abfall wurde mit Chlorbleichlauge versetzt und entsorgt. Die Probe wurde im kleinen Sorvallbecher 1:4 mit TE verdünnt und die DNA durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol und 0,1 Vol. Natriumacetat über Nacht gefällt. Durch Zentrifugation im Sorvallrotor SS 34 mit 15000 Upm für 30 min bei 4°C wurde die DNA abzentrifugiert, das Pellet bei RT getrocknet und in 200 µL TE aufgenommen.

Die Reinheit und Konzentration der Plasmid-DNA wurde durch die Bestimmung der Extinktion im Spektralphotometer bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dazu wurde ein Teil der DNA-Probe 1:50 mit TE verdünnt. Das Verhältnis von OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte 1,8 betragen. Eine weitere Kontrolle der isolierten DNA erfolgte durch ein Kontrollgel nach Restriktionsabbau (2.4.6.2.3).

2.4.6.2.3 Restriktionsabbau klonierter Plasmid-DNA und DNA-Gelelektrophorese

Um die Reinheit eines Plasmids zu überprüfen, konnte die DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Dazu wurden ca. 100 ng DNA eingesetzt. Es wurden 1 μ L RNase, 1 μ L β -Mercaptoethanol, 1 μ L BSA, 1 μ L Restriktionspuffer, 0,5 μ L Restriktionsenzym und 10 μ L ddH₂O zusammenpipettiert. Die gut gekühlten Lösungen wurden als Tropfen an die Reaktionsgefäßwand pipettiert und kurz anzentrifugiert. Die Reaktion erfolgte bei 37°C und wurde nach 2 Stunden durch Zugabe von 3 μ L Farbmaler abgestoppt.

Nach dem enzymatischen Verdau durch Restriktionsendonukleasen wurden die Fragmente durch eine Agarosegelelektrophorese getrennt. Die Agarosekonzentration betrug 0,8% bis 1,0%, je nach Größe des gesuchten Fragmentes. Als Gel- und Elektrodenpuffer diente TBE-Lösung. Als Längenstandard wurden verschiedene Marker-DNAs eingesetzt (z.B. λ Hin III, BioRad Laboratories, München, Deutschland). Die Elektrophorese wurde mit 70 Volt gestartet und nach ca. 40 min auf 50 Volt zurückgestellt. Die Auftrennung dauerte ca. 4 Stunden. Danach wurde das Gel 20 min mit einer wässrigen EtBr-Lösung angefärbt und 20 min gewässert. Anschließend wurde es unter UV-Licht betrachtet und zur Dokumentation fotografiert.

2.4.6.3 Insert-DNA Präparation (GeneClean™)

Die Insert-DNA Präparation wurde mit dem Kitsystem GeneClean™ (Dianova, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Zugrunde liegt die Methode von Vogelstein und Gillespie (1979). Vor der DNA-Gelelektrophorese wurde der relative Anteil von Insert-DNA an der Plasmid-DNA berechnet, um die entsprechende Menge Gesamt-DNA, die eingesetzt werden musste, abzuschätzen. Es sollten ca. 5 μ g Insert-DNA bei der elektrophoretischen Auftrennung eingesetzt werden. Dabei wurde ein Verlust von ca. 40% bei der Isolierung berücksichtigt.

Die interessierende cDNA-Sequenz wurde nach Ausschneiden aus dem Plasmid mittels geeigneter Restriktionsenzyme auf einem Agarosegel aufgetrennt. Im Anschluss wurde das entsprechende Insert unter UV-Lichtkontrolle mit zwei Skalpellenspitzen aus dem Gel herausgeschnitten, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und ausgewogen. Dann wurde das dreifache Volumen Natriumjodid (6 M) dazupipettiert, 5 min bei 55°C im Heizblock erwärmt und 5 µL Glasmilch dazugegeben, um die DNA zu binden. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden die Glaskügelchen 1 min bei 13000 Upm in einer Eppendorfschleuse pelletiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet mit 500 µL *New wash*-Lösung (eiskalt) gewaschen, 1 min zentrifugiert und der Überstand wiederum abgenommen. Die Waschschrte wurden zweimal wiederholt und das Pellet in 5 µL TE und 10 µL Glasmilch resuspendiert. Die Probe kam 3 min bei 55°C zum Ablösen der DNA in den Heizblock und wurde danach 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand mit der Insert-DNA wurde in ein sauberes Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Konzentration der DNA wurde durch Auftragen eines Aliquots auf ein 1%iges Agarosegel abgeschätzt.

2.5 Protein-Analyse

2.5.1 Proteinisolierung

2.5.1.1 Isolierung von Membranproteinen

Zur Isolierung der Membranproteine wurden die apikalen 6,5 cm von ca. 20 Primärblättern in der Kugelmühle (Pulverisette 5, Fa. Fritsch, Idar-Oberstein, Deutschland) bei 250 Upm in flüssigem Stickstoff zerkleinert und ca. 500 mg in 1,5 mL kalten Extraktionspuffer suspendiert. Die Proben wurden 10 min in Eis inkubiert und anschließend durch Nylongaze (40 µm) filtriert. Das Filtrat wurde 10 min bei 4°C, 18000·g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 200 µL Extraktionspuffer gut resuspendiert. Danach wurde auf 2 mL aufgefüllt und erneut 10 min bei 4°C und 18000·g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µL bis 300 µL reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und 10 min im Wasserbad gekocht. Für 5 min wurde bei 4°C und 18000·g zentrifugiert, 10 µL des Überstandes zur Proteinbestimmung nach Lowry (2.5.2) abgenommen und die restliche Proteinlösung bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.1.2 Isolierung von Gesamtprotein

Zur Gewinnung eines SDS-löslichen Gesamtproteinextraktes wurden 300 mg zerkleinertes Material (2.5.1.1) der apikalen 6,5 cm von Gerstenblättern in 3 mL reduzierenden Probenpuffer homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 65°C erhitzt und anschließend 12 min bei 14000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen, 10 µL des Überstandes zur Proteinbestimmung nach Lowry (2.5.2) verwendet und die restliche Proteinlösung bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.2 Quantifizierung der Proteine (modifiziert nach Lowry *et al.*, 1951)

Zur Abschätzung des Proteingehaltes wurde eine Proteinbestimmung mit Rinderserumalbumin als Referenzprotein durchgeführt. Mit einer Stammlösung von 1 mg BSA·mL⁻¹ wurde eine Eichreihe von 0 µg bis 100 µg BSA in 200 µL 0,1 M NaOH erstellt. Je 10 µL der zu bestimmenden Proteinextrakte wurden mit 500 µL Trichloressigsäure (10%) versetzt und 10 min bei 4°C gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 18000 g und 4°C wurden die Überstände abgesaugt und die Pellets in je 200 µL 0,1 M NaOH gelöst. Im 10-Sekunden-Takt wurde zur Eichreihe und zu den Proben je 1 mL Lösung III zugegeben und sofort geschüttelt. Nach genau 10 min wurde je 100 µl Lösung IV (Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz, Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt und durchmischt. Danach wurden alle Proben 30 min im Dunkeln inkubiert und die Extinktion bei 750 nm im Beckman Spektralphotometer gemessen. Aus den Extinktionswerten der Eichreihe wurde eine Eichgerade berechnet, mit deren Hilfe die unbekannt Proteinkonzentrationen der Extrakte bestimmt werden konnten. Die Proben wurden mit reduzierendem Probenpuffer auf eine Konzentration von 1 µg Protein pro µL Lösung eingestellt.

2.5.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE, Laemmli, 1970)

Für die Trennung der Proteine wurden 15%ige Polyacrylamid-Minigele (8,5 x 11 cm) mit Hilfe der Apparatur von Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA) hergestellt. Dazu wurden zunächst die Trenngele (0,75 mm) im Gel-caster mit wassergesättigtem Butanol bis zur Auspolymerisierung überschichtet. Die Gele wurden in die mit 1 x Laemmli-Laufpuffer

beschickten Laufapparaturen gespannt. Auf jedes Gel wurde ein Probenkamm gesetzt und ca. 1 mL Sammelgel aufgetragen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde mit Laufpuffer überschichtet, der Kamm entfernt und die Taschen gespült. Die eingefrorenen Proben wurden im Wasserbad gekocht, auf 1 µg Protein pro µL verdünnt (2.5.2) und aufgetragen. Der Gellauf fand bei 20 mA je Gel statt. Abgebrochen wurde der Lauf, wenn die Bromphenolblau-Front gerade herausgelaufen war. Anschließend wurden die Gele entweder gefärbt (2.5.4.1, 2.5.4.2) oder geblottet (2.5.5).

2.5.4 Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Färbung der PAGE-Gele erfolgte zur Überprüfung der Qualität der Proteinextraktion und des gleichmäßigen Proteinauftrags. Zur Aufbewahrung wurden die Gele 15 min gewässert und in einer Trocknungsvorrichtung (GelAir Dryer, Biorad, München, Deutschland) zwischen Cellophanfolie getrocknet.

2.5.4.1 Coomassie-Färbung von PAGE-Gelen

Die Polyacrylamidgele wurden mindestens 20 min in Färbelösung (Coomassie Blue R250, Serva, Heidelberg, Deutschland) unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde unter mehrmaligem Wechsel der Entfärberlösung in 10% Methanol / 7% Essigsäure mehrere Stunden entfärbt, bis ein klarer Hintergrund und gut erkennbare Proteinbanden erzielt wurden.

2.5.4.2 Silberfärbung von PAGE-Gelen (modifiziert nach Blum *et al.*, 1987)

Die Silberfärbung von Gelen, ist um den Faktor 20 bis 50 empfindlicher als die Coomassie-Färbung. Sie wurde bei Gelen durchgeführt, bei denen deutlich geringere Proteinmengen aufgetragen wurden. Die Polyacrylamidgele wurden über Nacht in Fixierlösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde dreimal mindestens 30 min mit 30%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Den Gelen wurde 1 min Imprägnierlösung zugefügt und im Anschluss wurde dreimal 1 min mit ddH₂O gewaschen. Danach wurden die Gele für 20 min bis 60 min unter leichtem Schütteln in Färbelösung inkubiert. Im folgenden wurde mit gekühlten Lösungen gearbeitet. Die Gele wurde zweimal 30 s mit ddH₂O gewaschen. Danach wurde ca.

10 min in Entwickler inkubiert und bei genügend starker Färbung die Reduktion mit 7% (v/v) Essigsäure gestoppt. Die Gele wurden mindestens 2 mal 20 min mit Essigsäure behandelt und vor der Trocknung mit Wasser gewaschen.

2.5.5 Western Blot (modifiziert nach Towbin *et al.*, 1979)

Zur Vorbereitung des Elektroblobs wurde eine PVDF-Membran (Immobilon P, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) für ca. 30 s mit Methanol benetzt und in Transferpuffer gelegt. Nach Zusammenbau des Blotting-Sandwich wurde es in die Elektroblobtkammer mit Transferpuffer eingespannt (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA). Die 0,75 mm dicken Gele wurden ca. 1 Stunde bei 400 mA bei 4°C geblottet. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in ddH₂O geschwenkt und zur Absättigung freier Bindungsstellen für 1 Stunde bei RT auf einem Kippschüttler in Blockierungspuffer inkubiert. Danach wurde der Blockierungspuffer gewechselt und primärer Antikörper hinzugefügt. Die Bindung an das Protein erfolgte über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurde die Membran fünfmal 5 min in PBST gewaschen. Nach der zweistündiger Inkubation mit dem sekundären Antikörper (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) in Blockierungspuffer wurde nochmals sechsmal 5 min mit PBST gewaschen. Danach wurde die Membran 1 min bis 2 min in TMN-Puffer geschwenkt. Die Färbelösung (modifiziert nach Blake *et al.*, 1984) wurde der Membran zugesetzt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren (ca. 5 min bis 10 min). Die Farbreaktion wurde unter fließendem Wasser abgebrochen.

Die Auswertung der Membranen erfolgte mit Hilfe des Scanners und der Software „GelDoc1000“ von der Firma BioRad. Die Intensitäten der Signale wurden densitometrisch bestimmt. Das Hintergrundsignal wurde subtrahiert. Zur vergleichenden Auswertung wurde das maximale Signal einer Membran gleich 100% gesetzt und die übrigen Signale darauf normiert.

Es wurden nur Membranen ausgewertet, deren Signale im Bereich einer linearen Beziehung von Protein-Menge und Verfärbung der Membran liegen. Wenn in einer Färbereaktion mehrere Membranen gleichzeitig behandelt wurden, dienten Kontrollen dem Abgleich dieser Membranen untereinander.

2.6 Statistik

2.6.1 Kosinor-Analyse

Eine wichtige Methode der periodischen Regression ist die sog. „Kosinor-Analyse“ (Hardeland, 1995). Sie basiert auf einer sinusiodalen Annäherung mittels einer Kosinusfunktion. Dabei wird die folgende Gleichung den experimentell gewonnenen Daten unter Verwendung der Methode der kleinsten Quadrate angenähert (Cugini, 1993):

$$Y_i = M + B \cdot t_i + A \cdot \cos\left((t_i - \Phi) \cdot \frac{2\pi}{\tau}\right)$$

Y_i = wahrscheinlichster Schätzwert des i-ten Punktes in der Datenreihe

M = mittlerer Wert der Kosinuskurve (Mesor, Akronym für „*midline estimating statistic of rhythm*“)

B = Steigung des Mesor

t_i = Zeitpunkt der Probennahme

A = Amplitude der Kurve

Φ = Phasenwinkel des maximalen Wertes der Kurve (Acrophase)

τ = Periodenlänge

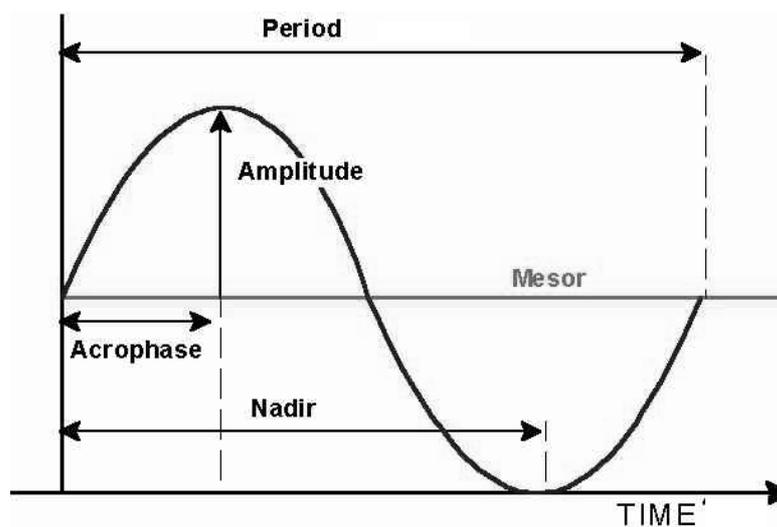


Abb. 9: Charakterisierende Merkmale einer rhythmischen Oszillation.

Die Ermittlung der Kosinuskurvenparameter wurde mit der Software Scilab Version 2.3.1 beta for Windows NT/95 durchgeführt (INRIA, Le Chesnay, Frankreich). Zur Beschreibung einer Rhythmik wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Periodenlänge τ aufgeführt.

2.6.2 t-Test

Differenz von zwei Mittelwerten wurde nach einem nach Koyro (1989) modifizierten t- Test (Cavalli-Sforza, 1969) auf Signifikanz untersucht.

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{s} \cdot \sqrt{\frac{n_A \cdot n_B}{n_A + n_B}}$$

\bar{x}_A = Mittelwert der Gruppe A

\bar{x}_B = Mittelwert der Gruppe B

n_A = Anzahl der Messungen der Gruppe A

n_B = Anzahl der Messungen der Gruppe B

s = Standardabweichung

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_{A_i} - \bar{x}_A)^2 + \sum(x_{B_i} - \bar{x}_B)^2}{n_A + n_B - 2}}$$

$\sum(x_{A_i/B_i} - \bar{x}_{A/B})^2$ = Summe der Abweichungsquadrate der Gruppe A bzw. B

Die p- Werte wurden einer Tabelle von Weber (1957) entnommen.

Im Text erfolgt die Beschreibung der Ergebnisse wie folgt:

$p \leq 0,05$ bedeutet hochsignifikant

$p \leq 0,10$ bedeutet signifikant

$p > 0,10$ und eine deutliche zeitliche Entwicklung bedeutet Tendenz oder Trend

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung und Aufbau der verwendeten Temperaturkammern

Für die Anzucht der Pflanzen wurden zunächst temperierbare Plexigaskammern verwendet, die schon für Hitzeschockversuche benutzt worden waren (Beator, 1993). Dabei stellte sich allerdings heraus, dass weder der Aufbau noch die technische Ausstattung dieser Kammern dazu geeignet waren, kurze periodische Temperaturänderungen mit ggf. auch hoher Amplitude exakt und reproduzierbar zu erzeugen (z.B. 2h/2h = 10°C/25°C). Im Einzelnen mussten folgende Unzulänglichkeiten behoben werden, die eine Neukonzipierung der Anzuchtkammern notwendig machten:

- Eine gleichmäßige Temperaturverteilung in den Kammern stellte sich während der Aufheizphase erst nach ca. 60 min, während der Abkühlphase erst nach ca. 80 min bis 120 min ein. Die Ursache war ein ungleichmäßig verteilter Luftstrom, der im wesentlichen durch einen, für die Erfordernisse ungünstig platzierten Ventilator und eine mangelhafte Luftstromlenkung hervorgerufen wurde.
- Bei der Konstanthaltung einer höheren Temperatur durch Gegenheizen (2.2.1.1) kam es häufig zu Defekten an dem den Heizkörper schaltenden Relais, das mit der vom Temperaturregler (Kontaktthermometer) vorgegebenen relativ hohen Schaltfrequenz und wegen der relativ hohen Leistung des Heizkörpers überbeansprucht war.
- Der Heizkörper, der zur Erwärmung der Luft innerhalb einer Kammer diente, emittierte während der Aufheizphasen Infrarotlicht und auch wenig Rotlicht in den Anzuchtraum.

Die neuen Kammern sollten eine möglichst schnelle Aufheizung und Abkühlung gewährleisten. Diese Temperaturänderungen sollten gleichmäßig im ganzen Raum erfolgen und ebenso wie das Halten einer konstanten Temperatur über einen Zeitraum von einigen Wochen technisch verlässlich realisierbar sein. Das Prinzip, in einen großen Klimaraum die niedrigste benötigte Temperatur vorzugeben und in kleineren Plexigaskammern gegenzuheizen, wurde beibehalten, da es den geringsten technischen Aufwand erforderte.

Ein Explosionsschema sowie den Schaltplan zur elektrischen Anlage der neuen Kammern zeigen Abb. 10 und 11. Ein wesentlicher Unterschied zu den bisher verwendeten Kammern ist die Verlagerung zweier sich einander gegenüber angebrachter Heizkörper in eine Basiswanne der Kammer. Die Basis wurde mit einer Lochplatte bedeckt, auf der die Pflanzschalen, die zur

Aufnahme der Pflanzentöpfe dienten, innerhalb eines Gehäuses auf Leisten positioniert werden konnten. Basis und Lochplatte wurden schwarz lackiert, so dass die während der Heizphasen eventuell glühenden Heizspiralen vom Raum, in dem sich die Pflanzen befanden, und auch von den übrigen Plexiglaskammern optisch abgeschirmt wurden. Die Luftzirkulation wurde von zwei Axiallüftern je Heizkörper übernommen, deren Luftstrom mittels eines kurzen Metallkanals auf die Heizspiralen zentriert wurde und damit der effizienten Kühlung der Heizspiralen diente. In der Basis wurden auf diese Weise zwei aufeinandergerichtete Luftströme erzeugt, die durch die Lochplatte in den Pflanzenraum geleitet wurden. Das Gehäuse des Pflanzenraums wurde transparent belassen, so dass die Pflanzen gegebenenfalls von außen belichtet werden konnten. In die Deckenplatte der Anzuchtammer wurden ebenfalls Löcher gebohrt und auf diese Weise der Luftaustausch während der Aufheiz- und Abkühlphasen beschleunigt. Größe und Anordnung der Löcher in der Lochplatte und der Deckenplatte sind so optimiert worden, dass eine gleichmäßige und möglichst schnelle Temperierung der Kammer bei minimaler und gleichmäßiger Luftströmung möglich war. Die Aufheizphase dauerte ca. 10 Minuten, die Abkühlphase ca. 30 Minuten (Abb. 12). Die Abkühlphase war etwas länger, da sie passiv durch die temperierte Außenluft des Klimaraumes erfolgte, in denen die Plexiglaskammern positioniert wurden (2.2.1.1). Aufgrund der durch die Löcher in der Deckenplatte zum Außenraum geöffneten Plexiglaskammer musste bei gewünschter Konstanthaltung einer erhöhten Kammerinnentemperatur eine noch häufigere Zuschaltung der Heizkörper erfolgen, als bei den alten Kammern. Daraus ergaben sich erhöhte Anforderungen an die Schaltleistung des über das Kontaktthermometer gesteuerten Relais. Eine Überbeanspruchung wurde zum einen durch einen zum Relais parallel angeschlossenen Kondensator und zum anderen durch das Zwischenschalten eines Lastschützes vermieden. Über jedem Heizkörper wurden Temperaturbegrenzer angebracht, die im Falle eines Versagens der Lüfter den Stromkreis der Heizkörper unterbrechen, sobald die Temperatur über 72°C ansteigt und ihn wieder öffnen, sobald die Temperatur unter 65°C sinkt.

Beginn und Dauer der Aufheizphasen wurden über programmierbare, digitale Zeitschaltuhren gesteuert. Auf diese Weise war eine minutengenaue Koordinierung aller während eines Experimentes benutzter Anzuchtammern und eine unkomplizierte Steuerung des Übergangs von einem zum nächsten Temperaturprogramm möglich (z.B. Konstanthaltung der Temperatur für drei Tage nach Anzucht der Pflanzen unter oszillierenden Temperaturbedingungen).

Mit den neuen Kammern konnten nun präzise Anzuchtbedingungen gewährleistet werden, wie sie aufgrund der Komplexität der höheren Pflanzen erforderlich sind.

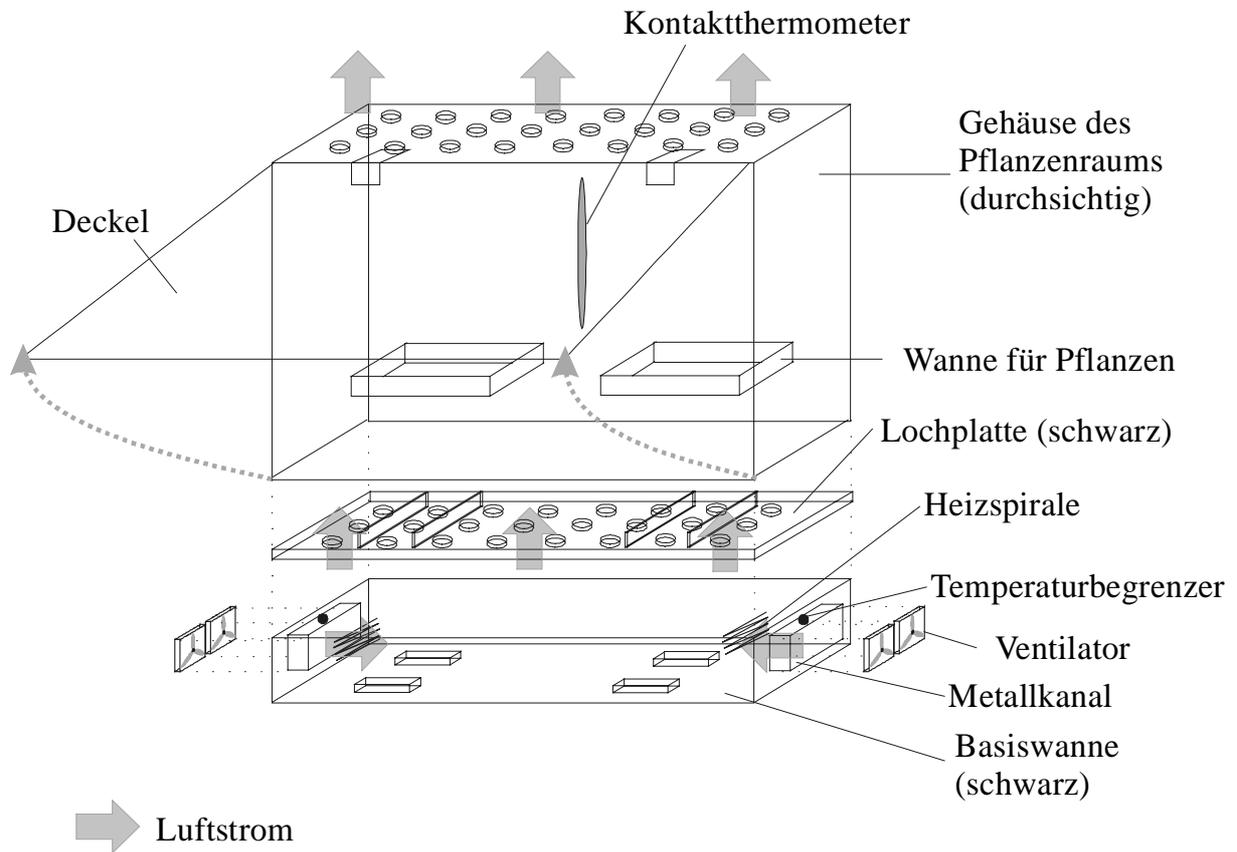


Abb. 10: Neuentwickelte Temperaturkammer aus Plexiglas (Explosionsschema). Die Pfeile deuten den Nettoluftstrom an.

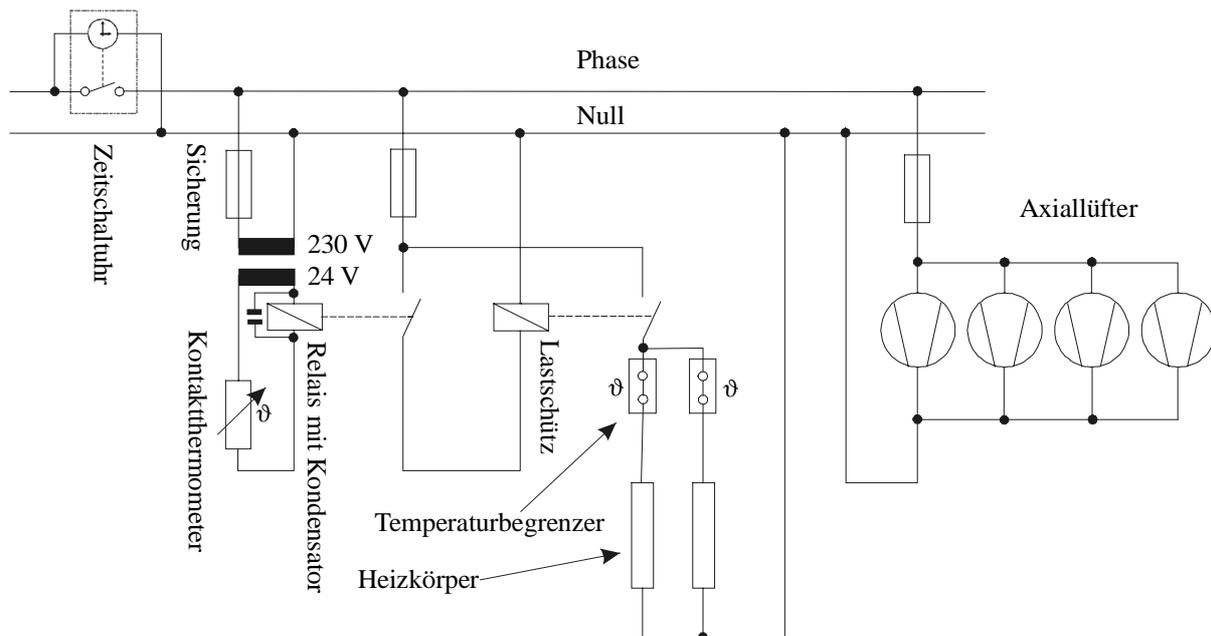


Abb. 11: Schaltplan der elektrischen Anlage der Plexiglaskammer.

| | | |
|---|---------------------|---|
| Plexiglas | 10 mm, | Röhm und Haas, Hannover, Deutschland |
| Kontaktthermometer | 0°C bis 50°C | Braun, Melsungen, Deutschland |
| digitale Zeitschaltuhr | | Siemens, Braunschweig, Deutschland |
| Heizvorsatz | 230 V, 2 mal 1000 W | Conrad Electronics, Hannover, Deutschland |
| Axiallüfter | 230 V/50 Hz | Conrad Electronics, Hannover, Deutschland |
| Lastschütz | Type HSLa24-10 | Fanal, Neustadt a.d. Weinstraße, Deutschland |
| Schaltbausatz mit Relais | | Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden, Deutschland |
| Kondensator | 100 pF | Conrad Electronics, Hannover, Deutschland |
| Temperaturbegrenzer (Bimetallschalter) | 75°C/65°C | Conrad Electronics, Hannover, Deutschland |

Tabelle 1: Technische Daten zum Schaltplan.

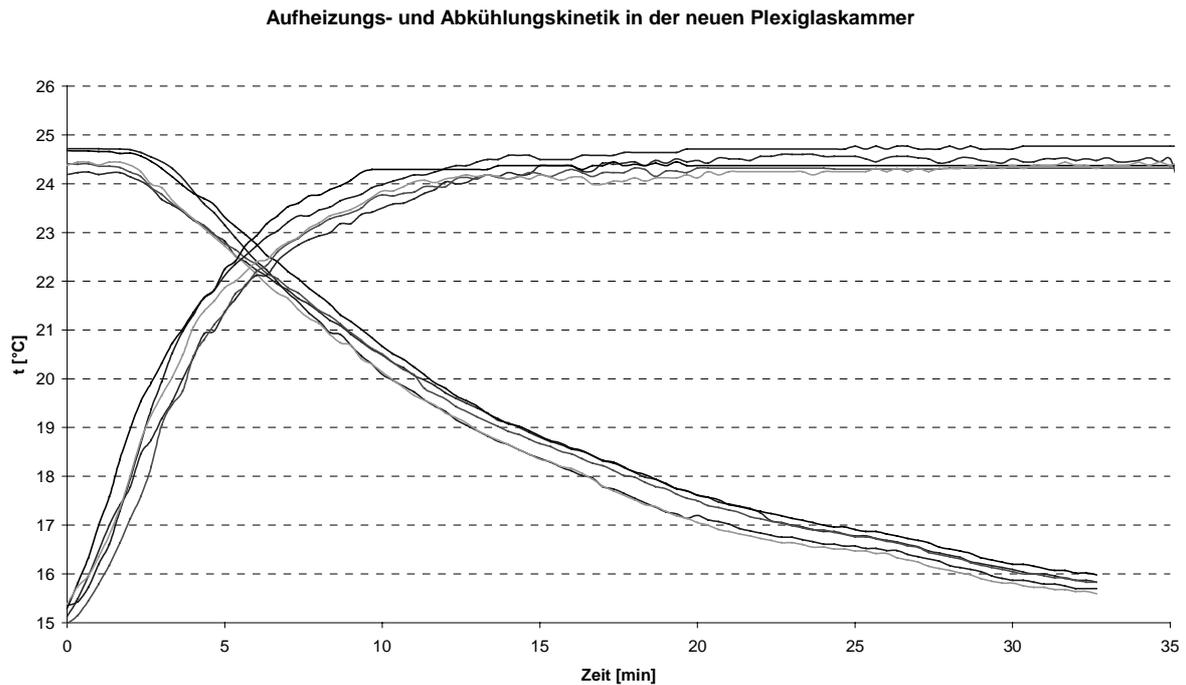


Abb. 12: Temperaturverlauf während der Aufheizungs- und Abkühlungsphase in der neuen Plexiglaskammer. Die Temperaturen wurden auf Pflanzhöhe an fünf verschiedenen Punkten der Kammer gleichzeitig gemessen. Braun: vorne rechts; blau: vorne links; rot: Mitte; schwarz: hinten rechts; grün: hinten links.

3.2 Morphologie

3.2.1 Einfluss von Hitzeschockbehandlungen

Es wurden 15 verschiedene Pflanzenarten unter zyklischen Hitzeschockbedingungen (HS-Bedingungen) angezogen. Einige Spezies zeigten eine vom *Etiollement* charakteristisch abweichende Morphologie (Kloppstech *et al.*, 1991; Beator *et al.*, 1992), während andere keine signifikanten Unterschiede zu etiolierten Pflanzen zeigten. Zur ersten Gruppe zählten Gerste, Weizen, Roggen, Mais (*Poaceae*) sowie Erbse und Soja (*Fabaceae*). Die hitzegeschockten Monokotylen wiesen ähnlich wie die bei Licht gewachsenen Pflanzen hochsignifikant verkürzte Koleoptilen, tendenziell kürzere Primärblätter (Abb. 13) und eine teilweise Primär- und Sekundärblattentfaltung auf (Abb. 16). Die Blattentfaltung war bei dunkel angezogenen Pflanzen von Gerste, Roggen und Weizen (Abb. 17) nur schwach ausgeprägt. Dass dies bei den etiolierten Pflanzen nicht beobachtet werden konnte, belegt, dass die Pflanzen während des Transports keinem Licht ausgesetzt waren, da die Blattentfaltung bereits durch geringste Lichtmengen induziert wird (Viner *et al.*, 1988). Das Koleoptile/Primärblatt-Verhältnis der hitzegeschockten Pflanzen entsprach dem der unter

Licht gewachsenen Pflanzen und war hochsignifikant kleiner, als das der etiolierten Keimlinge (Abb. 14). Beim Mais waren tendenziell die Primärblätter der etiolierten, im Dunkeln bei konstant 25°C gewachsenen Pflanzen kürzer. Allerdings war das Mesokotyl, der Abschnitt zwischen Wurzel und Primärblattbasis, signifikant verlängert (Abb. 15). Bei unter L/D-Bedingungen gewachsenem Mais verfärbten sich die Koleoptilen rötlich (Abb. 16), was auf eine Anthocyanbildung hinweist. Bei Weizen und Roggen trat ebenfalls bei so behandelten Pflanzen eine schwache Rotfärbung der Koleoptilen, besonders aber auch des apikalen Bereichs der Primärblätter auf (Abb. 17).

Die mit Hitzeschock behandelten Pflanzen der Gattungen Erbse und Soja wiesen, mit den unter L/D-Wechsel gezogenen Pflanzen vergleichbar, ein signifikant verringertes Sprosswachstum auf. Dies ging mit einer deutlichen Verkürzung der Internodien in Relation zu etiolierten Keimpflanzen einher. Die Hypokotylhaken begannen sich zu öffnen und die Laubblätter sich zu entfalten (Klopstech, 1990). HS-behandelte Pflanzen wiesen nach 7 Tagen eine Öffnung des Hakens zwischen 140° und 180° auf, während die etiolierten Keimlinge zwischen 30° und 90° streuten. Abb. 18 zeigt exemplarisch die Ergebnisse, die bei Versuchen mit der Erbse erhalten wurden.

Im Gegensatz zu den vorgehend aufgeführten Arten traten bei Raps, Gelbsenf und *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*), Buschbohne, Ackerbohne (*Fabaceae*), Spinat, Gartenkresse, Zuckerrübe (*Chenopodiaceae*) sowie Sonnenblume (*Asteraceae*) keine oder nur geringfügige morphologische Unterschiede als Antwort auf Temperatursprünge auf (ohne Abb.).

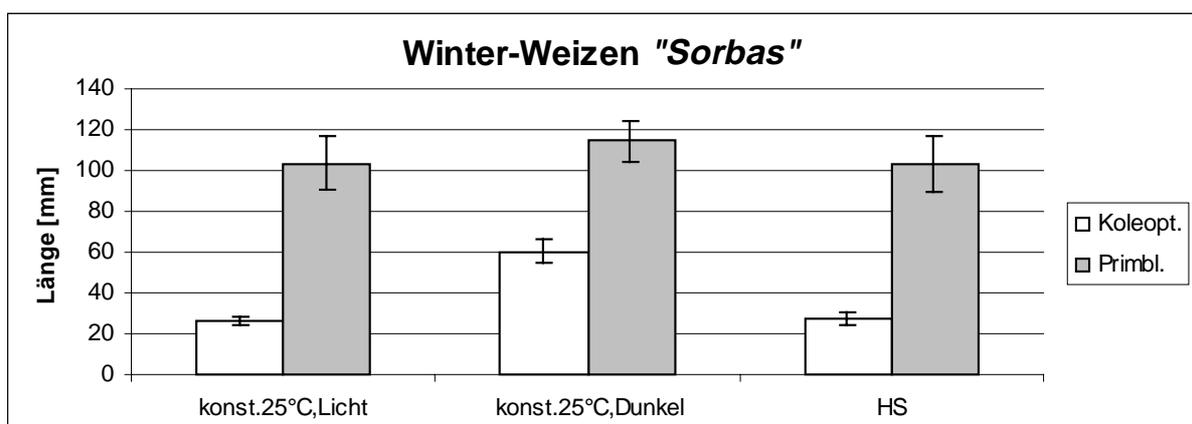


Abb. 13: Wachstum von Weizen unter den verschiedenen Licht- und Temperaturbedingungen. Alle Pflanzen wurden bei 25°C angezogen. Die grünen Pflanzen (Kontrolle) wurden im L/D-Wechsel von 12h/12h und der etiolierte Weizen im Dunkeln angezogen. Die HS-Pflanzen erhielten jeden Tag 1 Stunde einen Hitzeschock von 42°C. Nach 7 Tagen wurden die Längen von Koleoptile und Primärblatt bestimmt (n=65).

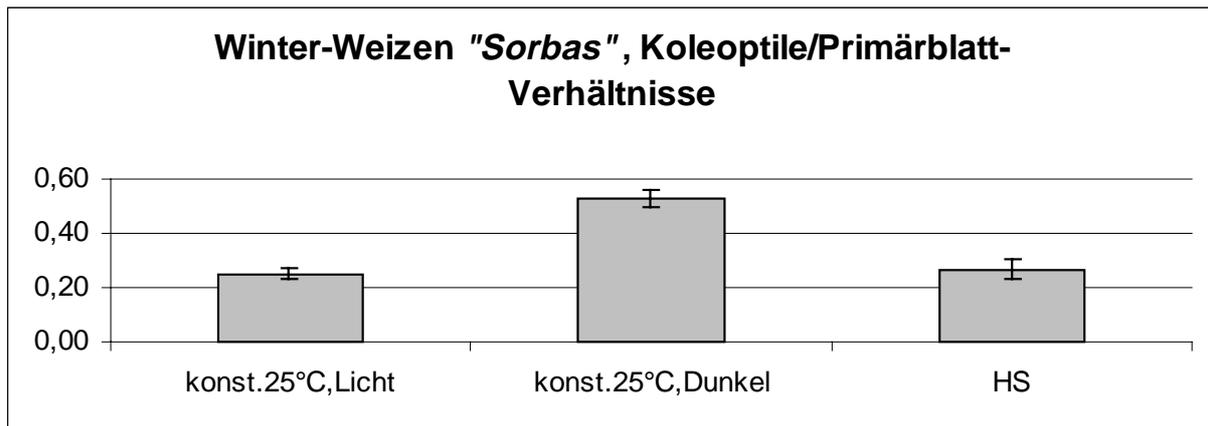


Abb. 14: Koleoptile/Primärblatt-Verhältnisse von unter den verschiedenen Licht- und Temperaturbedingungen gewachsenem Weizen. Die Daten stammen aus dem Experiment, das in Abb. 13 dargestellt ist.

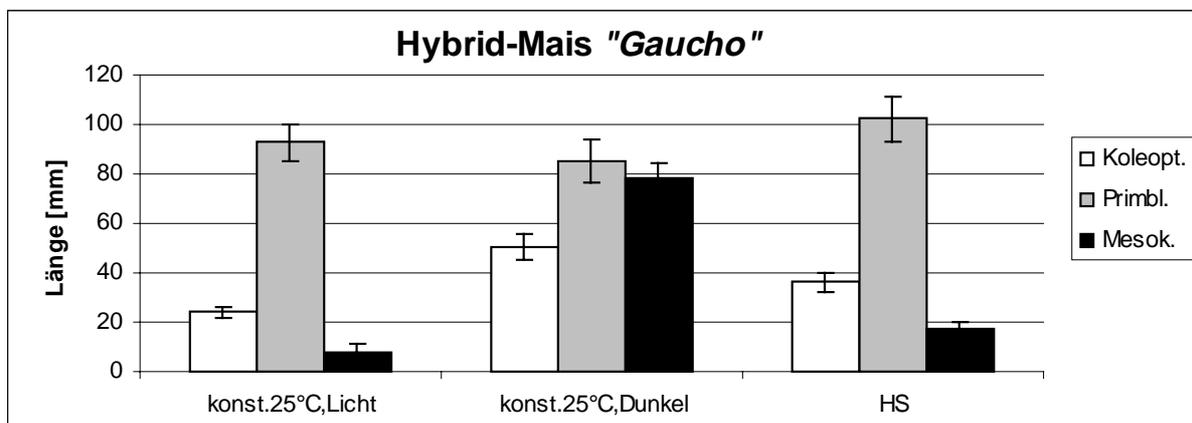


Abb. 15: Wachstum von Mais unter den verschiedenen Licht- und Temperaturbedingungen. Alle Pflanzen wurden bei 25°C angezogen. Die grünen Pflanzen (Kontrolle) wurden im L/D-Wechsel von 12h/12h und der etiolierte Weizen im Dunkeln angezogen. Die HS-Pflanzen erhielten jeden Tag für 1 Stunde einen Hitzeschock von 42°C. Nach 7 Tagen wurden die Längen von Koleoptile, Primärblatt und Mesokotyl bestimmt (n=60).

Abb. 16: Der Effekt von HS-Behandlungen auf die Morphologie des Mais. Alle Pflanzen wurden bei 25°C angezogen. Die grünen Pflanzen (Kontrolle) wurden im L/D-Wechsel von 12h/12h (LD) und die etiolierten Pflanzen im Dunkeln angezogen (D). Die HS-Pflanzen erhielten jeden Tag 1 Stunde einen Hitzeschock von 42°C (HS). Die Aufnahme zeigt 7 Tage alte Pflanzen. Die Pfeile deuten auf das basale (—) und das apikale Ende (····) der Koleoptile.

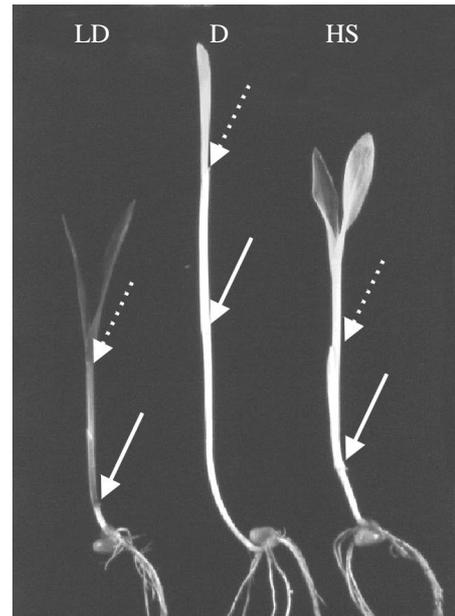


Abb. 17: Der Effekt von HS-Behandlungen auf die Morphologie von Weizen. Die Pflanzen wurden wie in Abb. 16 beschrieben angezogen. Die Aufnahme zeigt 7 Tage alte Pflanzen. Die Pfeile deuten auf das apikale Ende der Koleoptile.

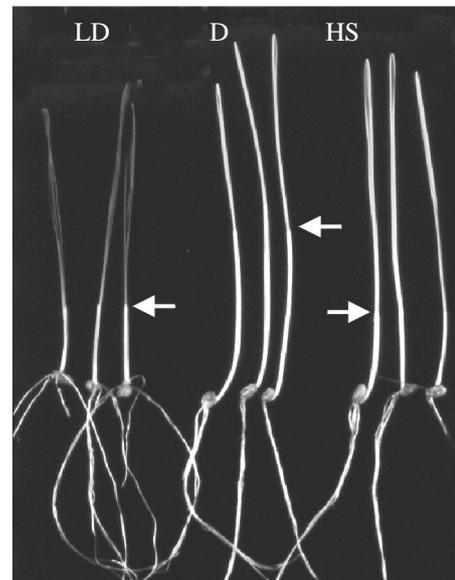
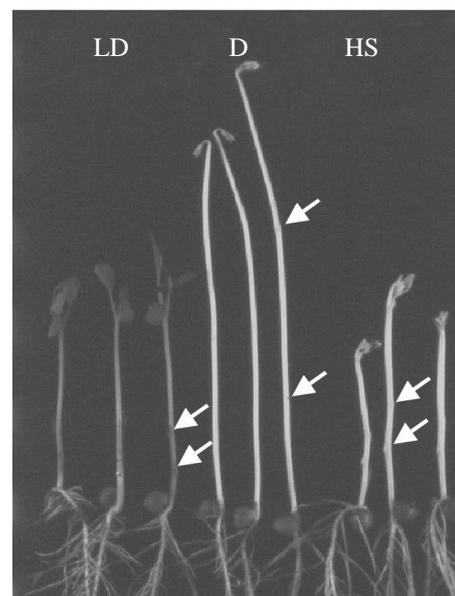


Abb. 18: Der Effekt von HS-Behandlungen auf die Morphologie der Erbse. Die Pflanzen wurden wie in Abb. 16 beschrieben angezogen. Die Aufnahme zeigt 7 Tage alte Pflanzen. Die Pfeile deuten auf die an den Nodien ansetzenden Niederblätter.



3.2.2 Einfluss verschiedener Temperaturprogramme

Bei Anzucht unter verschiedenen Temperaturzyklen wurde bei den Gräsern wie beim applizierten HS ebenfalls eine vom Licht unabhängige "Photomorphogenese" beobachtet, während sich bei den unter konstanter Temperatur (17,5°C bzw. 20°C) gewachsenen Pflanzen der charakteristisch etiolierte Phänotyp ausprägte. Ein Temperaturwechsel (10°C/25°C bzw. 16°C/24°C) erzeugte signifikant verkürzte Koleoptilen und deutlich verkürzte Primärblätter, die leicht entrollt waren (Abb. 19, 20, 23, 25, 26). Bei Mais, der unter verschiedenen Temperaturwechseln gezogen wurde, konnte ebenfalls eine Entfaltung der Primärblätter beobachtet werden. Bei der 12h/12h-Variante waren bei einer Durchschnittstemperatur von 20°C bereits 80% der Blätter entrollt, während dies bei der 2h/2h-Variante erst 3-4 Tage später der Fall war. In einigen Experimenten entwickelten sich längere Blätter als bei den unter konstanten Temperaturbedingungen gewachsenen Pflanzen. Diese Beobachtung war allerdings nicht signifikant. Charakteristisch war dagegen ein hochsignifikant verkürztes Mesokotyl (Abb. 21 und 24).

Ob der Temperaturwechsel zwei- oder zwölfstündlich erfolgte, ergab mit Ausnahme beim Mais keinen signifikanten Unterschied. Lediglich bei der 12h/12h-Variante der Gerste wurde eine tendenziell geringere Elongation der Primärblätter festgestellt. (Abb. 19 und 23). Das Koleoptile/Primärblatt-Verhältnis bei den unter oszillierenden Temperaturen gewachsenen Pflanzen war signifikant kleiner als bei den etiolierten Pflanzen (Abb. 20). Beim Mais war die 2h/2h-Variante zwischen dem etiolierten und dem 12h/12h-Phänotyp einzuordnen (Abb. 21; $K/P_{\text{konst.}} \gg K/P_{2h/2h} > K/P_{12h/12h}$, ohne Abb.). In den Grafiken werden exemplarisch die Ergebnisse dargestellt, die bei den Experimenten mit Gerste und Mais erhalten wurden.

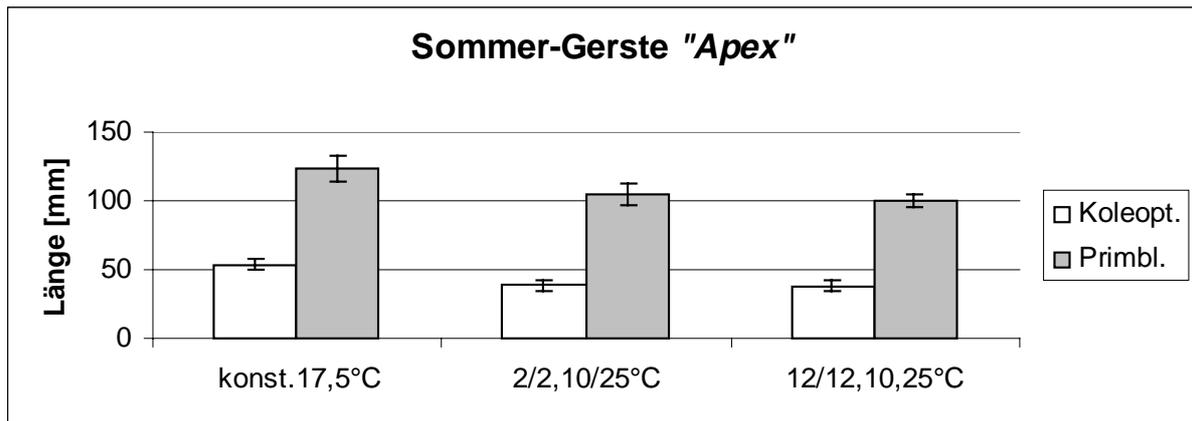


Abb. 19: Wachstum von Gerste unter den verschiedenen Temperaturprogrammen. Die Pflanzen wurden unter 3 Temperaturprogrammen bei einer Durchschnittstemperatur von 20°C im Dunkeln angezogen: konstant bei 20°C, im 2h/2h-Wechsel und im 12h/12h-Wechsel jeweils zwischen 16°C und 24°C. Nach 7 Tagen wurden die Längen von Koleoptilen und Primärblättern bestimmt (n=80).

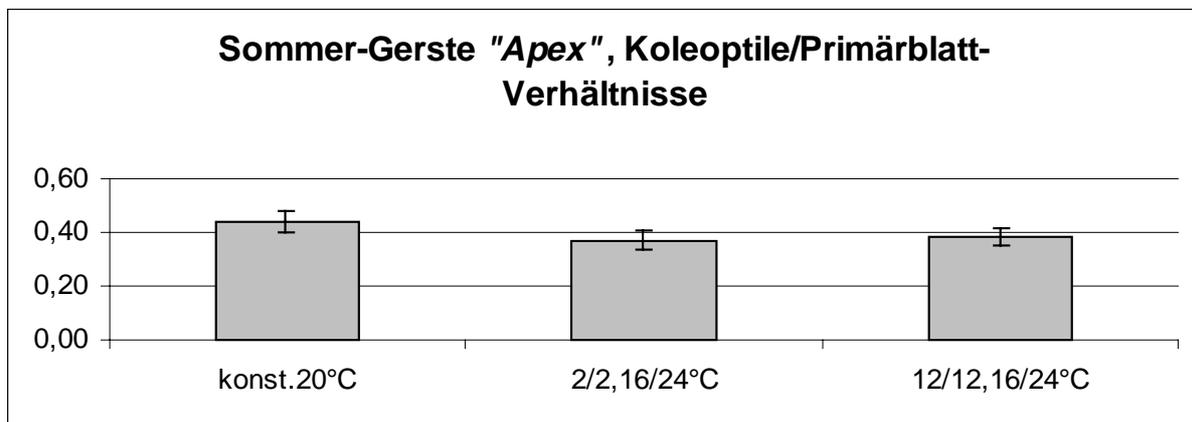


Abb. 20: Koleoptilen/Primärblatt-Verhältnisse von unter den verschiedenen Licht- und Temperaturbedingungen gewachsener Gerste. Die Daten stammen aus dem Experiment, das in Abb. 19 dargestellt ist.

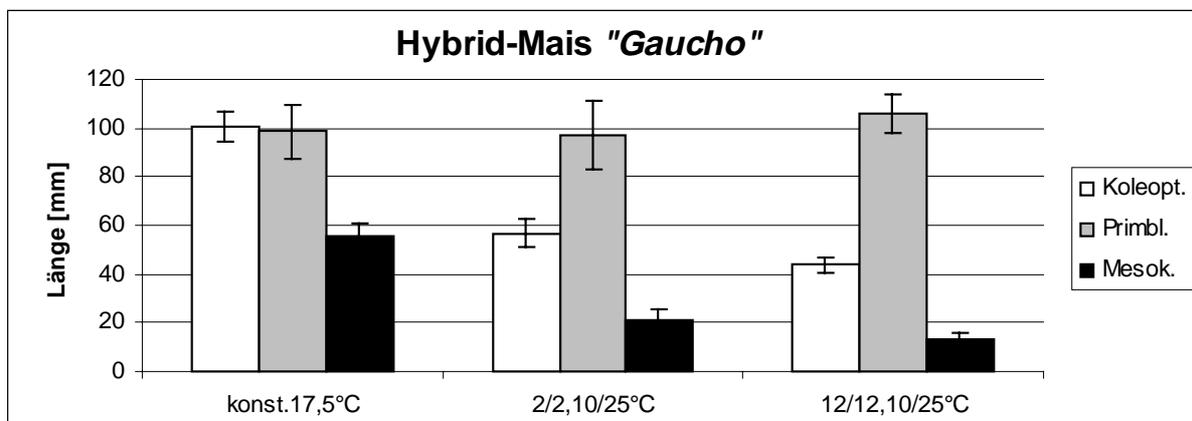


Abb. 21: Wachstum von Mais unter den verschiedenen Temperaturprogrammen. Die Pflanzen wurden unter 3 Temperaturprogrammen bei einer Durchschnittstemperatur von 17,5°C im Dunkeln angezogen: konstant bei 17,5°C, im 2h/2h-Wechsel und im 12h/12h-Wechsel jeweils zwischen 10°C und 25°C. Nach 10 Tagen wurden die Längen von Koleoptilen, Primärblättern und Mesokotyl bestimmt (n=50).

Bei der Beobachtung des Primärblattwachstums der Gerste über 11 Tage wurden ähnliche Verläufe bei L/D-Anzucht und dem Wachstum unter oszillierenden Temperaturen beobachtet. Das Elongationswachstum der unter konstanten Bedingungen gewachsenen Pflanzen verlief deutlich schneller. Es endete gemeinsam mit der 12h/12h- und der 2h/2h-Variante um den 9. Tag. Das Streckungswachstum der Koleoptilen endete bei den im L/D-Wechsel und den unter oszillierenden Temperaturen gewachsenen Pflanzen am 5. Tag nach der Aussaat, während es bei den etiolierten Pflanzen darüber hinaus anhielt.

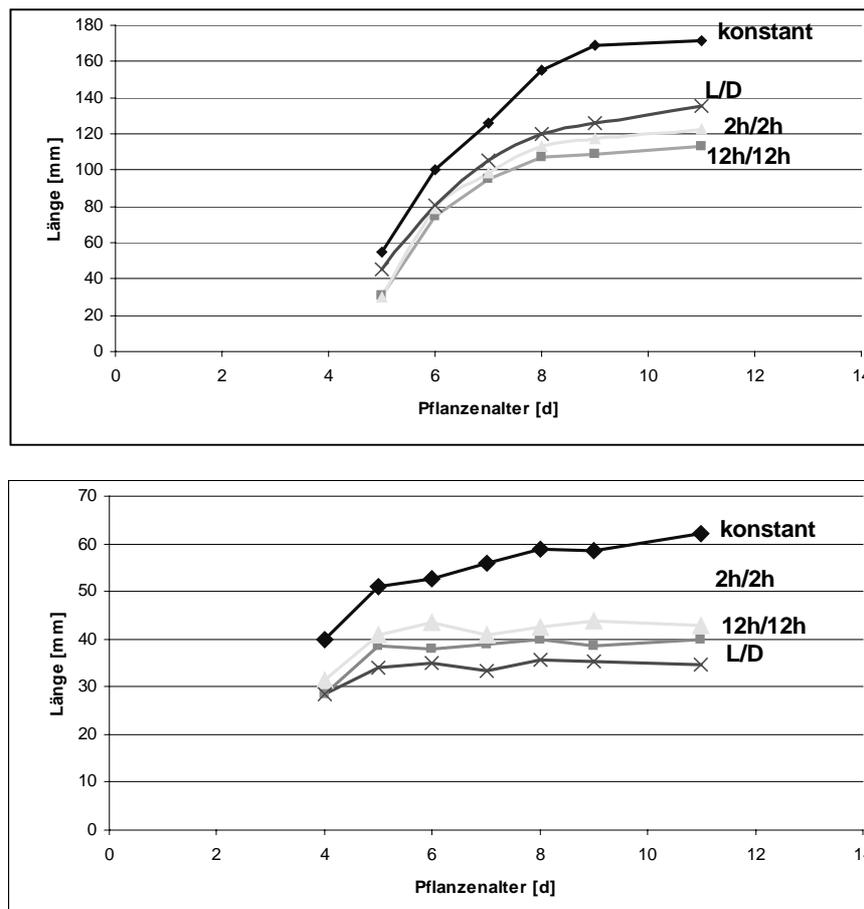


Abb. 22: Entwicklung von Primärblättern und Koleoptilen der Gerste bei Anzucht unter verschiedenen Licht- und Temperaturprogrammen. Die Pflanzen wurden im L/D-Wechsel (12h/12h) bei 20°C (grün) und unter 3 Temperaturprogrammen bei einer Durchschnittstemperatur von 20°C im Dunkeln angezogen: konstant bei 20°C (blau), im 2h/2h-Wechsel (gelb) und im 12h/12h-Wechsel (rot) jeweils zwischen 16°C und 24°C. Während 4 bis 11 Tagen wurden die Längen von Primärblättern (oben) und Koleoptilen (unten) bestimmt. In allen Fällen waren die Standardabweichungen bei den Primärblättern kleiner als 6 mm und bei den Koleoptilen kleiner als 3 mm (n=60).

Die unter verschiedenen oszillierenden Temperaturbedingungen gezogenen Pflanzen der Gattungen Erbse und Soja wiesen vergleichbar mit den unter HS-Bedingungen gezogenen

Pflanzen ein hochsignifikant verringertes Sprosswachstum mit einer deutlichen Verkürzung der Internodien in Relation zu etiolierten, bei konstanter Temperatur gewachsenen Keimpflanzen auf. Die Hypokotylhaken begannen sich zu öffnen und die Laubblätter sich zu entfalten (Kloppstech, 1990). Nach 11 Tagen wurde eine Öffnung des Hakens zwischen 140° und 180° beobachtet, während die etiolierten Keimlinge zwischen 0° und 90° (Erbse) bzw. 50° und 90° (Soja) streuten. Die Experimente wurden auch mit 13 verschiedenen Erbsensorten durchgeführt, bei denen keine signifikanten Unterschiede beobachtet wurden. Abb. 27 zeigt exemplarisch die Ergebnisse, die bei Versuchen mit der Erbse (Sorte 'Rosakrone') erhalten wurden.

Keine oder nur geringfügige Unterschiede traten bei Raps (Abb. 28), Gelbsenf und *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*), Buschbohne, Ackerbohne (*Fabaceae*), Spinat, Gartenkresse, Zuckerrübe (*Chenopodiaceae*) sowie Sonnenblume (*Asteraceae*) auf (ohne Abb.).

Abb. 23: Der Effekt von Temperaturbehandlungen auf die Morphologie der Gerste. Die Pflanzen wurden im Dunkeln bei konstanter Temperatur (20°C, Kontrolle), bei 2h/2h = 16°C/24°C und bei 12h/12h = 16°C/24°C angezogen. Koleoptilen und Primärblätter wurden voneinander getrennt. Die Aufnahme zeigt 7 Tage alte Pflanzen.

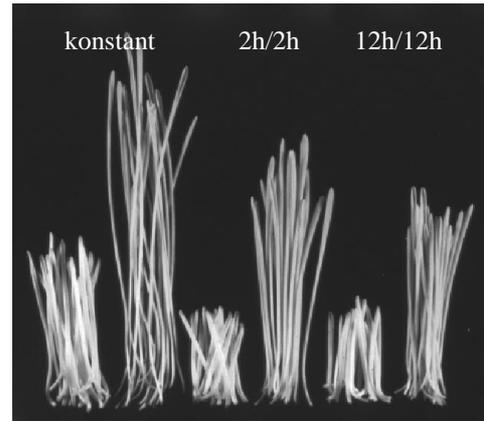


Abb. 24: Der Effekt von Temperaturbehandlungen auf die Morphologie des Mais. Die Pflanzen wurden wie in Abb. 23 beschrieben angezogen. Die Pfeile zeigen den Übergang zwischen Mesokotyl und Koleoptile. Die Aufnahme zeigt 14 Tage alte Pflanzen.

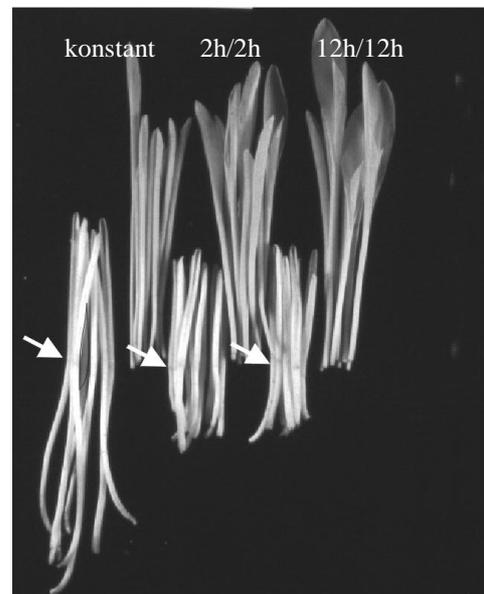


Abb. 25: Der Effekt von Temperaturbehandlungen auf die Morphologie von Roggen. Die Pflanzen wurden wie in Abb. 23 beschrieben angezogen. Die Aufnahme zeigt 7 Tage alte Pflanzen.



Abb. 26: Der Effekt von Temperaturbehandlungen auf die Morphologie von Weizen. Die Pflanzen wurden im Dunkeln bei konstanter Temperatur (20°C, Kontrolle), bei 2h/2h = 16°C/24°C und bei 12h/12h = 16°C/24°C im Dunkeln angezogen. Koleoptilen und Primärblätter wurden voneinander getrennt. Die Aufnahme zeigt 10 Tage alte Pflanzen.

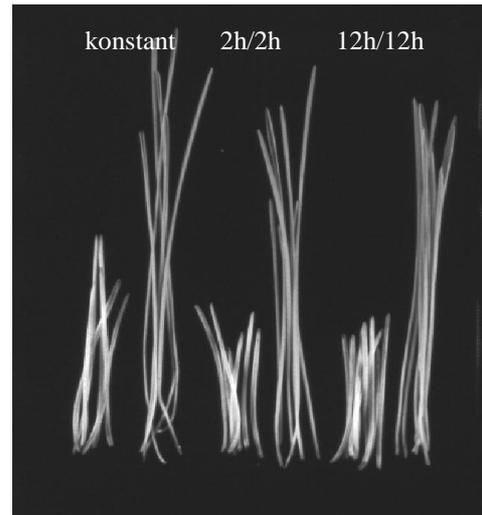
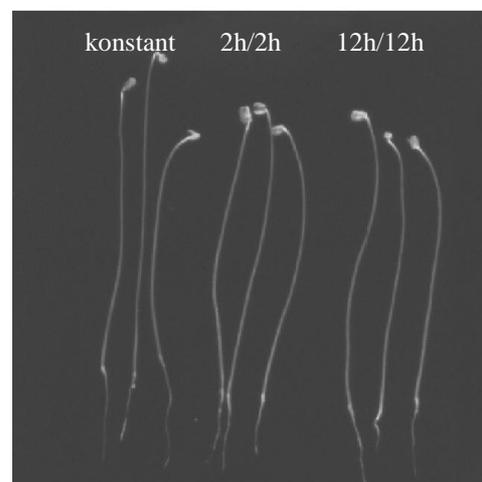


Abb. 27: Der Effekt von Temperaturbehandlungen auf die Morphologie der Erbse. Die Pflanzen wurden wie in Abb. 26 beschrieben angezogen. Die Aufnahme zeigt 11 Tage alte Pflanzen. Die Pfeile deuten auf die an den Nodien ansetzenden Niederblätter.



Abb. 28: Der Effekt von Temperaturbehandlungen auf die Morphologie von Raps. Die Pflanzen wurden wie in Abb. 26 beschrieben angezogen. Die Aufnahme zeigt 8 Tage alte Pflanzen.



3.3 Der Einfluss von Hitzeschockbehandlung auf die Chlorophyllakkumulation

Zur Analyse der Ergrünungsfähigkeit von zyklisch hitzegeschockter Gerste, Mais und Erbse zu verschiedenen Zeiten, wurden Pflanzen entsprechend dem unter 2.2.1.2.1 beschriebenen HS Programm angezogen und alle 4 Stunden eine Anzahl Pflanzen für 4 Stunden bei einer konstanten Temperatur von 25°C belichtet (2.2.1.3.1). Die Blätter wurden dann geerntet, unter flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert und die Pigmente extrahiert. Die Messung erfolgte spektralphotometrisch in Aceton.

Die Ergebnisse solcher Experimente sind in Abb. 29 gezeigt. Sie belegen, dass die Fähigkeit zur Chlorophyll a-Akkumulation circadianen Schwankungen unterworfen ist. Bei allen 3 Arten wurden keine signifikanten Unterschiede in der Acrophase gemessen. Sie oszillierte bei allen untersuchten Arten anfänglich um den Faktor 2 und zeigte im Verlauf der zweiten Periode eine Dämpfung der Amplitude.

Als Kontrolle dienten etiolierte Pflanzen, die ohne HS angezogen wurden. Sie wurden mit etwa gleichem Pflanzenalter wie die hitzegeschockten Pflanzen den gleichen Belichtungsbedingungen ausgesetzt. Das Ergebnis zeigte keine Oszillationen, sondern lediglich eine schwache, kontinuierliche Abnahme der Fähigkeit zur Chlorophyllakkumulation. Die Abnahme erfolgte bei Wiederholungsexperimenten mit leicht unterschiedlicher Kinetik (ohne Abb.).

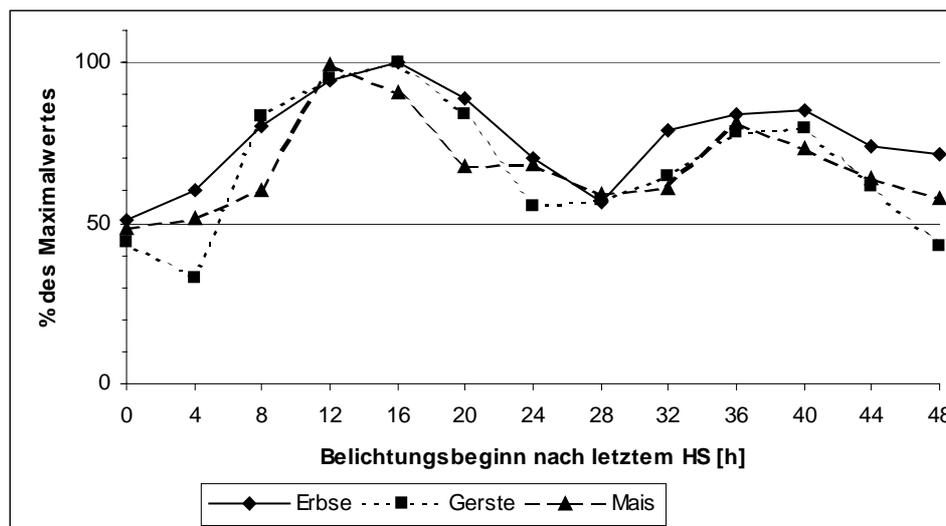


Abb. 29: Circadiane Chlorophyll a Akkumulation nach zyklischem HS. Gerste, Mais und Erbsen wurden im Dunkeln bei konstant 25°C angezogen und erhielten alle 24 Stunden einen HS von 42°C. Am 8. Tag wurden alle 4 Stunden jeweils ein Teil der Pflanzen für 4 Stunden mit ca. $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ belichtet und die Blätter anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.4 Der Einfluss verschiedener Temperaturprogramme

3.4.1 Spektralphotometrische Chlorophyllanalyse

3.4.1.1 Ergrünungskinetik

Zur Optimierung der Pigmentanalyse wurde Gerste 7 Tage bzw. 9 Tage im zwölfstündigen Wechsel zwischen 16°C und 24°C bzw. 10°C und 25°C im Dunkeln angezogen (12h/12h = 16°C/24°C bzw. 10°C/25°C). Danach wurden Gruppen 12, 14 oder 16 Stunden bzw. 24, 26 oder 28 Stunden bei 20°C bzw. 17,5°C inkubiert und im folgenden 0 bis 7 Stunden belichtet ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Diese Zeiten nach Ablauf des Temperaturprogramms wurden gewählt, weil erste Versuche zur Chlorophyll a-Akkumulation mit einer Belichtungszeit von 6 Stunden in diesen Zeitintervallen ein erstes Maximum bzw. Minimum aufzeigten. Jede Stunde ab Beginn der Belichtung wurden Pflanzen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Chlorophyllextraktion bei -70°C gelagert.

Nach einer Stunde Belichtung während des Maximums der Chlorophyll a-Akkumulation war bereits ein Unterschied zur Akkumulation während des Minimums erkennbar. Mit zunehmender Belichtung stieg der Chlorophyll a-Gehalt kontinuierlich an. Die Ergrünungskinetik im Minimum zeigte während der ersten zwei Belichtungsstunden kaum einen Anstieg der Akkumulation. Zwischen 5 und 7 Stunden Belichtung kam es dagegen nochmals zu einer Zunahme der Akkumulationsgeschwindigkeit.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in den folgenden Oszillationsexperimenten die Belichtungszeit zur Induktion der Bildung der Photosynthese-assoziierten Pigmente und Proteine von 6 Stunden auf 4 Stunden verkürzt, da hier eine deutlichere Differenz zwischen Chlorophyll a Akkumulation im Maximum und Minimum bestand. Abb. 30 zeigt exemplarisch das Ergebnis nach Anzucht bei 12h/12h = 16°C/24°C und Belichtung nach 12 Stunden bzw. 24 Stunden Inkubation bei 20°C.

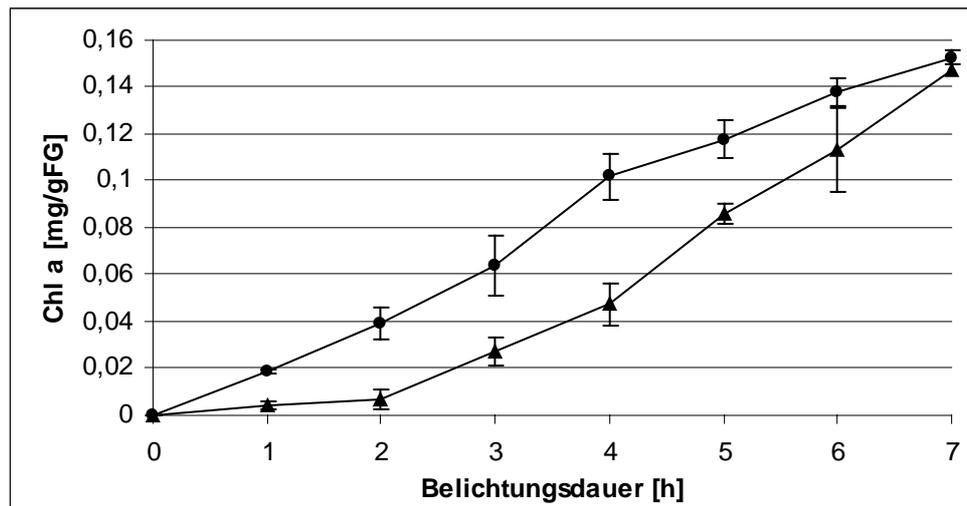


Abb. 30: Kinetik der Chlorophyll a Akkumulation. Gerste wurde 7 Tage bei 12h/12h = 16°C/24°C angezogen. 12 Stunden (●) bzw. 24 Stunden (▲) nach Beendigung des Temperaturprogramms wurden die Pflanzen mit $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ belichtet und die apikalen 6 cm des Primärblattes mit eingeschlossenem Sekundärblatt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Experiment wurde zweimal wiederholt.

3.4.1.2 Chlorophyllakkumulation

Zur Analyse der Ergrünungsfähigkeit von Gerste, die unter periodisch schwankenden Temperaturen angezogen wurde, wurde zu verschiedenen Zeiten eine Anzahl Pflanzen für 4 Stunden bei konstanter Temperatur belichtet (Abb. 6). Die Pflanzen wurden danach geerntet und unter flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert. Danach erfolgte die Einwaage des Frischgewichts (FG) des pulverisierten Materials und die Extraktion der Pigmente. Die Messung erfolgte spektralphotometrisch in Aceton.

Die Pflanzenentnahme zur Belichtung erfolgte zum einen während des Ablaufs der Temperaturosillationen (diurnale Bedingungen) und zum zweiten während der freilaufenden Bedingungen (circadiane Bedingungen).

a) Chlorophyllakkumulation nach vierstündiger Belichtung während des *Entrainments*

Gerste, die unter dem 12h/12h-Temperaturprogramm heranwuchs und einen vom *Etiollement* abweichenden Phänotyp aufwies (3.2.2), zeigte ausgeprägte diurnale Oszillationen in der Fähigkeit Chlorophyll a und b zu akkumulieren. Die Chlorophyllgehalte pro g FG variierten bei Chlorophyll a, wie auch Chlorophyll b, zwischen Maximum und Minimum um den

Faktor 9. Das Maximum der Chlorophyllakkumulation lag am Ende der Kältephase, das Minimum am Ende der Wärmephase ($\tau = 24$ h). Bei Pflanzen, die unter dem 2h/2h-Temperaturprogramm angezogen wurden und bei denen ebenfalls eine morphologische Abweichung vom etiolierten Phänotyp beobachtet wurde (3.2.2), konnten dagegen keine Oszillation nachgewiesen werden. Unter konstanten Anzuchtbedingungen, die etiolierte Phänotypen hervorbringen, zeigten die Chlorophyllwerte ebenfalls keine messbaren Oszillationen (Abb. 31).

Bei allen Experimenten verliefen die Kurven für Chlorophyll a und b nahezu synchron. Die absoluten Chlorophyll a- und b-Werte in $\text{mg} \cdot \text{g FG}^{-1}$, die bei der Analyse gleichaltriger Pflanzen in den drei Versuchsansätzen erhalten wurden, waren bei der unter dem 12h/12h-Temperaturprogramm gewachsenen Gerste im Maximum während der Kältephase ca. zweimal größer, als bei den Pflanzen, die unter dem 2h/2h-Temperaturprogramm und unter konstanten Temperaturbedingungen gewachsen waren.

Abb. 32 zeigt das Ergebnis eines Einzelexperiments. Es unterscheidet sich vom vorherigen dadurch, dass über einen Zeitraum von nur maximal 32 Stunden die Chlorophyll a-Akkumulation beobachtet wurde und von den Keimpflanzen, die bei Temperaturoszillationen von 2h/2h = 16°C/24°C gezogen wurden, eine größere Anzahl Stichproben pro Zeitintervall untersucht wurde.

Gerste, die unter dem 12h/12h-Temperaturprogramm heranwuchs, zeigte wiederum ausgeprägte diurnale Oszillationen in der Fähigkeit Chlorophyll a zu akkumulieren. Die Chlorophyllgehalte pro g FG variierten bei Chlorophyll a zwischen Maximum und Minimum um den Faktor 5. Bei den Pflanzen, die unter dem 2h/2h-Temperaturprogramm gezogen wurden, wurde in diesem Experiment ebenfalls die Tendenz zur rhythmischen Chlorophyll a-Akkumulation mit einer Periodenlänge $\tau = 23,2$ Stunden beobachtet. Die berechnete Amplitude fällt bei relativ großer Streuung der Einzelwerte um den Mesor deutlich gedämpft aus.

Pflanzen, die im Dunkeln bei konstanten 20°C angezogen wurden, zeigten keine rhythmischen Schwankungen und eine geringere Streuung der Einzelwerte bei der Fähigkeit, Chlorophyll a zu akkumulieren.

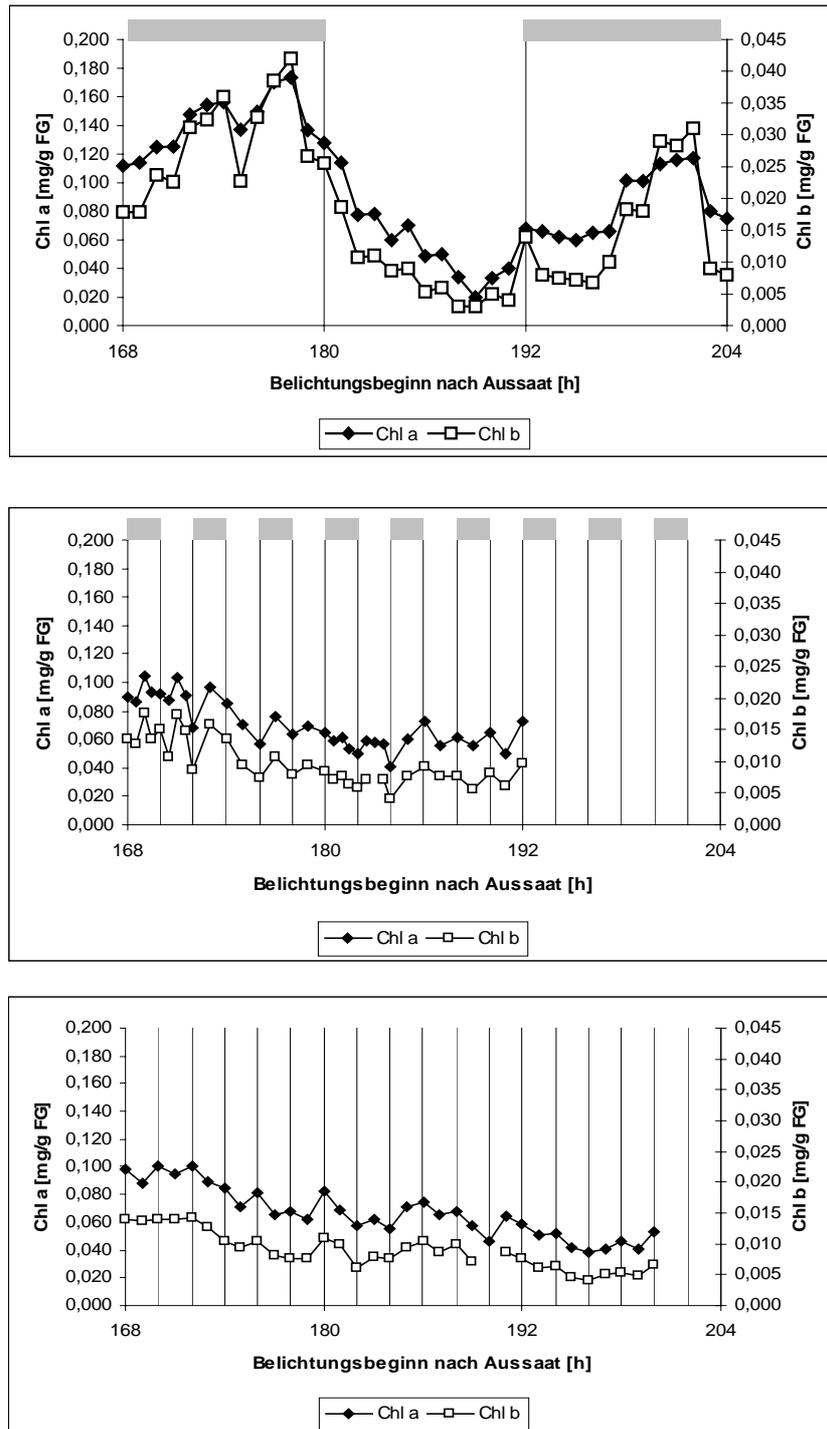


Abb. 31: Chlorophyllakkumulation nach Belichtung während des *Entrainments*. Gerste wurde im Dunkeln bei 12h/12h = 16°C/24°C (oben), 2h/2h = 16°C/24°C (Mitte) und konstant 20°C (unten) angezogen. Am 8. Tag wurden in definierten Zeitintervallen jeweils ein Teil der Pflanzen für 4 Stunden mit ca. $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ belichtet und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Balken geben die Zeitintervalle der exogenen Temperaturen an (grauer Balken = 16°C, weißer Balken = 24°C).

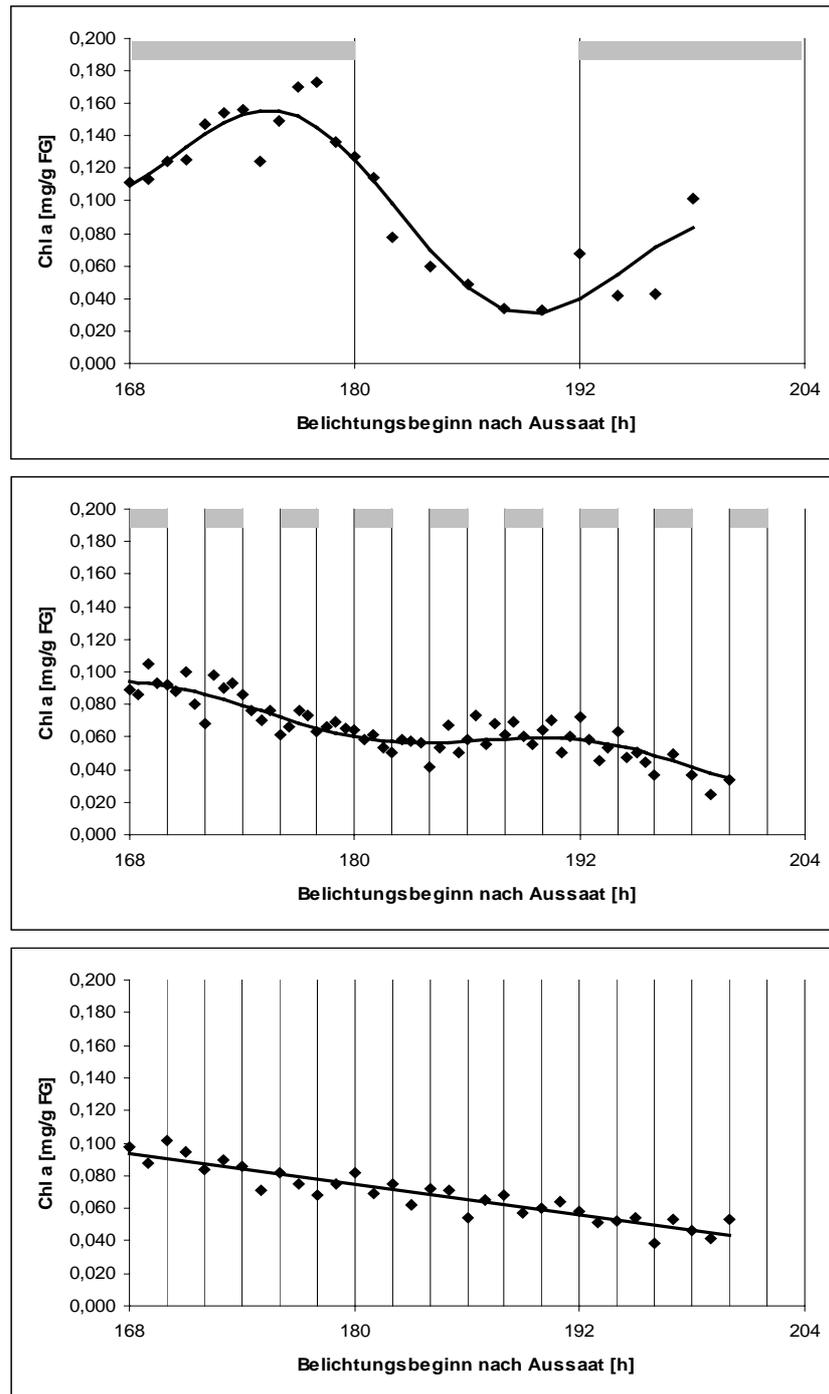


Abb. 32: Chlorophyllakkumulation nach Belichtung während des *Entrainments*. Gerste wurde wie in Abb. 31 beschrieben angezogen, belichtet und die apikalen Bereiche der Primärblätter in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die schwarze Linie zeigt das Ergebnis der Kosinor-Analyse. Die Balken geben die Zeitintervalle der exogenen Temperaturen an (grauer Balken = 16°C, weißer Balken = 24°C).

b) Chlorophyllakkumulation nach vierstündiger Belichtung während der freilaufenden Bedingungen

Gerste unter dem 12h/12h-Temperaturprogramm gewachsen, zeigte ausgeprägte circadiane Oszillationen in der Fähigkeit Chlorophyll a und b zu akkumulieren. Die Chlorophyllgehalte pro g FG variierten bei Chlorophyll a und b zwischen Maximum und Minimum um den Faktor 3. Das Maximum der Chlorophyllakkumulation lag zu Beginn der Wärmephase, das Minimum zu Beginn der Kältephase ($\tau = 25,4$ h). Im Vergleich zur Fähigkeit der Chlorophyllakkumulation bei Wachstum unter diurnalen Bedingungen fand eine deutliche Dämpfung der Amplitude und eine signifikante Änderung der Periodenlänge τ statt ($\Delta\tau = +1,4$ h). Bei Pflanzen, die unter dem 2h/2h-Temperaturprogramm und bei einer konstanten Temperatur angezogen wurden, konnten keine Oszillationen nachgewiesen werden (Abb. 33). Entlang der Zeitachse wurde eine stetige Abnahme des Chlorophyllgehalts pro g FG gemessen, am deutlichsten ausgeprägt bei den unter konstanten Bedingungen gewachsenen Pflanzen. Dies zeigen die Verläufe des mittleren Werts der Kosinuskurve (Mesor) bzw. der Regressionsgeraden. Die Bestimmung der Trockengewichtsanteile in % FG zeigte, dass als Ursache das Elongationswachstum während der Dunkelheit angenommen werden kann, das unter konstanten Temperaturbedingungen am stärksten ausgeprägt ist (ohne Abb.). Die absoluten Chlorophyll a- und b-Werte in $\text{mg}\cdot\text{g FG}^{-1}$ bei der unter dem 12h/12h-Temperaturprogramm gewachsenen Gerste im Maximum waren im Vergleich zu denen bei dem 2h/2h-Temperaturprogramm und bei konstanten Temperaturbedingungen gewachsenen Pflanzen nur gering größer.

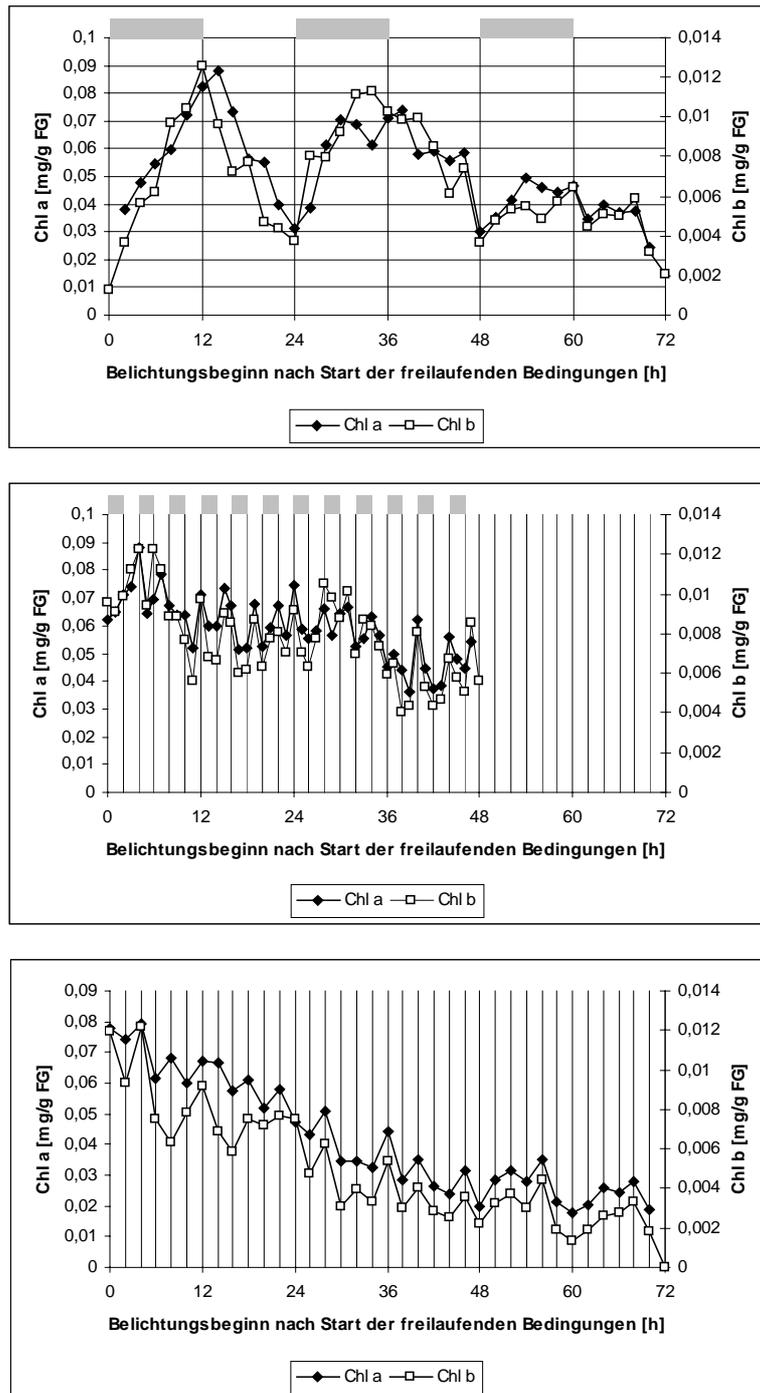


Abb. 33: Chlorophyllakkumulation nach Belichtung während der freilaufenden Bedingungen. Gerste wurde im Dunkeln bei 12h/12h = 16°C/24°C (oben), 2h/2h = 16°C/24°C (Mitte) und konstant 20°C (unten) angezogen. Am 9. Tag wurden alle Pflanzen bei 20°C inkubiert und es wurden in definierten Zeitintervallen jeweils ein Teil der Pflanzen für 4 Stunden mit ca. $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ belichtet und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Balken geben die Zeitintervalle der subjektiven Temperaturen an (grauer Balken = subjektiv 16°C, weißer Balken = subjektiv 24°C).

In beiden Versuchsansätzen, unter diurnalen als auch freilaufenden Bedingungen, wurden bei den Pflanzen, die unter dem 2h/2h-Temperaturprogramm als auch bei denen, die unter

konstanten Temperaturen angezogen wurden, zwischen jeweils zwei benachbarten zeitlich versetzten Messpunkten Schwankungen in der Chlorophyllakkumulation gemessen. Sie sind nicht in jedem Fall allein durch Probenaufarbeitungs- und Messungenauigkeiten zu erklären. In Vorversuchen wurde eine Standardabweichung von ca. 3% bei drei Parallelproben ermittelt (ohne Abb.).

3.4.2 HPLC-Pigmentanalyse

Zur Kontrolle der Ergebnisse, die mit der spektralphotometrischen Chlorophyllanalyse erhalten wurden (3.4.1), und zur Untersuchung der Carotinoide wurden die Proben eines Experimentes einer HPLC-Analyse unterworfen. Ein typisches reverse-Phasen HPLC Chromatogramm zeigt Abb. 34.

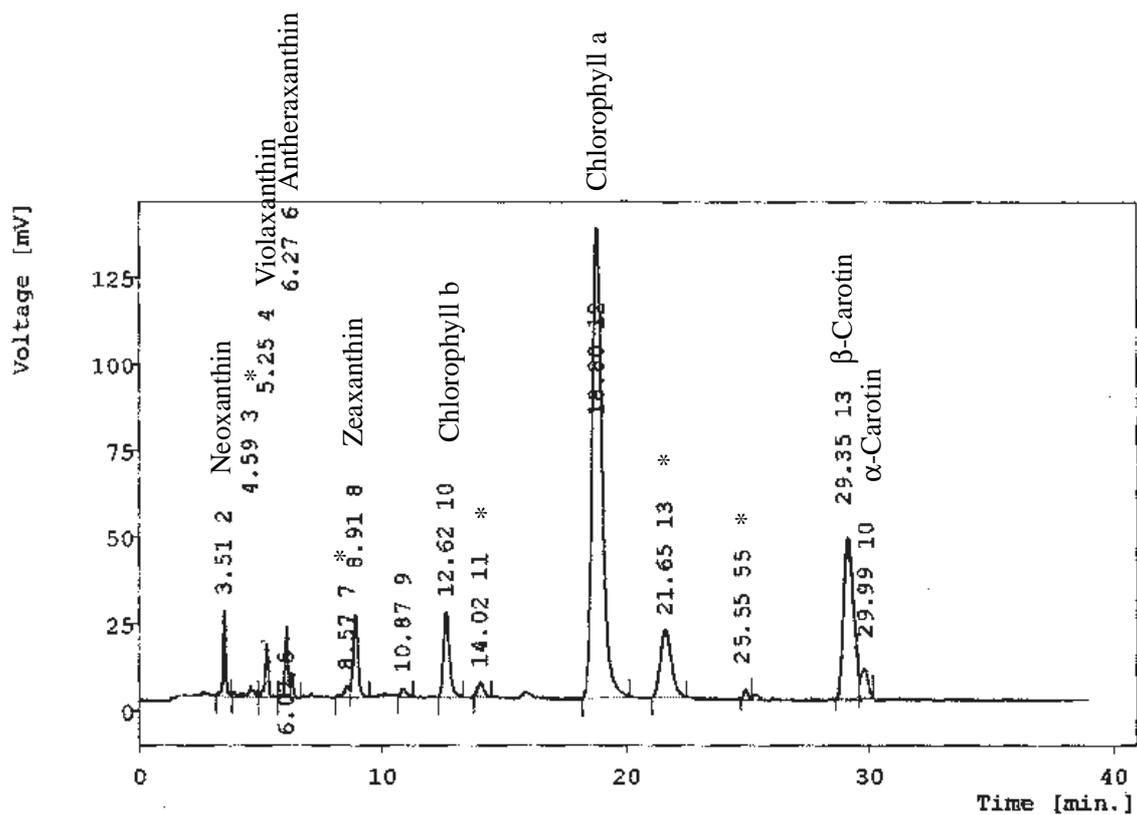


Abb. 34: Reverse-Phasen HPLC Chromatogramm. Gerste wurde im Dunkeln bei 12h/12h = 16°C/24°C, 2h/2h = 16°C/24°C und konstant 20°C angezogen. Am 9. Tag wurden alle Pflanzen bei 20°C inkubiert, in definierten Zeitintervallen jeweils ein Teil der Pflanzen für 4 Stunden mit ca. 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ belichtet und die Pigmente extrahiert. Das Chromatogramm wurde bei einer Detektionswellenlänge $\lambda = 431 \text{ nm}$ aufgezeichnet (* = nicht identifizierte Peaks).

Die Ergebnisse der HPLC-Analytik zur Akkumulationsfähigkeit von Chlorophyll a und b bestätigten die in 3.4.1.2 beschriebenen Resultate. Die Maxima der Akkumulation lagen zu Beginn der Wärmephase, die Minima zu Beginn der Kältephase. Beim β -Carotin wurde ein ähnlicher Kurvenverlauf mit geringerer Amplitude während der ersten 30 Stunden Wachstum unter freilaufenden Bedingungen ermittelt. Danach waren keine Oszillationen mehr erkennbar. Bei den übrigen Carotinoiden konnte kein Akkumulationsmuster nachgewiesen werden. Exemplarisch werden die Ergebnisse für Lutein dargestellt (Abb. 35). Bei Pflanzen, die unter dem 2h/2h-Temperaturprogramm und bei einer konstanten Temperatur angezogen wurden, konnten keine Oszillationen nachgewiesen werden (ohne Abb.). Da das Experiment nur einmal durchgeführt wurde und die Zeitintervalle zwischen den Probennahmen bei der 12h/12h-Variante vergleichsweise groß gewählt wurden, wurde auf eine Berechnung der Kurvenparameter verzichtet.

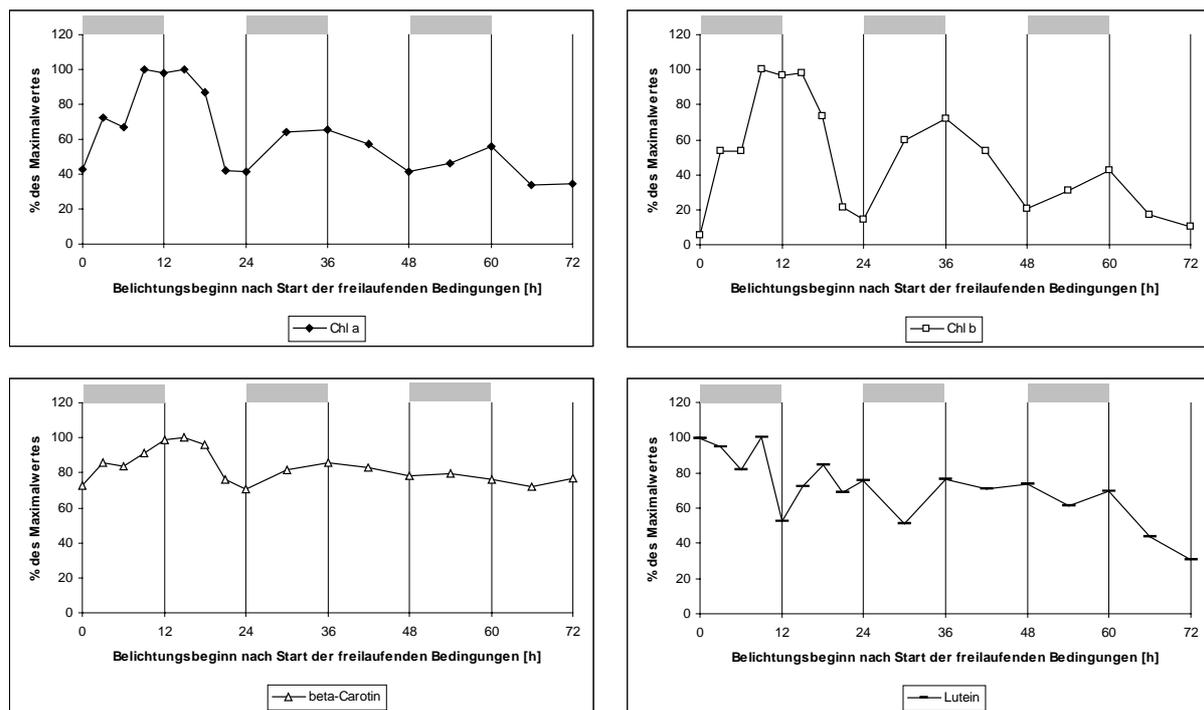


Abb. 35: Pigmentakkumulation nach Belichtung während der freilaufenden Bedingungen. Gerste wurde im Dunkeln bei 12h/12h = 16°C/24°C angezogen. Am 9. Tag wurden alle Pflanzen bei 20°C inkubiert und es wurden in definierten Zeitintervallen jeweils ein Teil der Pflanzen für 4 Stunden mit ca. $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ belichtet und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Balken geben die Zeitintervalle der subjektiven Temperaturen an (grauer Balken = subjektiv 16°C, weißer Balken = subjektiv 24°C). Die Pigmente wurden mit einer reverse-Phasen HPLC aufgetrennt, photometrisch bei einer Detektionswellenlänge $\lambda = 431 \text{ nm}$ gemessen und die Peakflächen ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden als „% des Maximalwertes“ angegeben.

3.4.3 mRNA-Akkumulation

Zur Analyse der LHCII und SSU mRNA Gehalte von Gerste, die unter periodisch schwankenden Temperaturen angezogen wurde, wurde zu verschiedenen Zeiten eine Anzahl Pflanzen geerntet und unter flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert. Danach erfolgte die Isolation von poly(A⁺) RNA bzw. Gesamt-RNA. Die Pflanzenentnahme zur Belichtung erfolgte während des Ablaufs der Temperaturoszillationen und während der freilaufenden Bedingungen.

a) mRNA-Akkumulation während des *Entrainments*

Für LHCII wurde bei Gerste, die bei einem 12h/12h-Temperaturwechsel angezogen wurde, eine diurnale Rhythmik bei der mRNA-Akkumulation nachgewiesen. Das Maximum einer Periode lag am Ende der Kälteperiode und das Minimum am Ende der Wärmeperiode. Die LHCII mRNA-Menge von Pflanzen, die beim 2h/2h-Wechsel und bei konstanter Temperatur wuchsen, war keinen rhythmischen Schwankungen unterworfen. Über 1,5 Tage wurde eine deutliche Abnahme innerhalb der Gesamt-RNA gemessen.

Bei der SSU mRNA wurde durch einen 12h/12h-Wechsel ebenfalls eine Rhythmik induziert. Die Maxima lagen zu Beginn der Kälteperiode. Die Minima innerhalb der Wärmeperiode waren nicht eindeutig zu bestimmen. Die Rhythmik verlief mit deutlich gedämpfter Amplitude. Bei Pflanzen, die bei einem 2h/2h-Temperaturwechsel und bei konstanten Temperaturen angezogen wurden, konnten keine rhythmischen Akkumulationsmuster nachgewiesen werden. Wie bei der LHCII mRNA wurde über den Messzeitraum eine deutliche Abnahme innerhalb der Gesamt-RNA gemessen.

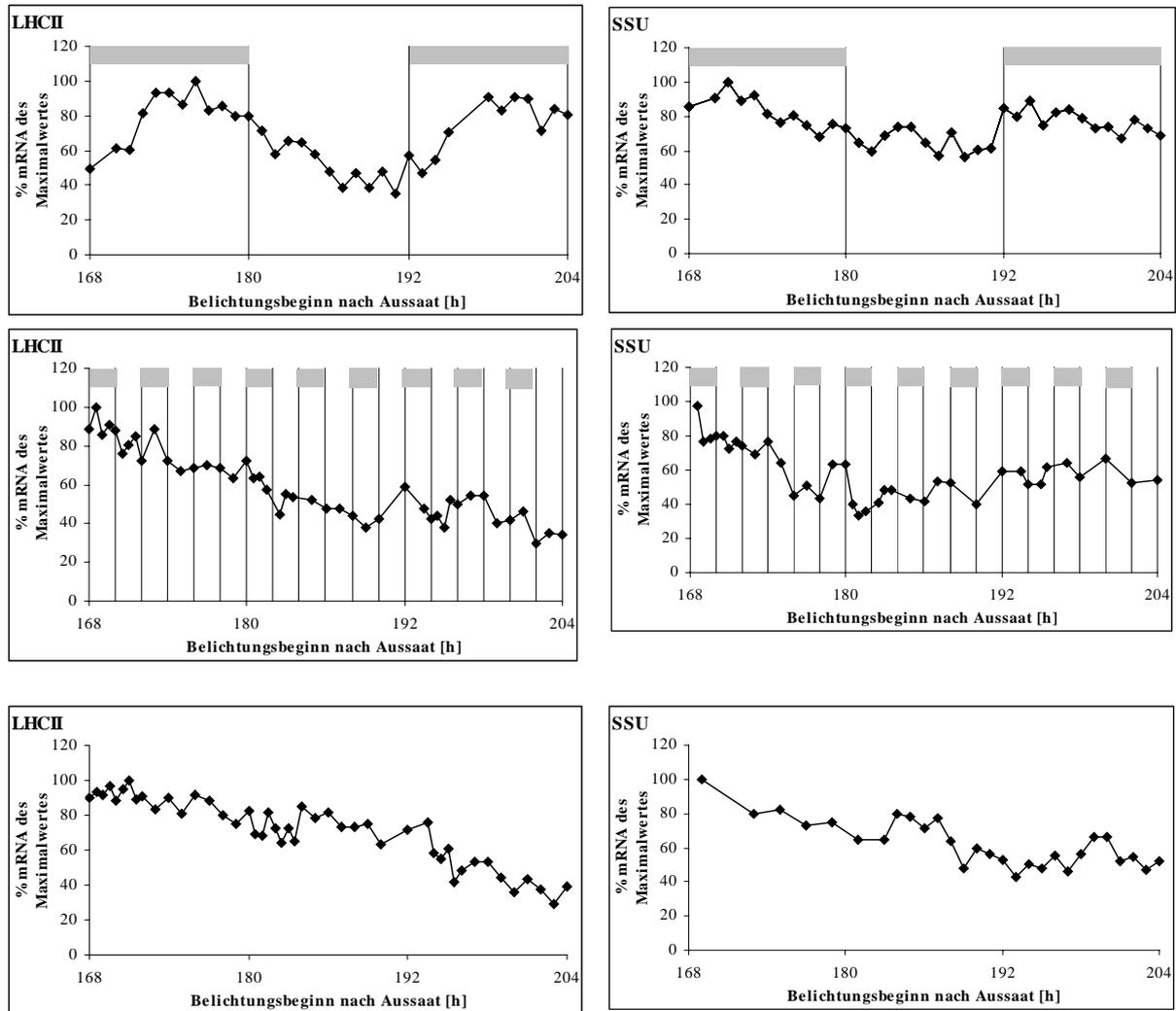


Abb. 36: mRNA-Akkumulation während des *Entrainments*. Gerste wurde im Dunkeln bei 12h/12h = 16°C/24°C (oben), 2h/2h = 16°C/24°C (Mitte) und konstant 20°C (unten) angezogen. Am 8. Tag wurden in definierten Zeitintervallen jeweils ein Teil der Pflanzen in flüssigem Stickstoff eingefroren. RNA wurde isoliert, auf Nylonfilter mit den angegebenen radioaktiv markierten cDNA Sonden hybridisiert (LHC II, SSU) und die Autoradiogramme densitometrisch ausgewertet. Das Ergebnis wurde in „% mRNA des Maximalwertes“ angegeben. Die Balken geben die Zeitintervalle der exogenen Temperaturen an (grauer Balken = 16°C, weißer Balken = 24°C).

b) mRNA-Akkumulation während der freilaufenden Bedingungen

Die Mengen der mRNA für LHCII zeigte über den gesamten Zeitraum des Experiments bei Pflanzen, die beim 12h/12h-Temperaturwechsel angezogen wurden, circadiane Oszillationen mit einer Periode von durchschnittlich 23,1 Stunden ($n = 3$). Die Maxima lagen etwa in der Mitte der Kältephase, die Minima etwa in der Mitte der Wärmephase. Die Akkumulation der mRNA für SSU bei diesem Temperaturprogramm war gleichfalls circadianen Schwankungen mit einer Periode von durchschnittlich 22,4 Stunden ($n = 3$) unterzogen. Die Amplitude war im Vergleich zur LHCII mRNA deutlich gedämpft. Die Maxima lagen zu Beginn der Kältephase, die Minima zu Beginn bzw. in der Mitte der Wärmephase. Bei Gerste, die bei dem 2h/2h-Temperaturwechsel und bei konstanten Temperaturen gewachsen war, wurde keine Rhythmik in der Akkumulationsfähigkeit induziert. Der Anteil der untersuchten mRNA an der Gesamt-RNA nahm über 3 Tage kontinuierlich ab. Die Ergebnisse sind in Abb. 37 dargestellt.

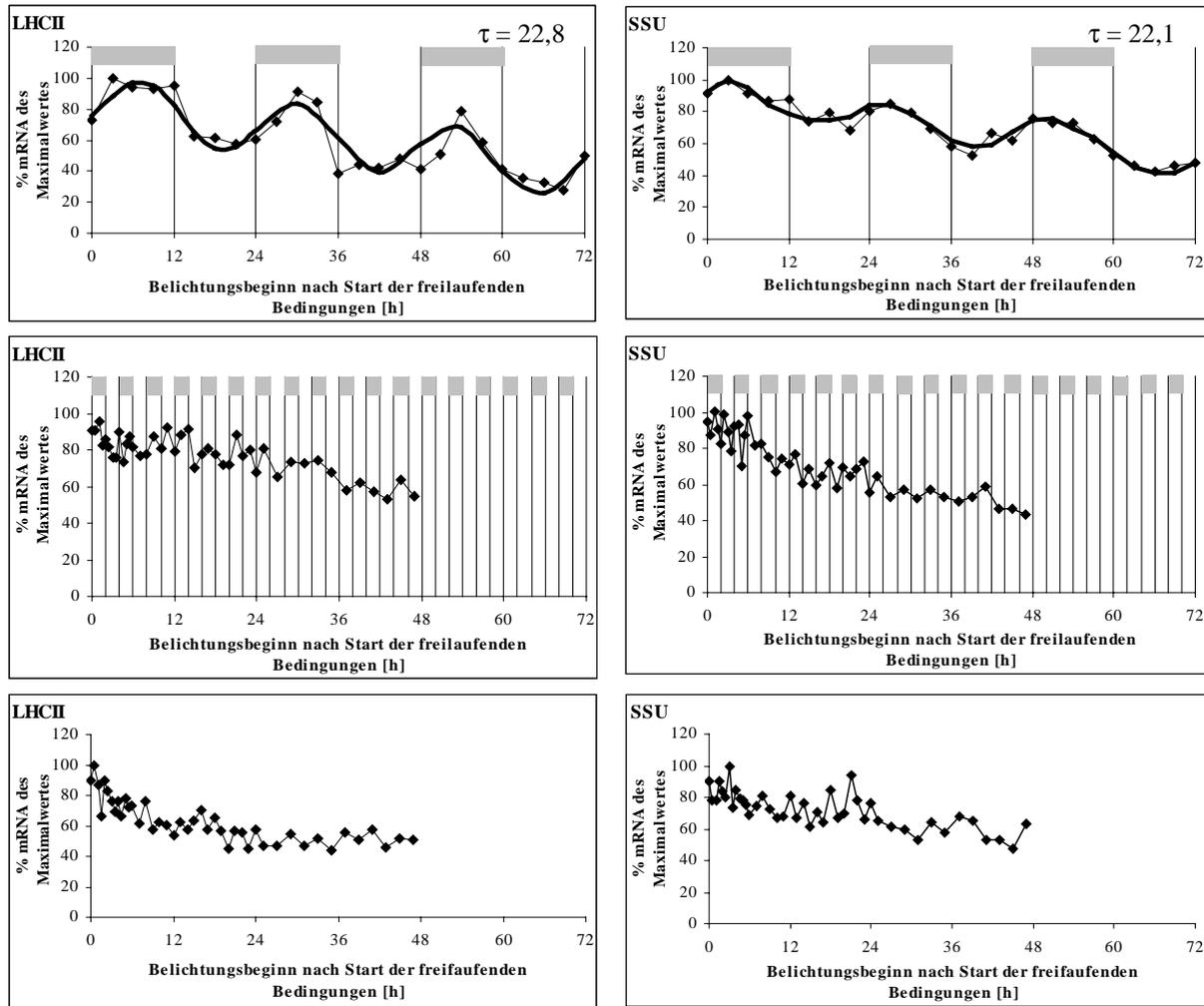


Abb. 37: mRNA-Akkumulation während der freilaufenden Bedingungen. Gerste wurde im Dunkeln bei 12h/12h = 16°C/24°C (oben), 2h/2h = 16°C/24°C (Mitte) und konstant 20°C (unten) angezogen. Am 9. Tag wurden alle Pflanzen bei 20°C inkubiert und es wurden in definierten Zeitintervallen Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren. RNA wurde isoliert, auf Nylonfilter übertragen und mit den angegebenen radioaktiv markierten cDNA Sonden hybridisiert (LHC II, SSU). Die Autoradiogramme wurden densitometrisch ausgewertet. Das Ergebnis wurde in „% mRNA des Maximalwertes“ angegeben. Die fette schwarze Linie zeigt des Ergebnis der Kosinor-Analyse. Die Balken geben die Zeitintervalle der subjektiven Temperaturen an (grauer Balken = subjektiv 16°C, weißer Balken = subjektiv 24°C).

c) mRNA-Akkumulation im D/D nach L/D-Anzucht

Bei Gerste, die unter dem 12h/12h L/D-Wechsel heranwuchs, wurden ausgeprägte diurnale Oszillationen in der Fähigkeit LHCII mRNA zu akkumulieren nachgewiesen (ohne Abb.). Die Konzentration stieg kurz vor Belichtungsbeginn an und zeigte ihr Maximum in der Mitte der Lichtphase. Während der Dunkelphase erreichte der Gehalt an Transkripten ein Minimum. Diese Schwankungen blieben im Dauerlicht und mit schwächerer Amplitude im Dauerdunkel bestehen ($\tau = 22$ h, Abb. 38).

Bei Gerste, die unter dem 2h/2h L/D-Wechsel heranwuchs, wurden gleichfalls Oszillationen der Transkripthäufigkeit festgestellt, die bei Dauerlicht und Dauerdunkel über ca. 4 Perioden beibehalten wurden ($\tau = 4,4$ h, Abb. 38). Bei stündlichem L/D-Wechsel konnten keine Oszillationen mehr gemessen werden (ohne Abb.).

Die Transkripthäufigkeit der SSU zeigte unter keiner der aufgeführten Bedingungen messbare rhythmische Schwankungen (ohne Abb.).

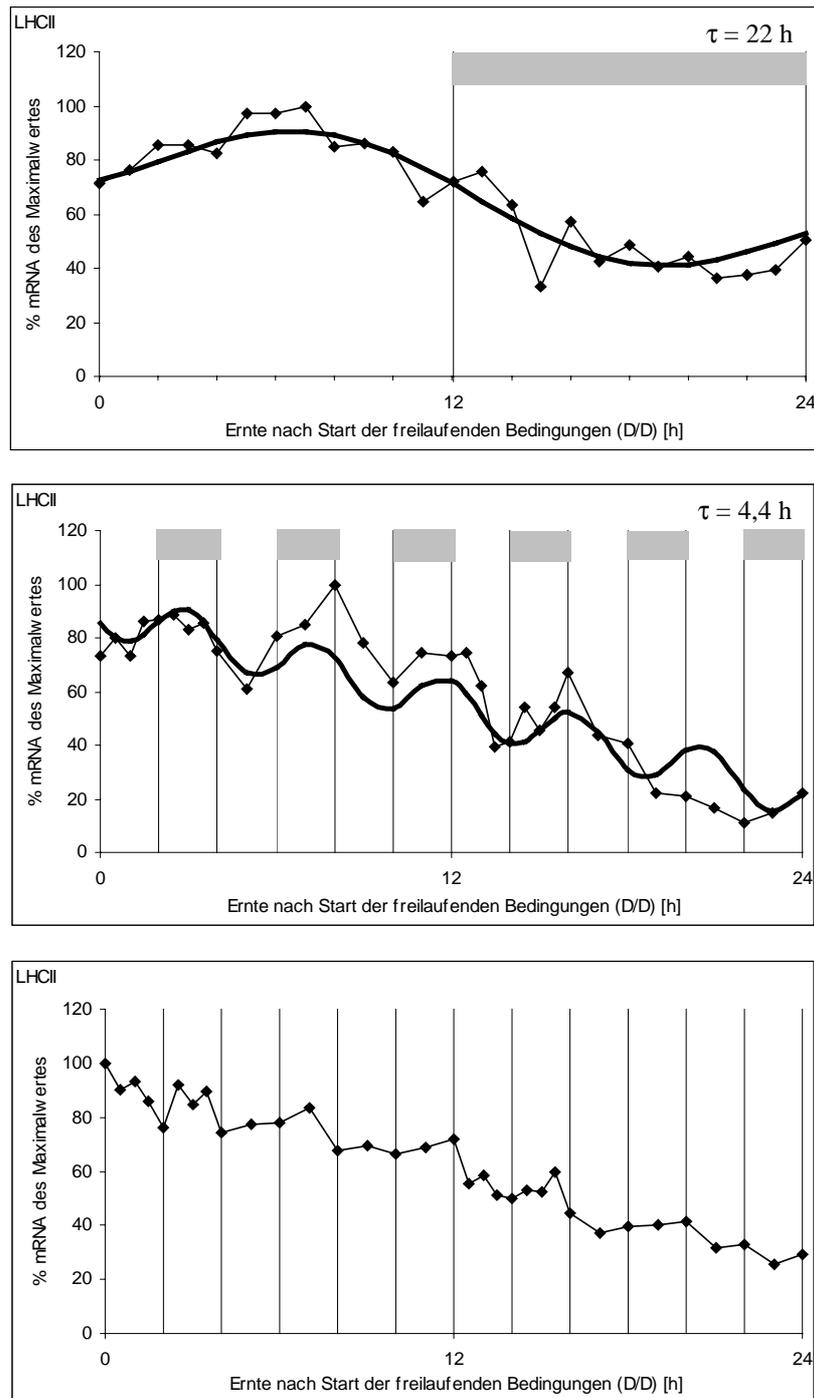


Abb. 38: mRNA-Akkumulation im D/D. Gerste wurde bei 12h/12h = L/D (oben), 2h/2h = L/D (Mitte) und D/D bei 20°C (unten) angezogen. Am 7. Tag wurden alle Pflanzen bei D/D kultiviert und in definierten Zeitintervallen die Primärblätter von jeweils einem Teil der Pflanzen in flüssigem Stickstoff eingefroren. RNA wurde isoliert, auf Nylonfilter mit einer radioaktiv markierten cDNA Sonden gegen LHC II mRNA hybridisiert und die Autoradiogramme densitometrisch ausgewertet. Das Ergebnis wurde in „% mRNA des Maximalwertes“ angegeben. Die fette schwarze Linie zeigt des Ergebnis der Kosinor-Analyse. Die Balken geben die Zeitintervalle des subjektiven L/D-Wechsels an (grauer Balken = subjektive Nacht, weißer Balken = subjektiver Tag).

3.4.3.1 Vergleich der relativen mRNA-Mengen bei verschiedenen Wachstumsbedingungen

In Abschnitt 3.4.3 wurde gezeigt, dass durch ein 12h/12h Temperaturprogramm circadiane Oszillationen in der Akkumulationsfähigkeit von LHCII mRNA und SSU mRNA in Gerste induziert werden kann. Im folgenden Experiment sollte geklärt werden, wie hoch die Akkumulationsfähigkeit dieser mRNA-Sorten im Vergleich zur Akkumulation nach Induktionen durch Licht und anderer Temperaturprogramme ist (Abb. 39). Dazu wurden jeweils die Stichproben maximaler Akkumulation von ca. 7 Tage alter Gerste verglichen. Die detaillierten Bedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die Behandlung von im Dunkeln gewachsenen Pflanzen mit zyklischem HS führte zu einer deutlichen Erhöhung der „steady state“ Mengen der mRNA verschiedener an der Photosynthese beteiligter Gene, wie bereits Kloppstech *et al.* (1991) und Beator *et al.* (1992) nachgewiesen haben. Der größte Gehalt an mRNA wurde bei Pflanzen nachgewiesen, die unter einem L/D-Wechsel gewachsen waren. Ein 12h/12h-Temperaturwechsel induzierte bei der LHCII mRNA eine sichtlich geringere Akkumulation. Bei Pflanzen, die bei einem 2h/2h-Temperaturwechsel gezogen wurden, wurden noch geringere Mengen nachgewiesen. Die deutlich geringsten mRNA-Mengen wurden bei unter konstanter Temperatur gewachsener Gerste gefunden. Scheinbar führte eine Rhythmik in der Temperatur zu einer gesteigerten Akkumulation in Abhängigkeit der Länge der Temperaturperioden. Die akkumulierte Menge nach zyklischem HS war etwas geringer, als bei der 12h/12h-Variante.

Für die SSU mRNA wurde eine im Vergleich zur L/D-Variante signifikant höhere Akkumulation durch 12h/12h Temperaturwechsel nachgewiesen, als für LHC II mRNA. Innerhalb der Temperaturvarianten ließ sich eine ähnliche Tendenz nachweisen. Allerdings waren die akkumulierten mRNA-Mengen zwischen 2h/2h- und Kontrollvariante (konstant 20°C) nicht signifikant unterscheidbar.

| Anzuchtprogramm | Zeitpunkt der Stichprobe | Alter der Pflanzen |
|---------------------------------------|---|--------------------------------|
| 12h/12h = L/D, 20°C | 7 h nach Beginn der subjektiven Lichtphase (freilaufend) | 175 h |
| 12h/12h = 16°C/24°C, D/D | 7 h (LHCII) bzw. 3 h (SSU) nach Beginn der subjektiven Kältephase (freilaufend) | 175 h (LHCII) bzw. 171 h (SSU) |
| 2h/2h = 16°C/24°C, D/D | 1 h nach Beginn der subjektiven Kältephase (freilaufend) | 169 h |
| 20°C, D/D | | 169 h |
| 20°C, alle 12 h HS (1 h, 42°C) D/D | 16 h (LHCII) bzw. 10 h (SSU) nach dem letzten HS | 187 h (LHCII) bzw. 180 h (SSU) |

Tabelle 2: Anzucht von Gerste zum Vergleich der relativen LHCII mRNA und SSU mRNA-Mengen. Die Stichprobe wurde jeweils zur Zeit maximaler Akkumulation geerntet. Das Ergebnis ist in Abb. 39 dargestellt.

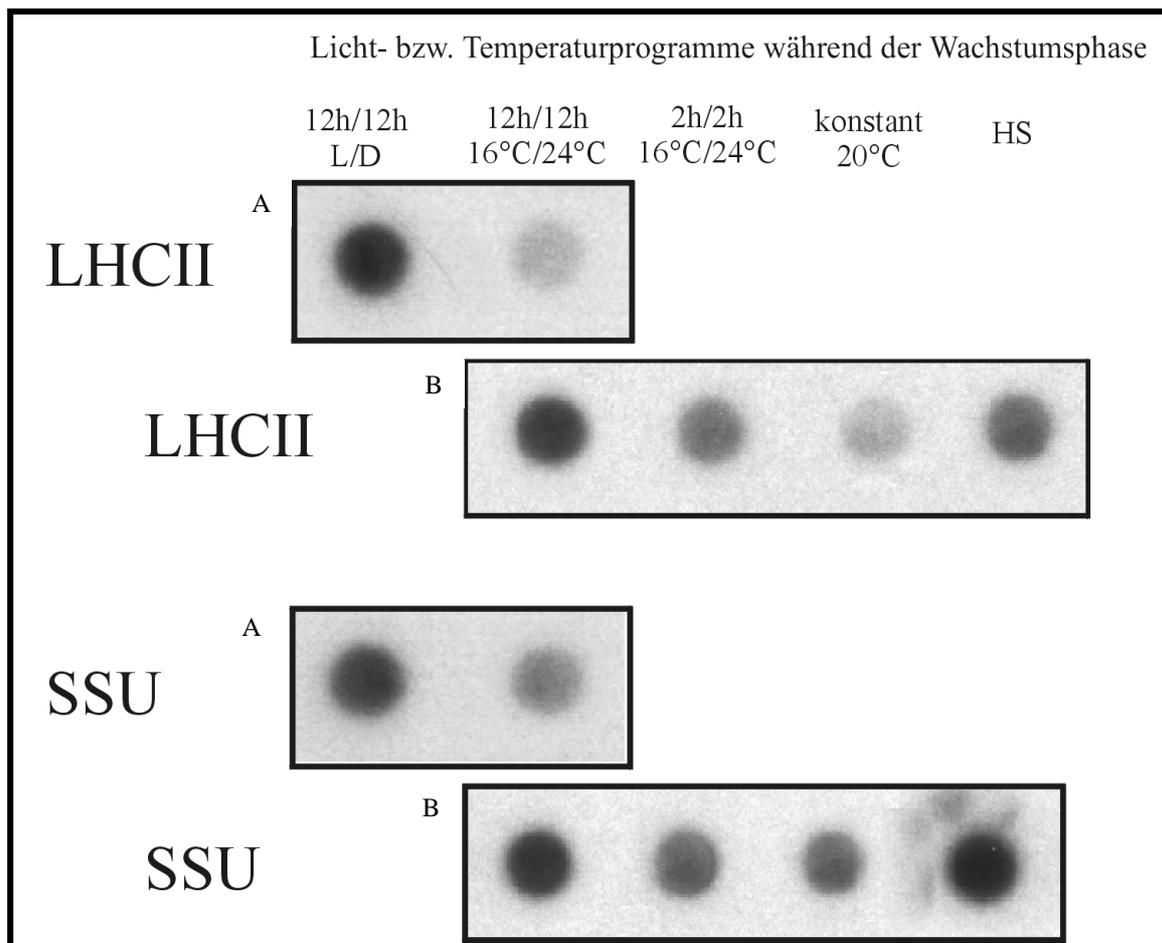


Abb. 39: Vergleich der relativen LHCII mRNA und SSU mRNA-Mengen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Verglichen wurde die maximale Akkumulation von LHC II mRNA und SSU mRNA in den apikalen 6 cm der Primärblättern von ca. 7 Tage alter Gerste. Die Pflanzen wurden wie in Tabelle 2 beschrieben angezogen. Auf den Nylonfilter wurden aufgetragen: A: 150 µL unverdünnte RNA-Probeklösung; B: 150 µL 1:5 verdünnte (LHCII) bzw. 1:3 verdünnte RNA-Probeklösung (SSU)

3.4.4 Proteinakkumulation

Die durch Temperaturoszillationen ausgelöste circadiane Rhythmik wurde auch auf Proteinebene untersucht. Dazu wurde Gerste wie in 2.2.1.2.2 und 2.2.1.3.2 beschrieben angezogen, Gesamtextrakte an SDS-löslichen Proteinen gewonnen und diese elektrophoretisch aufgetrennt (PAGE). An Western-Blots wurden immunologisch die folgenden Proteine quantifiziert:

- LHC II: *light-harvesting complex* des Photosystem II, Chlorophyll a/b-bindendes Protein
- SSU: kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase
- D1: Protein des Reaktionszentrums von Photosystem II
- KF: Koppelungsfaktor der ATP-Synthase, katalytische Untereinheit des Enzyms zur ATP-Synthese
- ELIP #275: *early light inducible protein*, wird während der Ergrünung sowie unter Lichtstress exprimiert (zur Funktion: Adamska, 1997; Hutin *et al.*, 2003)

a) Proteinakkumulation nach vierstündiger Belichtung während des *Entrainments*

Für das LHCII konnte eine deutliche Rhythmik bei der Akkumulation unter diurnalen Bedingungen nachgewiesen werden (Abb. 40). Maximale Proteinmengen wurden am Ende der Kühlphase und minimale Proteinmengen am Ende der Wärmephase beobachtet. Die Maxima und Minima fielen mit denen der mRNA (Abb. 36) und denen der Chlorophyllakkumulation (Abb. 31) zusammen. Für SSU war keine deutliche Rhythmik erkennbar. Die Proteinakkumulation (LHCII, SSU) bei Pflanzen, die bei einem 2h/2h-Temperaturwechsel gezogen wurden, war über den Messzeitraum drastischen Schwankungen zwischen 10% und 100% Protein des Maximalwertes unterworfen, ließ aber keine Rhythmik erkennen. Die Kontrollpflanzen (konstant 20°C, D/D) wiesen deutlich geringere Schwankungen zwischen 60% und 100% Protein des Maximalwertes auf.

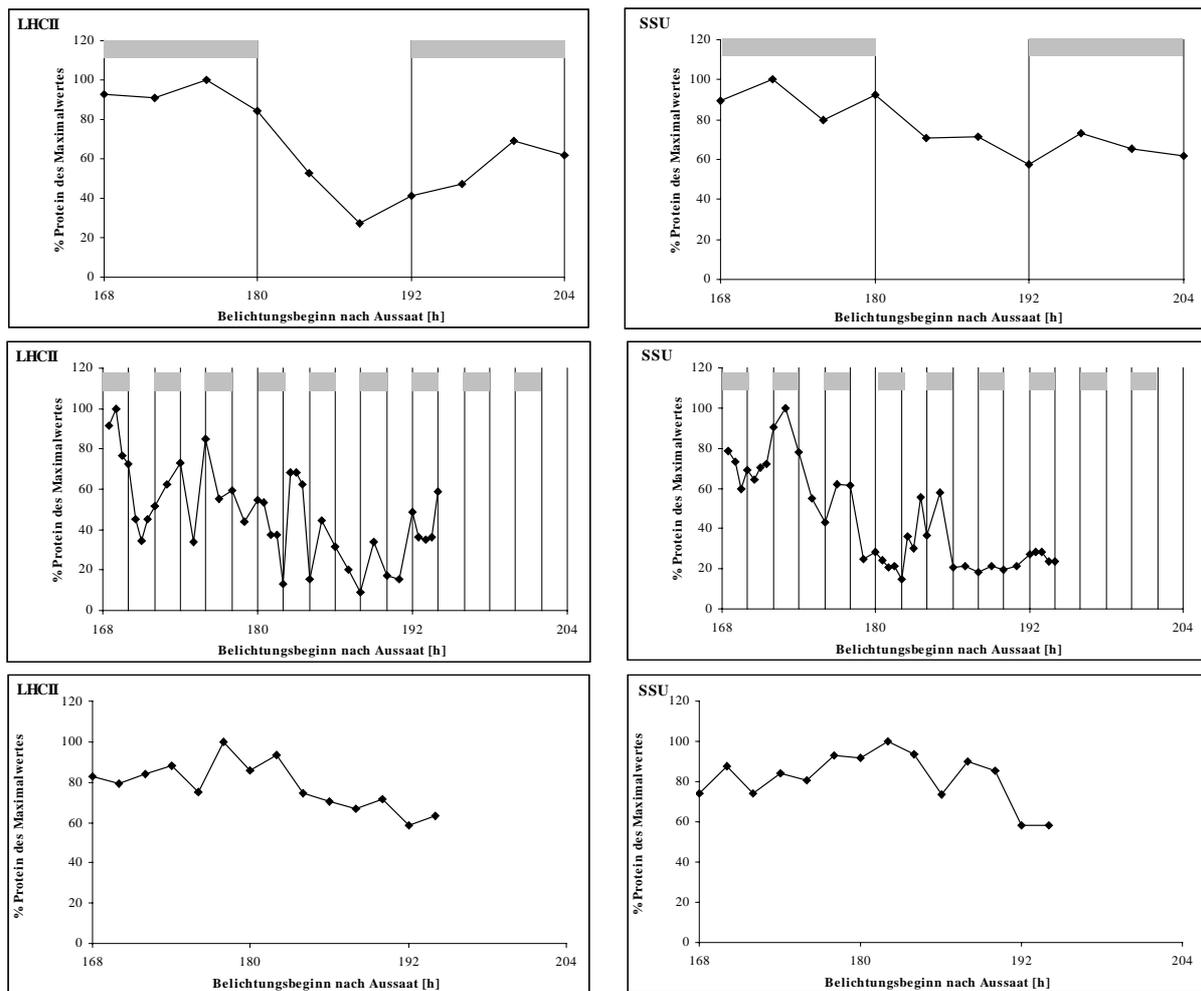


Abb. 40: Proteinakkumulation nach Belichtung während des *Entrainments*. Gerste wurde im Dunkeln bei 12h/12h = 16°C/24°C (oben), 2h/2h = 16°C/24°C (Mitte) und konstant 20°C (unten) angezogen. Am 7. Tag wurden in definierten Zeitintervallen jeweils ein Teil der Pflanzen für 4 Stunden mit ca. $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ belichtet und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Gesamtprotein wurde isoliert, gleiche Mengen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des Elektroblob-Verfahrens auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Replikafilter wurden mit spezifischen primären Antikörpern gegen die untersuchten Proteine behandelt (LHC II, SSU) und durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Das Ergebnis wurde in „% Protein des Maximalwertes“ angegeben. Die Balken geben die Zeitintervalle der exogenen Temperaturen an (grauer Balken = 16°C, weißer Balken = 24°C).

b) Proteinakkumulation nach vierstündiger Belichtung während der freilaufenden Bedingungen

Für LHC II wurde eine deutliche circadiane Rhythmik in der Akkumulationsfähigkeit nachgewiesen. Innerhalb von 48 Stunden lagen die Maxima bei 8 Stunden und bei 32 Stunden nach Start der freilaufenden Bedingungen, d.h. am Ende der subjektiven Kältephase. Für SSU konnte keine Rhythmik nachgewiesen werden.

Unter freilaufenden Bedingungen wurden zusätzlich die Proteine ELIP, D1 und KF untersucht. Für ELIP wurde eine über 48 Stunden kaum schwankende Akkumulation nach 4 Stunden Belichtung beobachtet. Die in diesem exemplarisch dargestellten Ergebnis schwach ausgeprägten Maxima 4 Stunden und 36 Stunden nach Start der freilaufenden Bedingungen waren nicht reproduzierbar. Die Verläufe der Akkumulationsfähigkeit von D1 und KF waren nahezu gleich. Ausgeprägte Maxima konnten zu Beginn der subjektiven Kälteperiode beobachtet werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 41 dargestellt.

Bei den im 2h/2h-Temperaturwechsel und unter konstanten Bedingungen gezogenen Pflanzen konnte keine Rhythmik beobachtet werden. Die Ergebnisse ähnelten denen in Abb. 40 gezeigten Verläufen ohne erkenntliches Muster (ohne Abb.).

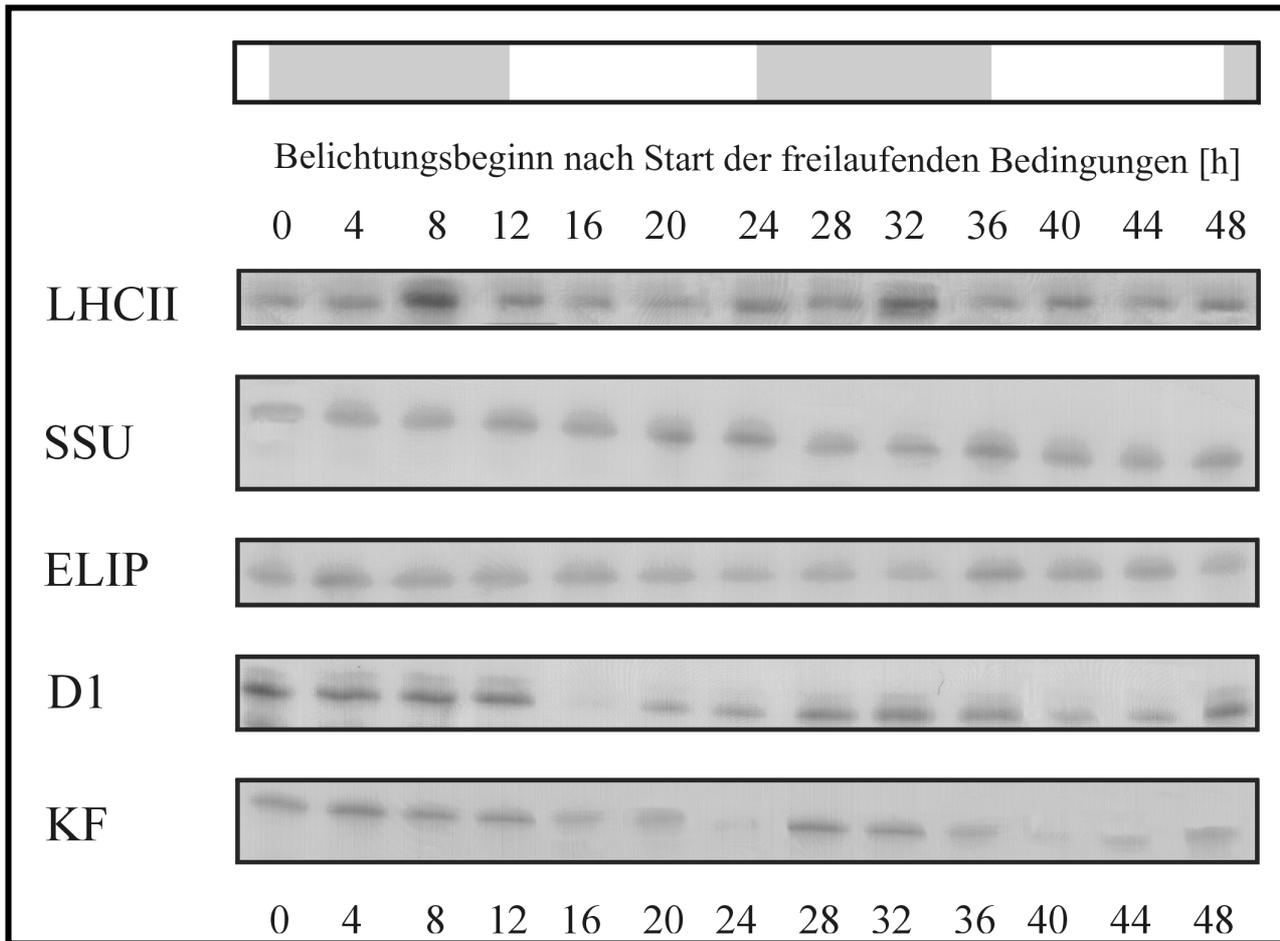


Abb. 41: Protein Akkumulation nach Belichtung während der freilaufenden Bedingungen. Gerste wurde im Dunkeln bei 12h/12h = 16°C/24°C angezogen. Am 7. Tag wurden in definierten Zeitintervallen jeweils ein Teil der Pflanzen für 4 Stunden mit ca. $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ belichtet und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Gesamtprotein wurde isoliert, gleiche Mengen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des Elektrobplot-Verfahrens auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Replikafilter wurden mit spezifischen primären Antikörpern gegen die untersuchten Proteine behandelt und durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Die Balken geben die Zeitintervalle der subjektiven Temperaturen an (grauer Balken = 16°C, weißer Balken = 24°C).

3.4.4.1 Vergleich der relativen Proteinmengen bei verschiedenen Wachstumsbedingungen

In Abschnitt 3.4.4 wurde bei Gerste, die unter einem 12h/12h = 16°C/24°C Temperaturprogramm angezogen wurde, circadiane Oszillationen von u.a. LHCII und SSU bei der Proteinakkumulationsfähigkeit nachgewiesen. Bei Pflanzen, die unter den anderen Bedingungen gewachsen waren, wurden ausschließlich mehr (2h/2h bzw. 1h/1h = 16°C/24°C) oder weniger (konstant 20°C) hohe Schwankungen ohne erkennbare Rhythmik beobachtet. In diesem Experiment (Abb. 42) wurde die Proteinakkumulation bei den verschiedenen

Temperaturprogrammen untereinander verglichen. Dazu wurden jeweils die Stichproben maximaler Akkumulation von ca. 7 Tage alter Gerste ausgewählt. Die detaillierten Bedingungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Bei LHCII wurde eine maximale Akkumulation bei Pflanzen beobachtet, die beim 12h/12h-Temperaturprogramm angezogen wurden. Die Proteinmenge fiel deutlich geringer beim Wachstum unter einem 2h/2h-Wechsel aus und nahm weiter ab, bei Gerste, die unter einem 1h/1h-Wechsel und schließlich unter konstanter Temperatur gewachsen war.

Bei SSU wurde ebenfalls die maximale Akkumulation bei 12h/12h erreicht. Deutlich weniger Protein wurde bei den kürzer angelegten Temperaturwechseln maximal akkumuliert. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen dem 2h/2h- und dem 1h/1h-Wechsel erkennbar. Bei Pflanzen, die unter konstanten Bedingungen wuchsen, lag die Proteinakkumulation zwischen der 12h/12h- und den kürzer periodischen Varianten.

| Anzuchtprogramm | Zeitpunkt der Stichprobe | Belichtung | Alter der Pflanzen |
|--------------------------|---|------------|--------------------------------|
| 12h/12h = 16°C/24°C, D/D | 8 h nach Beginn der subjektiven Kältephase | 4 h | 176 h |
| 2h/2h = 16°C/24°C, D/D | 1 h (LHCII) bzw. 2 h (SSU) nach Beginn der subjektiven Kältephase | 4 h | 169 h (LHCII) bzw. 170 h (SSU) |
| 1h/1h = 16°C/24°C, D/D | 20 min nach Beginn der subjektiven Kältephase | 4 h | 168 h und 20 min |
| 20°C, D/D | | 4 h | 170 h |

Tabelle 3: Anzucht und Behandlung von Gerste zum Vergleich der relativen Proteinmengen von LHC II und SSU. Die Stichprobe wurde jeweils zur Zeit maximaler Akkumulation geerntet. Das Ergebnis ist in Abb. 42 dargestellt.

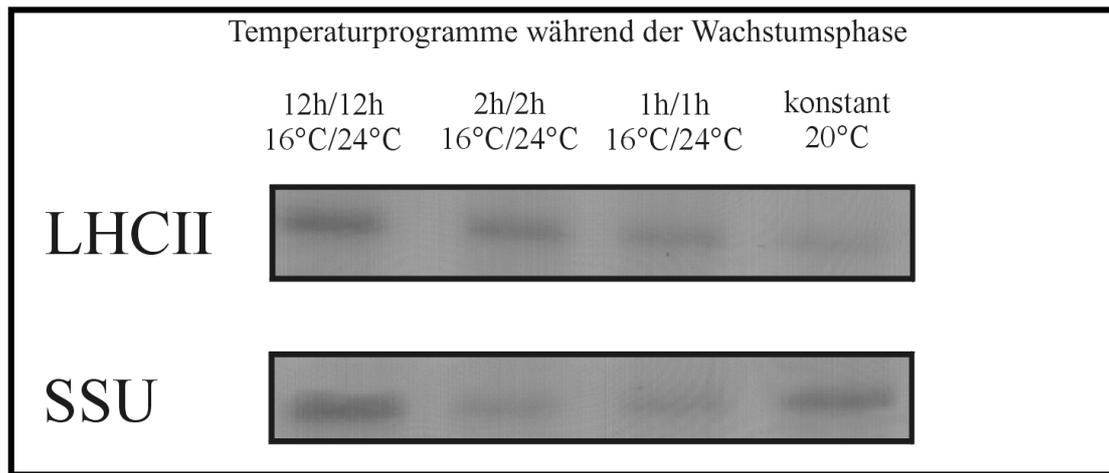


Abb. 42: Vergleich der relativen Proteinmengen von LHCII und SSU unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Verglichen wurde die maximale Akkumulation während eines Zeitraumes von 12h von LHC II und SSU in den apikalen 6 cm der Primärblättern von 8d alter Gerste während freilaufender Bedingungen (20°C, D/D). Die Pflanzen wurden unter folgenden Bedingungen angezogen (von links nach rechts): 12h/12h, 2h/2h und 1h/1h = 16°C/24°C. Nach jeweils 4 Stunden Belichtung mit ca. $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ wurde der Gesamtproteinextrakt isoliert, gleiche Mengen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des Elektrobplot-Verfahrens auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Replikafilter wurden mit spezifischen primären Antikörpern gegen die untersuchten Proteine behandelt (LHC II, SSU) und durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht.

4 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass Pflanzen in der Lage sind, unter dem Einfluss geringer Temperaturänderungen die Deetiolierung einzuleiten und damit, dass „Photomorphogenese“ ein korrekturbedürftiger Terminus ist. Es bleibt zu fragen, ob Morphogenese und circadiane Phänomene in einem kausalen Zusammenhang stehen.

Licht unabhängige „Photomorphogenese“

Das Wachstum und die Entwicklung einer Pflanze unter Licht- oder Licht/Dunkel-Bedingungen wird als Photomorphogenese bezeichnet. Sie ist auf allen Organisationsstufen, vom sichtbaren Phänotyp bis zur Genexpression, zu beobachten. Bei Belichtung nach der Keimung investiert die Pflanze ihre Speicherstoffe in erster Linie in die Ausbildung des Photosyntheseapparats: Blattwachstum, Ausbildung der Chloroplasten, Vergrößerung der Leitbahnen und vieles mehr. Phytochrom in Koaktion mit Cryptochromen und dem UV-B-Photosensor, die die Empfindlichkeit einer Photoantwort bestimmen, wirken dabei als vermittelnde Rezeptoren (Mohr, 1994). Die alternative Entwicklung bei Lichtmangel wird als Skotomorphogenese (*Etiolment*) bezeichnet. Die Pflanze investiert in diesem Fall ihren begrenzten Vorrat an Speicherstoffen in ein verstärktes Sprossachsenwachstum mit dem Ziel, das Licht zu erreichen. Bei *Arabidopsis* wird die „Umschaltung“ zwischen beiden Entwicklungswegen am Hypokotyl und den Kotyledonen deutlich (Liscum und Hangarter, 1993), während bei Keimpflanzen von *Pisum sativum*, die die Kotyledonen als Speicherorgane verwenden, das Epikotyl und die Primärblätter je nach Entwicklung ausgeprägte Unterschiede zeigen (Abb. 18). Bei monokotylen Pflanzen prägen sich die alternativen Morphogenesen im Bereich des Mesokotyls, der Koleoptile und des Primärblattes aus, wie beispielsweise bei Hafer und Reis (Downs, 1955; Loercher, 1966; Pjon und Furuya, 1967) und in dieser Arbeit bei Mais, Weizen (Abb. 16 und 17), Gerste und Roggen (ohne Abb.) gezeigt werden konnte. Bei den monokotylen Poaceen beispielsweise wird das Blattwachstum durch Licht in Abhängigkeit von der Dosis negativ beeinflusst (Gaba und Black, 1983): die Koleoptilen wachsen im Dunkeln auf die doppelte Länge heran und die Primärblätter zeigen ebenfalls ein stärkeres Längenwachstum und bleiben eingerollt. Man darf annehmen, dass die zugrunde liegenden Mechanismen, mit denen die Entwicklungsänderung

ausgelöst wurden, in den unterschiedlichen Pflanzenarten ähnlich funktionieren, obwohl von der Pflanzenart abhängige, unterschiedliche Reaktionen und Morphologien resultieren.

Durch zyklische Temperaturwechsel (zyklischer Hitzeschock, periodische Temperaturoszillationen) während der Dunkelanzucht konnte das *Etiollement* bei den untersuchten Poaceen und Fabaceen in weiten Teilen aufgehoben werden. Bei einer Anzucht unter periodischen Temperaturoszillationen reichten dabei Temperaturdifferenzen von 4°C zwischen mittlerer Temperatur und niedrigster bzw. höchster Temperatur zur Auslösung der Wirkung aus (3.2.2).

Für die in diesen Experimenten erzeugten Temperaturoszillationen mit geringen Temperaturdifferenzen und kurzen periodischen Wechseln mit kurzen Aufheiz- und Abkühlphasen wurden technisch aufwendigere temperierbare Kammern konzipiert, als für HS-Experimente nötig wären (3.1). Der Aufheizbereich für die zirkulierende Luft und der Raum, in dem die Pflanzen ausgestellt waren, mussten optisch voneinander getrennt werden. Damit wurde vermieden, dass die Pflanzen durch die von den Heizspiralen emittierten Bereiche von Rot- bis Infrarot beeinflusst wurden (Phytochrome). Schließlich wurde die elektrische Schaltanlage so konzipiert, dass rasche Temperaturänderungen ebenso wie das Halten einer konstanten Temperatur über einen Zeitraum von einigen Wochen technisch verlässlich und präzise realisierbar waren (Abweichungen vom jeweiligen Sollwert $\leq 0,1^\circ\text{C}$).

Bei den Poaceen wurden durch Keimung und Anzucht bei zyklischen Temperaturwechseln im Dunkeln verkürzte Koleoptilen und kürzere Primärblätter gebildet, letztere mit entrollter Spreite (Abb. 23-26). Die Blattentrollung bei Gräsern ist ebenfalls eine Antwort auf einen Lichtreiz, bei der als vermittelnder Rezeptor Phytochrom eine Rolle spielt (Virgin, 1972; Viner *et al.*, 1988). Beim Mais wurde eine deutliche Reduktion des Mesokotylwachstums erzielt, während sich das Primärblattwachstum von dem der phänotypisch etiolierten Pflanzen nicht signifikant unterschied (Abb. 24). Eine Reduktion der Mesokotyllänge ist ebenfalls bisher als ein Merkmal der Photomorphogenese angesehen worden (Gaba und Black, 1983).

Typische Merkmale der Photomorphogenese bei den Dikotylen sind kurze Internodien, gut ausgebildete Blattspreiten und eine Öffnung des Hypokotylhakens (Chory *et al.*, 1996; Clouse, 2001). Bei den untersuchten Fabaceen konnten diese Effekte ebenfalls durch zyklischen Hitzeschock und oszillierende Temperaturen erzielt werden (Abb. 18, Abb. 27). Verschiedene Erbsensorten zeigten im Vergleich zueinander keine signifikanten Unterschiede (3.2.2). Dieselben Licht- bzw. Temperatursignale, die die Zellstreckung im Hypokotyl unterdrücken, fördern die Zellexpansion in den Keim- und Laubblättern. Wie diese unterschiedlichen Reaktionen auf dieselbe Umwelt reguliert werden, ist bisher kaum bekannt

(Dale, 1988; van Volkenburgh und Cleland, 1990; van Volkenburgh *et al.*, 1990). Vielleicht werden Induktion und Hemmung der Zellstreckung in beiden Organen durch ähnliche, möglicherweise circadiane Stoffwechselwege reguliert. Dabei könnte die von Thain *et al.* (2000) belegte Existenz von vielen autonomen circadianen Oszillatoren in unterschiedlichen Pflanzenorganen und -geweben von Bedeutung sein. Sie zeigten mit Hilfe des Biolumineszenz-Luziferase-Reportergens in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen, dass Rhythmen innerhalb eines Organs unabhängig vom *Entrainment* der Rest der Pflanze ablaufen können. Das legt nahe, dass die Signale, die einen Phasenverschub auslösen, ebenfalls autonom verarbeitet werden. Das Sprosslängenwachstum unterliegt einer circadianen Kontrolle (Sweeney, 1987). Die Elongationsrate (SER) ist bei Langtag- (LDP), Kurztag- (SDP) als auch bei Neutraltagpflanzen (NDP) in der Nacht hoch und während des Tages niedrig (Ibrahim *et al.*, 1981; Lecharny und Wagner, 1984; Tutty *et al.*, 1994; Torre und Moe, 1998). Dieser Wachstumsrhythmus wird von diurnalen Wechseln von hohen und niedrigen Temperaturen, Licht und Dunkelheit und Hochlicht und Niedriglicht kontrolliert (Torre und Moe, 1998). Dowson-Day und Millar (1999) wiesen z.B. bei *Arabidopsis* circadiane Rhythmen bei der Hypokotylverlängerungsrate nach. Obwohl Störungen der Hemmung der Hypokotylverlängerung bei Belichtung bei einer Reihe Mutanten der Lichtwahrnehmung vorkommt (*hy*-Mutanten), könnte dieser Defekt aus einer primären Fehlfunktion des circadianen Systems und demzufolge eines Ausfallens der täglichen Periode des Wachstumsstillstands resultieren. Ein weiteres Beispiel für circadiane Rhythmen bei der Zellelongation zeigten Jouve *et al.* (1998) an Blütenstielen ebenfalls bei *Arabidopsis*. Die Wachstumsrhythmen korrelierten mit der Konzentration von Indol-3-Essigsäure (IAA) in den Blättern der Rosette, ohne dass im Blütenstiel Oszillationen von IAA auftraten.

Experimente mit der miniaturisierten Druckmesssonde zeigten, dass eine Hemmung der Sprosselongation durch Weißlicht auf eine nachlassende plastische Dehnbarkeit der wachstumslimitierenden Epidermiszellwände zurückzuführen ist (Kutschera, 2000). Gene, deren Expression in Zusammenhang mit der Modifikation der Eigenschaften der Zellwand stehen, werden circadian reguliert (Harmer *et al.*, 2000). Wichtige regulatorische Komponenten der Expansibilität der Zellwand könnten z.B. neben der Expression von Expansingenen (Cosgrove, 2000; Choi *et al.*, 2003) Xyloglucan-Endo-Transglycosylasen, die das Xyloglucan-Netzwerk der Zellwand beeinflussen (Pritchard *et al.* 1993, Xu *et al.* 1995, Campbell und Braam 2000) oder Peroxidasen zur Regulation des säureinduzierten Zellwachstums sein (Chen und Schopfer, 1999). Auch das wachstumshemmende Mechanismen wie der Einbau von Xyloglucan-Derivaten in die pflanzliche Zellwand, die

hemmend auf deren Flexibilität wirken, werden diskutiert (Warneck *et al.* 1998). Cosgrove (1994) und Spalding und Cosgrove (1989, 1992) zeigten bei der Gurke im Bereich des Hypokotyls, dass die Dehnbarkeit der Zellwände und die nachfolgende Zellstreckung sehr schnell, bereits nach 30 Sekunden durch Blaulicht inhibiert werden kann, so dass eine Regulierung allein über Genexpression unwahrscheinlich ist.

Turgor und osmotischer Druck spielen dagegen bei der Regulation des Wachstums komplexer pflanzlicher Gewebe höherer Pflanzen nicht die hauptsächliche Rolle. Eine Reihe von Untersuchungen zeigten, dass der Turgor einer Pflanze relativ konstant gehalten wird. Kutschera (2000) zeigte ebenfalls mit der Druckmesssondentechnik, dass der intrazelluläre Turgordruck während der raschen Hypokotylelongation im Dunkeln nicht beeinflusst und durch Akkumulation löslicher Zucker aus den Kotyledonen des Keimlings erhalten und kontrolliert wird. Tomos und Pritchard (1994) wiesen nach, dass entlang der Wachstumszone einer Wurzel überall nahezu derselbe Turgor auftritt, während die Wuchsraten höchst unterschiedlich sind. Zudem ist der Turgor innerhalb einer Zelle, auch wenn diese in einen komplexen Zellverband eingebettet ist, an jeder Stelle gleich groß. Innerhalb einer im Zellverband integrierten Zelle können aber an unterschiedlichen Orten der Zelle unterschiedliche Wuchsraten auftreten, wie das Brumfield (1942) durch mikroskopische Aufnahmen an Wurzeln nachwies. Dieses räumlich differenzierte Wachstum an verschiedenen Positionen, muss also entweder durch Änderungen der Zellwandstruktur oder Änderungen im Gewebeverband reguliert werden.

Das bedeutet jedoch nicht, dass der Turgor in keiner Weise für die Regulation des Wachstums relevant ist. Pardossi *et al.* (1994) und Frensch und Hsiao (1994) wiesen diesbezüglich nach, dass während schneller Änderungen des Turgors aufgrund von Änderungen in der Wasserverfügbarkeit auch direkte Wirkungen auf die Ausdehnung von Blättern bzw. Wurzeln erfolgen.

Alle oben erwähnten, auch durch Temperatursprünge auszulösenden morphologischen Effekte einschließlich der bisher nachgewiesenen circadianen Wachstumsrhythmen legen bei der Ausprägung der „Photomorphogenese“ eine Interaktion mit der Uhr nahe. Demnach wäre bei diesen Pflanzen nicht das Licht an sich der Auslöser zumindest einiger „photomorphogenetischer“ Ausprägungen, sondern die Induktion und/oder Synchronisation der circadianen Rhythmik.

Auch die CCA1-ox Mutanten (*Arabidopsis*) weisen auf eine solche Verbindung hin. Die Pflanzen zeigten keine circadian regulierte Genexpression und Blattbewegung und bildeten ein für etiolierte Pflanzen typisches langes Hypokotyl aus (Green *et al.*, 2002).

Untersuchungen von Kaczorowski und Quail (2003) auch an *Arabidopsis* weisen ebenfalls auf ein Gen hin (*PRR7*, *pseudo-response regulator 7*), dass funktionell an Phytochrom-regulierten Signalstoffwechselwegen beteiligt ist, die zum einen zur Deetiolierung von Keimlingen führen und zum anderen die circadiane Rhythmik beeinflussen.

Die Ausprägung der Morphologie bei Wachstum unter zyklischen Hitzeschock war bei allen Pflanzen quantitativ vergleichbar mit denen, die bei Temperaturoszillationen mit 24-stündiger Periode (16°C/24°C = 12h/12h) heranwuchsen (3.2.1 und 3.2.2; Beator, 1993; Kloppstech, 1990; Kloppstech *et al.*, 1991). Bei den Poaceen konnte beobachtet werden, dass Keimlinge, die bei Temperaturoszillationen mit verkürzter Periode (2h/2h) angezogen wurden, oftmals etwas längere Primärblätter und Koleoptilen entwickelten. Signifikante Unterschiede zwischen der 2h/2h- und 12h/12h-Anzuchtvariante konnten ausschließlich beim Mais in der Form gefunden werden, wonach mit längerer Periode ein deutlicher Photomorphogenese-ähnlicherer Phänotyp ausgeprägt wurde (Abb. 21). Auch das Primärblattwachstum der Gerste unter oszillierenden Temperaturen zeigte während 11 Tage einen ähnlichen Verlauf wie bei L/D-Anzucht (Abb. 22). Dagegen traten bei Raps, Gelbsenf und *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*), Buschbohne, Ackerbohne (*Fabaceae*), Spinat, Gartenkresse, Zuckerrübe (*Chenopodiaceae*) sowie Sonnenblume (*Asteraceae*) keine oder nur geringfügige Unterschiede auf. Diese Arten scheinen weniger sensitiv für die erfolgten Temperaturbehandlungen zu sein oder unfähig zu sein, auf diese Temperaturänderungen mit Deetiolierung zu reagieren. Inwieweit diese unterschiedlichen Reaktionen innerhalb bestimmter Familien gehäuft auftreten, bleibt zu untersuchen.

Genexpression nach Anzucht unter periodischen Temperaturwechseln

Die Ergebnisse zeigen, dass Pflanzen geringe Temperatursignale wahrnehmen und auf sie reagieren können. Diese Signale kontrollieren zu einem beträchtlichen Teil das Pflanzenwachstum und die morphologische Entwicklung. Das unterschiedliche Entwicklungsmuster („Photomorphogenese“/*Etiollement*) wird vermutlich in erster Linie durch Änderungen der Expression von Licht- (Batschauer *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1993; Terzaghi und Cashmore, 1995) und/oder Temperatur-regulierter Gene vermittelt. Während Temperatureffekte auf das circadiane System von *Neurospora* in Einzelheiten beschrieben wurden (Nakashima, 1986; Nakashima und Hastings, 1989; Gooch *et al.*, 1994; Liu *et al.*; 1998), ist bisher nicht geklärt, wie ein eukaryotischer Oszillator durch Temperaturänderungen

gestellt werden kann. Der *input* und die Kopplung des Zeitgebers Licht sind sehr komplex, aber relativ gut untersucht. Es scheinen zum einen *second messenger* und zum anderen Änderungen im Phosphorylierungszustand beteiligter Proteine eine wichtige Rolle zu spielen (McClung, 2001). Grundsätzlich können Temperaturänderungen die endogene Uhr direkt beeinflussen, indem der Stoffwechsel beteiligter Komponenten verlangsamt oder beschleunigt wird (Dunlap, 1999; Liu *et al.*, 1998). Daneben besteht die Möglichkeit der indirekten Einflussnahme: Ein wesentlicher Teil aller bekannten Uhrmechanismen schließt die Möglichkeit der Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Proteinen durch Protein-Kinasen/Phosphatasen ein. Diese Enzyme könnten durch Temperatur induzierte Änderungen bei Hormonen und intrazellulären Botenstoffen (Kalzium, cAMP, cGMP) beeinflusst werden. Ebenso kann eine Beeinflussung der endogenen Uhr durch Temperatúrauswirkungen auf Ionen- oder Metabolit-Konzentrationen erfolgen (Rensing *et al.*, 1995). Die Regulation von Prozessen durch metabolische Substanzen ist in Pflanzen von großer Bedeutung, wie im Beispiel der Photosynthese durch Fructose-2,6-Bisphosphat. Für den Prozess der Wachstumsregulation spielt Nitrat eine wichtige Rolle, dem verschiedentlich sogar hormonelle Funktion beigemessen wird (Trewavas, 1983).

Bisher ist nicht nachgewiesen, in welcher Weise Temperaturänderungen durch bestimmte Bestandteile des Uhrmechanismus oder bestimmte Sensoren wahrgenommen werden. Pflanzen reagieren auf niedrige Temperaturen mit Anpassung (Kältetoleranz; Thomashow, 1999). Sich ändernde Temperaturen werden möglicherweise über die Änderung der Membranfluidität wahrgenommen. Bei kühleren Temperaturen ist die Beweglichkeit der Membranlipide eingeschränkt und ein oder mehrere Membranproteine transduzieren dieses Signal ins Innere der Zelle (Murata und Los, 1997; Orvar *et al.*, 2000). Aktivitätsänderungen der Proteinkinase C-Aktivität, Änderungen im Zytoskelett aber auch Zustandsänderungen von Ionenkanälen (H^+ , Ca^{2+}) könnten eine wichtige Rolle spielen (Browse und Xin, 2001). Beobachtungen an CAM-Pflanzen sprechen dabei für den Tonoplasten, den passiven Malatefflux und die Malatkonzentration als wichtigste Regulatoren für die circadianen Oszillationen des Crassulaceen-Stoffwechsels (Neff *et al.*, 1998; Borland *et al.*, 1999; Blasius *et al.*, 1999). Eine besondere Rolle bei der Wahrnehmung von Temperaturwechseln spielt scheinbar die Geschwindigkeit mit der diese erfolgen. Rascher *et al.* (1998) wiesen bei *Kalanchoë* nach, dass die Rhythmik nach einem Temperaturabfall nur wiederkehrt, wenn diese Temperaturänderung schnell erfolgt. Ob diese Mechanismen auch bei der Übermittlung sehr geringer Temperaturunterschiede von z.B. 1°C bis 2°C eine Rolle spielen, die ein

Entrainment oder eine Phasenverschiebung der Uhr induzieren, ist nicht bekannt, aber wahrscheinlich.

Möglicherweise beeinflussen die Zeitgeber Licht und Temperatur die gleichen Bestandteile des circadianen Uhrmechanismus, also z.B. die Phosphorylierung bestimmter Proteine oder deren Umsatz. Dafür spricht die Ähnlichkeit von durch L/D- bzw. Temperaturwechsel erzeugten Phasenresponskurven (PRC) bei einer Reihe von Arten. Da Kalzium als ubiquitärer *second messenger* in Signaltransduktionswegen bei der Lichtwahrnehmung beteiligt ist (Sanders *et al.*, 1999), die externe Gabe von Ca^{2+} oder einem Ca^{2+} -Ionophor Phasenverschiebungen z.B. in der Rhythmik der Blattbewegungen bei *Robinia* induzieren kann (Gomez und Simon, 1995) und für freies zytosolisches Ca^{2+} in Tabak und *Arabidopsis* nachgewiesen wurde, dass es circadian oszilliert (Johnson *et al.*, 1995), ist dieses Ion als ein mögliches Glied in der Kette bei der Übermittlung von Temperatursignalen anzusehen. Mögliche Stoffwechselwege für beide Signale (Licht bzw. Temperatur) könnten Aktivitätsänderungen der Proteinkinase A (PKA) und C (PKC), der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sein (Akiyama *et al.*, 2001; Oh-hashii *et al.*, 2002; Jaworski *et al.*, 2003).

Circadiane Kontrolle kann zum einen direkt über den *output* der endogenen Uhr an die unmittelbaren Effektoren bsw. das Hypokotylwachstum vermittelt werden. Dabei scheint die Signalkaskade vom Photorezeptor zum Gen ziemlich kurz zu sein. Phytochrome beeinflussen *light-responsive promoters* direkt über Transkriptionsfaktoren (z.B. PIF3; Ni *et al.*, 1998) und Cryptochrome agieren direkt mit einem Schlüsselrepressor der Photomorphogenese (Fankhauser und Staiger, 2002). Zum zweiten kann die Kontrolle indirekt über circadianes *gating* anderer Signalstoffwechselwege erfolgen, die wiederum die Hypokotylentwicklung und die Öffnung des Hypokotylhakens steuern (Mas *et al.*, 2003). Dieses *gating* von Lichtreaktionen tritt ebenfalls zusammen mit circadianer Expression von LHC-Genen (Gorton *et al.*, 1993; Millar und Kay, 1996) und der circadian regulierten Fähigkeit zur Pigmentakkumulation auf (Beator *et al.*, 1992).

Die photomorphogenetischen Vorgänge, die bei der Ergrünung etiolierter Keimpflanzen stattfinden, sind auf verschiedenen Ebenen einer molekularen Analyse zugänglich, und eine circadiane Regulation wurde bei verschiedenen Genen auf unterschiedlichen Ebenen nachgewiesen: transkriptional (siehe unten), posttranskriptional (z.B. Jones und Ort, 1997), translational (z.B. Kume *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000), posttranslational (z.B. Pilgrim *et al.*, 1993). Pigmentakkumulation, mRNA-Induktion und Proteinakkumulation erfolgten in

zyklisch hitzegeschockten (Otto *et al.*, 1992) und in unter Temperaturoszillationen gezogenen Pflanzen (3.4.1, 3.4.3, 3.4.4) deutlich schneller als in Kontrollpflanzen, die unter konstanten Temperaturbedingungen im Dunkeln wuchsen. Diurnale und circadiane Variationen auf der Ebene der die Chlorophyll a/b-bindenden Proteine kodierenden mRNAs wurden erstmals von Kloppstech (1985) nachgewiesen. Die Bedeutung dieser Kontrolle liegt in der Notwendigkeit, die Protein-Synthese mit der Chlorophyll a- und Chlorophyll b-Synthese zu koordinieren. Freie Chlorophylle werden rasch photooxidativ zerstört und neu synthetisierte LHC-Proteine ohne Chlorophyllmoleküle proteolytisch abgebaut. Die Ergebnisse belegen, dass der komplexe Vorgang der Ergrünung nach Anzucht der Pflanzen unter oszillierenden Temperaturen einer circadianen Kontrolle unterliegt. Mit den hier durchgeführten Experimenten steht ein Ansatz zur Verfügung, eine circadian regulierte Genexpression ohne den Einfluss von Licht zu erreichen und damit den alleinigen Einfluss der circadianen Rhythmik auf die Entwicklung der Pflanze sowie die Pigment-, RNA- und Protein-Entwicklung zu untersuchen.

Pigmentakkumulation nach Anzucht unter periodischen Temperaturwechseln

Nach Anzucht unter zyklischen Temperaturwechseln (12h/12h) treten bei der untersuchten Gerste über 3 Tage hinweg circadiane Oszillationen bei der Chlorophyllakkumulation auf. Dabei liegen die Maxima zu Beginn der subjektiven Wärmephase und Minima zu Beginn der subjektiven Kältephase. Die Maxima und Minima fallen mit denen der LHCII Protein-Rhythmik zusammen (Beator und Kloppstech, 1993). Das Protein wird zur Stabilisierung des neu synthetisierten Chlorophylls benötigt. Für β -Carotin während der ersten 30 Stunden Wachstum wurde ein ähnlicher Kurvenverlauf mit geringerer Amplitude unter freilaufenden Bedingungen ermittelt. Danach sind keine Oszillationen mehr erkennbar. Diese Ergebnisse bestätigen die von Beator *et al.* (1992) bei Gerste durch Hitzeschock induzierten Oszillationen. In einem Einzelexperiment (2h/2h = 16°C/24°C) wurde (während des *Entrainments*) eine Tendenz zur diurnalen Chlorophyll a-Akkumulation mit sehr geringer Amplitude sichtbar ($\tau = 23,2$ h). Es unterscheidet sich von vorherigen dadurch, dass über einen Zeitraum von nur maximal 32 Stunden die Chlorophyll a-Akkumulation beobachtet wurde und von den Keimpflanzen, die bei Temperaturoszillationen von 2h/2h = 16°C/24°C gezogen wurden, eine größere Anzahl Stichproben pro Zeitintervall untersucht worden ist. Möglicherweise spricht das dafür, dass ein empfindlicherer Assay benötigt wird

Die circadianen Oszillationen bei der Chlorophyllsynthese scheinen über die circadian regulierte Synthese von δ -Aminolävulinsäure kontrolliert zu werden (Beator und Klopstech, 1993). Argyroudi-Akoyunoglou und Prombona (1996) wiesen in etiolierten *Phaseolus vulgaris*-Keimpflanzen circadiane Oszillationen in der Fähigkeit Protochloropyllid und, abweichend von den Ergebnissen dieser Arbeit, nach vierstündiger Belichtung Chlorophyll zu akkumulieren nach. Nach Ansicht der Autoren scheint diese Rhythmik unter der Kontrolle eines Licht unabhängigen endogenen Oszillators zu stehen, dessen Expression durch Keimung induziert und dessen induzierte endogene Rhythmik durch die Ernte der Keimblätter vor der Belichtung gestoppt wird. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt. In der Regel ist ein endogener Rhythmus in etiolierten Pflanzen allerdings nicht zu beobachten.

Die stetige Abnahme des Chlorophyllgehalts pro g FG während des Experimentes könnte durch das stärkere Elongationswachstum unter konstanten Temperaturbedingungen während der Dunkelanzucht erklärt werden.

mRNA-Akkumulation nach Anzucht unter periodischen Temperaturwechseln

Licht übt zwei unterschiedliche Wirkungen auf die Expression von durch Licht induzierbare Genen aus. Zum einen induziert es eine circadiane Rhythmik der Transkriptakkumulation (Tavladoraki *et al.*, 1989) und zum zweiten eine länger andauernde Erhöhung des in einer Zelle vorliegenden Transkripts (Otto *et al.*, 1992). Die circadiane Kontrolle ist bereits für eine Reihe von Genen nachgewiesen (z.B. Klopstech, 1985; Watillon *et al.*, 1993; Heintzen *et al.*, 1994; Zhong und McClung, 1996; Dresselhaus *et al.*, 1996; Heintzen *et al.*, 1997). Die in dieser Arbeit ausgewählten Gene, die das Chlorophyll-a/b-bindende Protein (LHCII) und die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (SSU) kodieren, sind, in Zusammenhang mit dem Deetiolierungsprozess, zwei der bereits am besten charakterisierten Gene.

Durch Anzucht im Dunkeln unter den in dieser Arbeit beschriebenen Anzuchtbedingungen konnte das Auslösen einer Rhythmik experimentell von der Belichtung getrennt werden. Für die mit der Photosynthese assoziierten Gene LHCII und SSU wurden in dieser Arbeit bei Gerste, die bei einem 12h/12h-Temperaturwechsel angezogen wurde, diurnale und über drei Tage circadiane Rhythmen bei der mRNA-Akkumulation nachgewiesen.

Das Maximum der diurnalen LHCII mRNA-Akkumulation lag am Ende der Kälteperiode und das Minimum am Ende der Wärmeperiode. Dabei bedeutet Kälteperiode das Ende der Nacht, vor Beginn des Tages. Damit liegen die Oszillationen in Phase mit denen des Lichts. Mit

anderen Worten, zwei Zeitgeber kontrollieren die Uhr gleichzeitig. Unter circadianen Bedingungen erfolgte eine Phasenverschiebung (Maxima in der Mitte der subjektiven Kälteperiode) und eine Verkürzung der Periode auf ca. 23 Stunden. Circadiane Rhythmen in der Expression von LHC-Genen folgen in vielen Angiospermen, die bei einem L/D-Wechsel gezogen werden, einem ähnlichen Muster. Die Transkriptmenge beginnt kurz vor dem Lichtsignal anzusteigen und erreicht bis zur Mitte der Lichtphase ein Maximum (Fejes und Nagy, 1998; Kellmann *et al.*, 1999). Bei der untersuchten Gerste, die im Dunkeln und bei 12h/12h = 16°C/24°C angezogen wurde, lagen die Maxima der LHC mRNA-Transkriptakkumulation ca. in der Mitte der Kältephase (Abb. 36 und 37), die in der Regel in unseren Breiten in der zweiten Hälfte der Nacht die niedrigste Temperatur erreicht. Bei kürzeren Temperaturwechseln (2h/2h) ist keine Rhythmik nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigt sich nach Anzucht im L/D-Wechsel (2h/2h) unter freilaufenden Bedingungen (D/D) über vier Perioden eine Rhythmik ($\tau = 4,4$ h). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass möglicherweise auch bei kurzen Temperaturwechseln eine hier nicht nachgewiesene Rhythmik induziert werden kann (Abb. 38). Auch ist denkbar, dass Rhythmen jeweils angestoßen und durch den folgenden Temperatursprung zurückgesetzt werden. Liu *et al.* (1998) zeigten bei *Neurospora*, dass FRQ bei höheren Temperaturen auf einem höheren und bei niedrigeren Temperaturen auf einem niedrigeren Niveau circadian schwingt. So liegt bei 28°C das Minimum der Oszillationen der Menge des FRQ-Proteins höher, als das Maximum der Oszillationen bei 21°C. Demzufolge entspricht eine bestimmte Menge FRQ bei verschiedenen Temperaturen verschiedenen Phasen. Eine Temperaturerhöhung würde ein Ansteigen, eine Temperaturabsenkung eine Erniedrigung des oszillierenden Proteins auslösen, um die Proteinmenge nach der neuen Temperatur auszurichten. Temperaturänderungen von 16°C auf 24°C und von 24°C auf 16°C, wie in dieser Arbeit angewendet, hätten danach sehr schnelle Phasenverschiebungen zur Folge, die außerdem in sehr kurzen Zeitintervallen, nämlich alle zwei Stunden erfolgten. Das könnte in den untersuchten Pflanzenpopulationen die Arrhythmie verursachen, da eine Änderung der Periodenlänge nur bis zu einem bestimmten Grad erfolgen kann (Mitnahmebereich). Beim Überschreiten dieses Bereichs kann der circadiane Oszillator nicht mehr folgen und der Organismus wird arrhythmisch. Das bedeutet nicht zwingend den Stillstand eines endogenen Rhythmus. Möglich wären auch eine Desynchronisation normalerweise gekoppelter Schrittmacher oder eine Entkopplung des untersuchten Parameters von der endogenen Uhr (Pittendrigh, 1974; Honma *et al.*, 1996).

LHCII ist Bestandteil eines der beiden dominanten *light harvesting* Komplexe in photosynthetischen Membranen Höherer Pflanzen. Diurnale und circadiane Rhythmen auf

mRNA-Niveau wurden erstmals von Kloppstech (1985) bei LHCP mRNA der Erbse nachgewiesen. Im L/D-Wechsel war der mRNA-Gehalt in der Dunkelphase niedrig, begann zwei Stunden vor der Belichtung anzusteigen und erreichte kurz nach der Mitte der Lichtphase das Maximum. In allen bisher getesteten Arten, mit Ausnahme von Koniferen und einer Moos-Spezies, die beide auch im Dunkeln ergrünen, wurden zumindest diurnale Rhythmen gefunden (Oberschmidt *et al.*, 1995). Koniferen synthetisieren Chlorophyll auch im Dunkeln und LHCII-Proteine werden zur Bindung dieser neusynthetisierten Pigmente benötigt. Fejes und Nagy (1998) und Piechulla (1999) stellten eine transkriptionale Regulation fest. Für eine maximale Akkumulation während der diurnalen Lichtphase scheint eine aktive LHCII-Kinase nötig zu sein. Bei Inaktivierung dieser Kinase erfolgte eine deutliche Dämpfung der circadianen Oszillationen des mRNA-Gehalts (Pursiheimo *et al.*, 2001). Möglicherweise spielt letzteres auch eine Rolle dabei, dass unter dem 2h/2h-Temperaturprogramm keine Rhythmik unter den angewendeten Versuchsbedingungen nachgewiesen werden kann.

Für die Gene von SSU konnten ebenfalls diurnale und circadiane Rhythmen durch 12h/12h-Temperaturwechsel induziert werden. Die Maxima lagen jeweils zu Beginn der Kälteperiode (Abb. 36). Unter freilaufenden Bedingungen verkürzte sich die Periode auf 22,4 Stunden und die Amplitude der Schwingung war im Vergleich zur Akkumulation der LHCII mRNA unter diurnalen wie circadianen Bedingungen deutlich gedämpft (Abb. 37). Pilgrim und McClung (1993) und Riesselmann und Piechulla (1990) wiesen bei *Arabidopsis* bzw. Tomate unter L/D und L/L ebenfalls nur sehr niedrige Amplituden nach. Eine circadiane Regulation der Expression der SSU wurde in einer Reihe, allerdings nicht aller, untersuchter Pflanzen nachgewiesen. Rundle und Zielinski (1991) fanden keine Rhythmik bei Gerste, die im L/D-Wechsel kultiviert wurde. Dagegen konnte Beator (1993) eine HS-induzierte Rhythmik nachweisen. Die Regulation könnte transkriptional und posttranskriptional erfolgen. In der Regel treten die Maxima der mRNA-Akkumulation zu Beginn der Lichtphase, die Minima zu Beginn der Dunkelphase auf. Die Expression steigt nicht vor Beginn der Belichtung, im Gegensatz zu anderen circadianen Rhythmen wie z.B. bei der LHCII mRNA-Akkumulation (Fejes und Nagy, 1998). Bei Spinat fanden Oelmüller *et al.* (1995) unter L/D-Zyklen eine stark abweichende Rhythmik mit einem Maximum am Ende der Dunkelphase. Die Oszillationen bei zyklisch wechselnden Temperaturen liegen nicht in Phase mit denen bei L/D-Wechsel.

Ein *Entrainment* und die Ausbildung circadianer Rhythmen bei der Genexpression durch Temperaturzyklen wurde bereits bei einer Reihe von Höheren Pflanzen gezeigt, so für die

Transkription von Lhcb mRNA bei *Arabidopsis* und für Lhc mRNA bei Keimlingen der Tomate (Somers *et al.*, 1998; Riesselmann und Piechulla, 1990). Heintzen *et al.* (1994) wiesen im meristematischen Gewebe junger Blätter von *Sinapis alba* eine Temperatur induzierte circadiane Rhythmik bei zwei Gruppen von Transkripten nukleärer Proteine mit bisher unbekannter Funktion, Sagrp1 und Sagrp2, nach. Diese sind gegenläufig zu LHCII. Nach Harmer *et al.* (2000) kann vermutlich die Transkription von mehr als 6% aller *Arabidopsis*-Gene durch rhythmische Temperaturzyklen circadian gesteuert werden.

In bei konstanter Temperatur und bei 2h/2h-Temperaturwechseln gewachsener Gerste wurden keine mRNA Oszillationen gefunden. Es handelt sich bei den Oszillationen nach Anzucht bei 12h/12h-Temperaturwechsel scheinbar um eine Induktion der Rhythmik oder eine Synchronisation einzelner Zellen. Möglich wären auch eine Desynchronisation normalerweise gekoppelter Schrittmacher (Pittendrigh, 1974) oder eine Abkopplung des untersuchten Parameters von der endogenen Uhr (Honma *et al.*, 1996) durch die im Zweistundenrhythmus wechselnde Temperatur. Es gibt allerdings keine Hinweise in den Ergebnissen, dass die endogene Uhr durch Quellung bereits induziert oder synchronisiert wurde. In *Arabidopsis* wurde der Quellung eine entscheidende Zeitgeberfunktion nachgewiesen. Zhong *et al.* (1998) zeigten, dass die Induktion der CAT2 mRNA vom Zeitpunkt der Quellung abhängig ist und durch Quellung ein *resetting* der Uhr und eine Synchronisierung zwischen Keimpflanzen einer Population stattfinden können. Ob die Quellung in den pflanzlichen Embryos Rhythmen einer latenten Uhr initiiert, oder bestehende Rhythmen synchronisiert, ist unklar.

Proteinakkumulation nach Anzucht unter periodischen Temperaturwechseln

Die hier untersuchten Proteine zeigten nach Anzucht unter zyklischen Temperaturwechseln (12h/12h) in der Akkumulation zum Teil ebenfalls eine circadiane Rhythmik. Die Maxima von LHCII lagen am Ende der subjektiven Kältephase, d.h. am Morgen zum Zeitpunkt maximaler Chlorophyllsynthese. Dagegen haben D1 und KF (Kopplungsfaktor der ATP-Synthetase) Maxima zu Beginn der subjektiven Kältephase. SSU und ELIP zeigen auf Proteinniveau keine Rhythmik. Nach Anzucht unter zyklischen Temperaturwechseln mit kurzer Periode (2h/2h) sind keine rhythmischen Änderungen bei der Akkumulation erkennbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch zyklische Temperaturänderungen (12h/12h) die Induktion oder Synchronisation der endogenen Uhr erfolgt. Es finden eine zeitlich koordinierte Pigment-, mRNA- und Protein-Akkumulation statt. Diese erfolgt bei mRNA und Protein auch

ohne Belichtung, d.h. circadian kontrolliert. Die Maxima liegen in der (subjektiven) Kühlephase, während sie bei L/D-Anzucht in der (subjektiven) Lichtphase liegen (Beator und Kloppstech, 1996).

Oszillierende Temperaturen (12h/12h) induzierten diurnale und circadiane Oszillationen auf mRNA-Niveau (LHCII, SSU) und auf Proteinniveau (LHCII, D1, KF), allerdings keine so deutlich verstärkte Akkumulation der Transkriptmenge wie im Licht (Abb. 39). Je kürzer die externen Temperaturperioden, desto geringer fiel die maximale Akkumulation von Transkript- (LHCII, SSU) bzw. Proteinmenge (LHCII) aus. Die geringsten Akkumulationsraten (LHCII) wurden bei Gerste, die unter konstanter Temperatur gewachsen ist, nachgewiesen. Eine Ausnahme machte die nicht circadian regulierte Proteinakkumulation der SSU (Abb. 42). Die Proteinmenge in den Blattsegmenten von Pflanzen, die unter konstanten Bedingungen gewachsen sind, war im Maximum deutlich höher, als bei Pflanzen, die bei Programmen mit kurzen Temperaturperioden (1h/1h, 2h/2h) gewachsen sind. Die Ursache könnte sein, dass die Konzentration bei den untersuchten mRNAs und Proteinen (LHCII, SSU) relativ langsam ansteigt und erst nach einigen Stunden Kühleeinwirkung in den beprobten Blattsegmenten das Maximum erreicht. Möglicherweise spielt aber zusätzlich die Induktion durch circadian regulierende oder regulierte Elemente eine Rolle, die bei der SSU-Proteinsynthese in den Hintergrund treten. Solche Elemente könnten auch eine Rolle bei der Quantität der molekularen Marker (Zeiger, hier: mRNA, Protein) spielen, die den Status der circadianen Uhr wiedergeben. Obwohl Oszillationen der Uhr unter konstanten Bedingungen fortlaufen, kann unter bestimmten Bedingungen die Amplitude eines Rhythmus unter einen noch nachweisbaren Schwellenwert sinken. Ein Beispiel sind circadiane Oszillationen der mRNA-Mengen lichtinduzierter Gene, wie für LHC II, RCA (Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase-Aktivase) oder CAT2 (Katalase 2) kodierende Gene. Die Expression wird nach einigen D/D-Zyklen auf niedrige Level gedämpft (Nagy *et al.*, 1988; Pilgrim und McClung, 1993; Zhong *et al.*, 1997). Diese Dämpfung wird dem Verlust von Phytochrom (Pfr) zugeschrieben, das als positiver Regulator der Genexpression dient und dessen Aktivität durch die circadiane Uhr über *gating* gesteuert wird (Kay und Millar, 1993).

Kurzzeitige zyklische Temperaturänderungen (2h/2h) induzierten scheinbar keine Rhythmik. Es kann und soll allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eine Rhythmik zwar induziert, die Uhr aber danach bei jedem Temperaturwechsel neu verschoben (rückversetzt) wird. Die Expression in unter konstanten Bedingungen als auch unter 1h/1h, 2h/2h-Bedingungen gewachsenen Pflanzen ist niedrig. Möglicherweise wird ein sehr empfindlicher Assay

benötigt, wie die Erfassung der Lichtproduktion in transgenen Keimlingen, die ein circadian reguliertes LHCII::Luziferase Fusionsgen enthalten (Millar *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1994). Mit einer für Photonen hochsensitiven Kamera könnte das Expressionsmuster von LHCII nach dem Einfluss von Temperaturwechseln kurzer Periode in intakten Keimpflanzen über die transiente Biolumineszenz der Luziferase aufgezeichnet werden.

Es muss angenommen werden, dass Änderungen in der Morphogenese zu ihrer Realisierung die höchste Komplexität benötigen. Danach wären die vorwiegend an monokotylen Pflanzen und an Fabaceen erhaltenen Befunde als besonders wichtig einzustufen. Es ist vorstellbar, dass bei dem Ausfall nur eines Schwingkreises die komplexen morphogenetischen Leistungen ausfallen können, während andere Oszillationen erhalten bleiben. Diese sind wiederum hinsichtlich ihrer Komplexität zu betrachten. So sind Schwingungen auf Proteinebene sicher als komplexer anzusehen, als solche, die lediglich auf der RNA-Ebene stattfinden. Es fällt auf, dass Änderungen der Morphogenese besonders häufig an Monokotylen gemacht worden sind, die unter Gesichtspunkten der Phylogenie als die modernsten Pflanzen eingestuft werden. Man könnte versuchen, diese Aspekte in weiteren Arbeiten zu analysieren.

Möglicherweise liefert auch die Quellung das Signal, das die Uhren etiolierter Pflanzen innerhalb einer Population oder innerhalb einer Pflanze synchronisiert. Licht oder ein Signal, das wie die Temperatur mit dem L/D-Wechsel assoziiert ist, ist jedoch nötig um circadiane Oszillationen bzw. solche von mRNA, deren Oszillationen in etiolierten Keimpflanzen nicht beobachtet wird, auszulösen oder zu verstärken, so dass sie nachgewiesen werden können. Die Oszillationen könnten in etiolierten Pflanzen und den 2h/2h-Varianten z.B. durch von der „Uhr“ unabhängige Signaltransduktionswege verborgen werden. Allerdings kann auch eine Aktivität der endogenen Uhr in Samen nicht sicher ausgeschlossen werden (Bryant, 1972). Dies würde eine Erklärung für die schwache Rhythmik liefern, die Millar *et al.* (1992) in etioliertem, transgenem Tabak nachweisen konnten.

Aufgrund der Ergebnisse lässt sich die These, wonach die Kopplung von Genexpression an die Innere Uhr zu „photomorphogenetischen“ Wachstumsformen führt, nicht verallgemeinern. Allerdings wurde gezeigt, dass Reaktionen der Uhr auf Temperatursignale der Pflanze zusätzliche Informationen über ihre Umwelt liefern, die nützlich für Wachstum und Entwicklung sein können. Die Annahme der Existenz verschiedener Signalwege scheint sinnvoll. Promotordeletionsstudien zeigten, dass verschiedene Domänen für beide Phänomene (Licht- bzw. Temperaturinduktion/-synchronisation) verantwortlich sind (Fejes *et al.*, 1990) und dass verschiedene Promotorregionen vorhanden sind, um eine Phytochrom- oder

circadiane Kontrolle zu vermitteln (Pott *et al.*, 2000). Möglicherweise laufen diese Signaltransduktionswege ineinander über. Dafür spricht die Entdeckung von Genen wie *CCA1* (*circadian-clock associated protein 1*), *SRR1* (*sensitivity to red light reduced*) oder *ELF4* (*early flowering 4*) bei *Arabidopsis* (Green und Tobin, 1999; Staiger *et al.*, 2002; Khanna *et al.*, 2003), die wichtige Funktionen bei der Phytochrom A bzw. B vermittelten Lichtantwort bzw. Deetiolierung spielen und gleichzeitig für eine normale Funktion der circadianen Uhr nötig sind. Auch Mas *et al.* (2003), die die Rolle von *TOC1* (*timing of cab expression 1*) im circadianen System von *Arabidopsis* mit Hilfe transgener Pflanzen untersuchten, belegen diese Hypothese. *TOC1* ist ein wesentlicher Bestandteil der „Uhr“, der zur Kontrolle circadianer und photomorphogenetischer Reaktionen durch Lichtsignale entscheidend beiträgt. Letztendlich werden Photomorphogenese wie circadiane Rhythmen über regulierte Proteolyse gesteuert (Kloss *et al.*, 1998; Deshaies und Meyerowitz, 2000). *COP1* (*constitutive photomorphogenic 1*) und *HY5* sind dabei zentrale Bestandteile des „photomorphogenetischen Schalters“. *COP1* unterdrückt in der Dunkelheit die Photomorphogenese, indem es den Abbau des *HY5* Transkriptionsfaktors, der an Promotoren Licht induzierter Gene bindet, mit Hilfe von *CSN* (*COP9/signalosome*) durch das Proteasom induziert (Ubiquitin-Proteasom-Mechanismus; Osterlund *et al.*, 2000). Es ist wahrscheinlich, dass *COP1* und *CSN* weitere Funktionen in Pflanzen und anderen Organismen besitzen. Naidoo *et al.* (1999) untersuchten die zyklische Expression der „Uhrproteine“ *TIM* (*timeless*) und *PER* (*period*), die entscheidend für den *feedback loop* bei *Drosophila* sind. Das *Entrainment* der circadianen Uhr durch Licht wird durch den Abbau des *TIM*-Proteins vermittelt, an dem vermutlich ebenfalls ein Ubiquitin-Proteasom-Mechanismus beteiligt ist.

Mutanten der Inneren Uhr

Viele Mutanten der endogenen Uhr weisen eine veränderte Morphogenese auf, als auf Grund der Anzuchtbedingungen zu erwarten wäre. Diese Phänotypen weisen auf eine Verknüpfung der Uhr und der Photomorphogenese hin (Hicks *et al.*, 1996; Schaffer *et al.*, 1998; Wang und Tobin, 1998; Dowson-Day und Millar 1999; Holm und Deng, 1999; Sugano *et al.*, 1999). Untersuchungen mit diesen Mutanten werden vermutlich zu einem näheren Verständnis führen. Zur genetischen Analyse der Photomorphogenese wurden bisher im wesentlichen zwei Gruppen von Mutanten untersucht. Bei der einen Gruppe handelt es sich um Pflanzen, die auch bei Wachstum im Licht einen etiolierten Phänotyp aufweisen. Diese häufig als *hy* Mutanten (*hypocotyl elongated*; Somers *et al.*, 1991; Whitelam und Harberd, 1994;

Chamovitz und Deng, 1996; Chory *et al.*, 1996; Gendreau *et al.*, 1997) bezeichneten Pflanzen trugen zur Identifizierung der bekannten Lichtrezeptoren und einer Reihe weiterer Gene bei, die Funktionen als positive Regulatoren der Lichtantwort besitzen. Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um Mutanten, die bei Wachstum im Dunkeln phänotypische Merkmale der Photomorphogenese ausbilden und in einigen Fällen durch Licht regulierte Gene wie *CAB* und *CHS* exprimieren (Millar *et al.*, 1994). Diese Mutanten werden häufig als *cop* (*constitutive photomorphogenic*; Deng *et al.*, 1991; Wei und Deng, 1992; Holm und Deng, 1999) oder *det* Mutanten (*de-etiolated*; Chory *et al.*, 1989; Chory *et al.*, 1991) bezeichnet. Die *DET* und *COP* Gene sind negative Regulatoren der Photomorphogenese und die Genprodukte wirken innerhalb der Signaltransduktion, die von den Photorezeptoren ausgelöst wird.

Photomorphogenese kann durch Rot-, Dunkelrot- und Blaulicht induziert werden. Die rot/dunkelrot Rezeptoren sind Phytochrome, die im Dunkeln im Zytoplasma lokalisiert sind. Bei Licht wandern sie in den Nukleus und interagieren mit einem Transkriptionsfaktor, PIF3, der bei der Phytochrom gesteuerten Photomorphogenese eine Rolle spielt. PIF3 bindet an G-BOX Elemente von lichtregulierten Genen. Antisense Pflanzen bilden lange Hypokotyle im Licht aus.

Die Rolle von Hormonen bei der Photomorphogenese

Pflanzenhormone wirken in geringen Konzentrationen regulierend auf verschiedene Aspekte des Zellwachstums und der Entwicklung der Pflanze. Verschiedene Licht regulierte und, wie in dieser Arbeit gezeigt, durch Temperaturänderungen induzierte Reaktionen, wie das Längenwachstum des Stiels bzw. der Blätter (Behringer *et al.*, 1992), die Hemmung des Hypokotylwachstums (Shibaoka, 1994; Cary *et al.*, 1995; Lopez-Juez *et al.*, 1995), die Öffnung des Hypokotylhakens (Ecker, 1995) oder die Induktion/Repression der Expression nukleärer Gene, die charakteristisch für die Photomorphogenese sind, können auch durch die Behandlung mit Pflanzenhormonen ausgelöst werden (Cotton *et al.*, 1990; Deikmann und Hammer, 1995; Flores und Tobin, 1986; Symons und Reid, 2003). In den meisten Fällen hemmen Cytokinine, Abscisinsäure (ABA) und Ethylen die Zellelongation, während Brassinosteroide, Gibberelline und Auxin sie fördern. Einige photomorphogenetische Mutanten ähneln phänotypisch Mutanten der Phytohormon-Biosynthese oder Mutanten mit veränderter Sensivität für Phytohormone. Neben der Untersuchung des Hormonstatus bei den hier untersuchten Widtyp-Pflanzen, könnte die molekularbiologische und physiologische Untersuchung von durch Temperaturzyklen bzw. Hormonen induzierten Signalkaskaden bei

Mutanten nähere Aufschlüsse über die Rolle von Pflanzenhormonen bei der durch Temperatur induzierten Entwicklung von Keimpflanzen bringen. Dabei könnte experimentell untersucht werden, ob die Akkumulation von Hormonen wie Cytokininen oder Brassinosteroiden eine Folge der Induktion von Rhythmik ist oder der Auslöser, bzw. Hormone ohne die Innere Uhr Photomorphogenese nach Applikation von Temperaturwechseln induzieren.

Cytokinine spielen eine zentrale Rolle bei vielen Entwicklungsprozessen in Pflanzen. Zu den physiologischen Wirkungen der Cytokinine gehören u.a. die Blattexpansion, die Entwicklung von Chloroplasten und die Chlorophyllsynthese (Binns, 1994; Mok und Mok, 2001). Die Expression der durch Licht induzierbaren Gene LHCII und Chalconsynthase kann auch durch allerdings sehr hohe Cytokininkonzentrationen induziert werden (Gao und Kaufman, 1994; Karlin-Neumann *et al.*, 1988; Feinbaum *et al.*, 1991; Kubasek *et al.*, 1992). Der Phänotyp der *Arabidopsis*-Mutante *amp1* (*altered meristem program1*) korreliert mit einer erhöhten Cytokininkonzentration und zeigt eine konstitutive Photomorphogenese. *AMP1* kodiert wahrscheinlich für eine Glutamat Carboxypeptidase (Helliwell *et al.*, 2001). Chory *et al.* (1994) zeigten, dass die Deetiolierung von im Dunkeln wachsenden *Arabidopsis* Keimpflanzen (Entwicklung der Blätter und Chloroplasten, Hemmung des Hypokotylwachstums, erhöhte Expression Licht regulierter Gene) durch Zugabe von Cytokininen erfolgt.

Brassinosteroide haben eine zentrale Rolle bei der Photomorphogenese. Der Phänotyp von *cop* und *det* Mutanten kann durch exogene Brassinosteroidzugabe so verändert werden, dass sie im Dunkeln eine etiolierte Morphologie entwickeln. Die *det2* Mutante von *Arabidopsis* (Chory *et al.*, 1991) weist eine Sequenzhomologie mit der Steroid-5 α -Reduktase bei Säugetieren auf, d.h. das *DET2* Genprodukt hat möglicherweise eine Funktion innerhalb der Brassinosteroidsynthese. Licht scheint die Photomorphogenese durch eine Herabregulierung der Brassinosteroidsynthese zu kontrollieren. Möglicherweise haben zyklische Temperaturwechsel einen ähnlichen Effekt.

Es stellt sich die Frage, wie hormonelle und durch rhythmische Temperaturänderungen bzw. L/D-Wechsel (möglicherweise circadiane) erzeugte „photomorphogenetische“ Wirkungen zusammenhängen. Hormone könnten als *second messenger* bei der Verarbeitung der Temperatur- und Lichtwahrnehmung fungieren und so die Schnittstelle verschiedenster Signalstoffwechselwege sein (Reid *et al.*, 1990 und 1992; Ross *et al.*, 1992). Chory *et al.* (1994) schlugen auf Grund ihrer Untersuchungen an *det1* und *det2* Mutanten ein Modell vor, in dem Licht und Cytokinine unabhängig oder nur teilweise durch gemeinsame Signaltransduktionswege Licht regulierte Reaktionen kontrollieren. Endogene

Cytokininkonzentrationen in von im Dunkeln und unter L/D-Wechsel gewachsenen Pflanzen und in *det1* und *det2* Mutanten weisen nicht darauf hin, dass Lichtsignale nur durch eine einfache Konzentrationsänderung von Cytokinin umgesetzt werden. DET1 und DET2 könnten dabei Komponenten beider Signaltransduktionswege sein. Untersuchungen von Flores und Tobin (1986 und 1988) an *Lemna* unterstützen dieses Modell und zeigen, dass Cytokinine posttranskriptional auf die LHCII mRNA wirken könnten, während Licht eindeutig transkriptional regulierend wirkt. Untersuchungen der molekularen Signaltransduktionswege von Licht und Auxin zeigen, dass das Licht die Auxin-Signaltransduktionswege moduliert (Oyama *et al.*, 1997; Tian und Reed, 2001).

Morphologische Änderungen während der Deetiolierung werden nicht nur durch Änderungen von Hormonkonzentrationen vermittelt, sondern auch über Änderungen der Reaktionsfähigkeit auf diese pflanzlichen Hormone (O'Neill *et al.*, 2000; Symons und Reid, 2003). So scheint z.B. das aktive Phytochrom (Pfr) die Sensitivität des Hypokotyls für Gibberellinsäure (GA) zu hemmen. Im Dunkeln, wenn Pfr in die inaktive Form (Pf) umgewandelt ist, reagiert das Hypokotyl empfindlicher auf GA und es erfolgt eine erhöhte Zellstreckung. Obwohl in den unter 2h/2h-Temperaturwechseln gewachsenen Pflanzen Pf vorliegt, erfolgte keine Elongation des Hypokotyls der Erbse.

Rhythmen können durch geringe ($\Delta t = 8^\circ\text{C}$) rhythmische Temperaturänderungen innerhalb nicht zu kurzer Zeitintervalle (12 h/12 h) induziert und/oder synchronisiert werden. Pflanzen reagieren ähnlich auf gemäßigte Temperatursignale wie auf gemäßigte Lichtsignale. Geringe Temperaturänderungen beeinflussen deutlich die Genexpression und die „photomorphogenetische“ Ontogenese von Pflanzen. Aus den Daten kann nicht der Schluss gezogen werden, dass die Innere Uhr für die Ausbildung der Morphogenese entbehrlich sei, aber der Umkehrschluss ist auch nicht erlaubt. Das Problem besteht darin, dass bei den 2h/2h-Varianten nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Uhr bei jedem Temperaturwechsel neu verschoben wird und somit nur Fragmente von Tagesgängen wirksam werden. Man wird die Frage vermutlich nur an Mutanten der Inneren Uhr untersuchen können.

5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Pflanzen geringe Temperaturdifferenzen wahrnehmen und sie ähnlich wie Lichtsignale verarbeiten können. Beide Signaltypen kontrollieren und koordinieren zu einem beträchtlichen Teil das Pflanzenwachstum und die morphologische Entwicklung. Geringe Temperaturänderungen beeinflussen deutlich auch die Genexpression und die „photomorphogenetische“ Ontogenese von Pflanzen. Die Bandbreite der Reaktionen und die Beschaffenheit und Dauer des Temperatursignals sind in vielen Einzelheiten noch unklar. Der Terminus „Photomorphogenese“ muss allerdings neu definiert werden. Einzelne Pflanzenarten reagieren sehr unterschiedlich auf Temperaturwechsel. Die Gründe dafür sind nicht bekannt.

Für die durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss der endogenen Uhr auf die Photomorphogenese Höherer Pflanzen wurden Plexiglaskammern für die Pflanzenanzucht entwickelt, die eine präzise Temperaturregulierung ermöglichten ($\pm 0,1^\circ\text{C}$). Durch zyklische Temperaturwechsel (zyklischer Hitzeschock, moderate periodische Oszillationen der Temperatur) während kontinuierlicher Dunkelanzucht konnte das *Etiollement* bei den untersuchten Poaceen und Fabaceen in weiten Teilen aufgehoben werden (Deetiolierung). Ob der Temperaturwechsel ein-, zwei- oder zwölfstündlich erfolgte, ergab keinen signifikanten Unterschied. Weitere untersuchte Arten aus anderen Familien scheinen weniger sensitiv für die erfolgten Temperaturbehandlungen zu sein oder unfähig, auf Temperaturänderungen mit Deetiolierung zu reagieren.

Nach Anzucht unter zyklischen Temperaturwechseln (12h/12h) traten bei der untersuchten Gerste über 3 Tage hinweg circadiane Oszillationen mit Maxima zu Beginn der subjektiven Wärmephase und Minima zu Beginn der subjektiven Kältephase bei der Chlorophyll- und β -Carotin-Akkumulation auf. Die Gene von LHCII und SSU zeigten ebenfalls circadiane Oszillationen in der Akkumulation von mRNA. Die Maxima lagen in der Mitte der subjektiven Kälteperiode. Die untersuchten Proteine zeigten nach Anzucht unter zyklischen Temperaturwechseln (12h/12h) in der Akkumulation zum Teil ebenfalls eine circadiane Rhythmik. Die Maxima von LHCII lagen am Ende der subjektiven Kühlephase, d.h. am Morgen zum Zeitpunkt maximaler Chlorophyllsynthese. Dagegen hatten D1 und KF (Kopplungsfaktor der ATP-Synthetase) Maxima zu Beginn der subjektiven Kältephase. SSU und ELIP zeigten auf Proteinniveau keine Rhythmik. Bei kürzeren Temperaturwechseln (2h/2h) war keine Rhythmik nachweisbar. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden,

dass eine Rhythmik zwar induziert, die Uhr bei jedem Temperaturwechsel aber neu verschoben (rückversetzt) wird. Die Oszillationen könnten in etiolierten Pflanzen und den 2h/2h-Varianten auch bsw. durch Uhr-unabhängige Signaltransduktionswege verborgen werden. Die Expression bei Pflanzen, die sowohl unter konstanten Bedingungen als auch unter 1h/1h und 2h/2h-Temperaturwechseln gewachsen sind, war niedrig. Möglicherweise wird ein sehr empfindlicher Assay klarere Ergebnisse liefern. Im Gegensatz dazu zeigt sich nach Anzucht im L/D-Wechsel (2h/2h) unter freilaufenden Bedingungen (D/D) über vier Perioden eine Rhythmik ($\tau = 4,4$) bei der LHCII mRNA-Akkumulation. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass möglicherweise auch bei kurzen Temperaturwechseln eine hier nicht nachgewiesene Rhythmik induziert werden kann.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch zyklische Temperaturänderungen (12h/12h) die Induktion oder Synchronisation der endogenen Uhr erfolgte. Es fanden eine zeitlich koordinierte, circadian kontrollierte Pigment-, mRNA- und Protein-Akkumulation statt. Die Akkumulationsmenge von mRNA und Protein war jedoch deutlich niedriger als bei Anzucht unter L/D-Wechsel. Die Maxima lagen in der (subjektiven) Kühlephase, während sie bei L/D-Anzucht in der (subjektiven) Lichtphase liegen (Beator und Kloppstech, 1996).

Aufgrund der Ergebnisse lässt sich die These, dass die Kopplung von Genexpression an die Innere Uhr zu „photomorphogenetischen“ Wachstumsformen führt, nicht generalisieren. Allerdings wurde gezeigt, dass Reaktionen der Uhr auf Temperatursignale der Pflanze zusätzliche Informationen über ihre Umwelt liefern, die nützlich für Wachstum und Entwicklung sein können. Die Mechanismen, über die Licht und Temperatur circadiane Rhythmen beeinflussen, sind nicht aufgeklärt. Die Annahme der Existenz verschiedener Signalwege scheint sinnvoll. Wenn, wie wir glauben, die Uhr eine ausschlaggebende Rolle bei der Photomorphogenese spielt, so konnte diese Annahme mit dem hier benutzten Versuchsaufbau nicht allgemeingültig belegt werden. Untersuchungen mit Mutanten der Inneren Uhr werden vermutlich zu einem näheren Verständnis führen, dabei ist das Augenmerk hauptsächlich auf die Verwendung von monokotylen Pflanzen zu richten.

6 Literatur

- Adamska, I. (1997) ELIPs - Light-induced stress proteins. *Physiologia Plantarum* **100**, 794-805.
- Ahmad, M. und Cashmore, A.R. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 162-166.
- Argyroudi-Akoyunoglou, J.H. und Prombona, A. (1996). Light-independent endogenous circadian rhythm in the capacity for chlorophyll formation. *J. Photochem. Photobiol.* **36**, 271-277.
- Akiyama, M.; Minami, Y.; Nakajima, T.; Moriya, T.; und Shibata, S. (2001). Calcium and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induced expression of circadian clock gene *mPer1* in the mouse cerebellar granule cell culture. *J. Neurochem.* **78**, 499-508.
- Anderson, S.L.; Teakle, G.R.; Martino-Catt, S.J. und Kay, S.A. (1994). Circadian clock- and phytochrome-regulated transcription is conferred by a 78 bp cis-acting domain of the *Arabidopsis CAB2* promoter. *Plant J.* **6**, 457-470.
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: *Biological clocks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. XXV.* The Biological Laboratory, New York, 11-28
- Babourina, O.; Newman, I. und Shabala, S. (2002). Blue light-induced kinetics of H⁺ and Ca²⁺ fluxes in etiolated wild-type and phototropin-mutant *Arabidopsis* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2433-2438.
- Barkadottir, R.J.; Jensen, B.F.; Kreiberg, J.D.; Nielsen, P.S. und Gausing, K. (1987). Expression of selected nuclear genes during leaf development in barley. *Develop. Genetics* **8**, 495-511.

-
- Barak, S.; Tobin, E.M.; Andronis, C.; Sugano, S. und Green, R.M. (2000). All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends Plant Sci.* **5**, 517-522.
- Barlow, J.J.; Mathias, A.P.; Williamson, R. und Gammack, D.B. (1963). A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **13**, 61-66.
- Batschauer, A. (1999). Light perception in higher plants. *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 153-166.
- Batschauer, A.; Gilmartin, P.M.; Nagy, F. und Schäfer, E. (1994). The molecular biology of photoregulated genes. In: Kendrick, R.E. und Kronenberg, G.H.M. (Hrsg.): *Photomorphogenesis in plants*, 2nd ed., Kluwer, Dordrecht, 559-600.
- Beator, J. (1993). Die Bedeutung der circadianen Rhythmik und lichtkontrollierten Genexpression für die Entwicklung der Gerste (*Hordeum vulgare*). Dissertation, Universität Hannover, Deutschland.
- Beator, J. und Kloppstech, K. (1993). The circadian oscillator coordinates the synthesis of apoproteins and their pigments during chloroplast development. *Plant Physiol.* **103**, 191-196.
- Beator, J. und Kloppstech, K. (1996). Significance of circadian gene expression in higher plants. *Chronobiol. Int.* **13**, 319-339.
- Beator, J.; Pötter, E. und Kloppstech, K. (1992). The effect of heat shock on morphogenesis in barley - coordinated circadian regulation of messenger RNA levels for light-regulated genes and of the capacity for accumulation of chlorophyll protein complexes. *Plant Physiol.* **100**, 1780-1786.
- Beggs, C.J. und Wellmann, E. (1994). Photocontrol of flavonoid biosynthesis. In: Kendrick, R.E. und Kronenberg, G.H.M. (eds.), *Photomorphogenesis in plants*, 2nd ed., Kluwer, Dordrecht, 733-750.

- Behringer, F.J.; Davies, P.J. und Reid, J.B. (1992). Phytochrome regulation of stem growth and indole-3-acetic acid levels in the *lv* and *Lv* genotypes of *Pisum*. *Photochem. Photobiol.* **56**, 677-684.
- Binns, A.N. (1994). Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 173-196.
- Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**, 1513-1523
- Blake, M.S.; Johnston, K.H.; Russell-Jones, G.J. und Gotschlich, E.C. (1984). A rapid, sensitiv method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western-blot. *Anal. Biochem.* **136**, 175-179.
- Blasius, B.; Neff, R.; Beck, F. und Lüttge, U. (1999). Oscillatory model of crassulacean acid metabolism with a dynamic hysteresis switch. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* **266**, 93-101.
- Blum, H.; Beier, H. und Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bognar, L.K.; Hall, A.; Adam, E.; Thain, S.C.; Nagy, F. und Millar, A.J. (1999). The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **96**, 14652-14657.
- Borland, A.M.; Hartwell, J.; Jenkins, G.I.; Wilkins, M.B. und Nimmo, H.G. (1999). Metabolite control overrides circadian regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase and CO₂ fixation in *Crassulacean* acid metabolism. *Plant Physiol.* **121**, 889-896.
- Briggs, W.R.; Beck, C.F.; Cashmore, A.R.; Christie, J.M.; Hughes, J.; Jarillo, J.A.; Kagawa, T.; Kanegae, H.; Liscum, E.; Nagatani, A.; Okada, K.; Salomon, M.; Rudiger, W.; Sakai, T.; Takano, M.; Wada, M. und Watson, J.C. (2001). The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**, 993-997.

-
- Browse, J. und Xin, Z. (2001). Temperature sensing and cold acclimation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 241-246.
- Bruce, V.G. (1960). Environmental entrainment of circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **25**, 29-48.
- Brumfield, R.T. (1942), Cell growth and division in living root meristems. *Am. J. Bot.* **29**, 533-543.
- Bryant, T.R. (1972). Gas exchange in dry seeds: circadian rhythmicity in the absence of DNA replication, transcription, and translation. *Science* **178**, 634-636.
- Bühnemann, F. (1955). Das Endodiurnale System der Oedogoniumzelle. III. Über den Temperatureinfluß. *Z. Naturforsch.* **206**, 305-310.
- Bünning, E. (1973). *The physiological clock*. 3rd ed. Springer, New York.
- Campbell, P. und Braam, J. (2000). Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends Plant Sci.* **4**, 361-366.
- Cary, A.J.; Liu, W. und Howell, S.H. (1995). Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **107**, 1075-1082.
- Casal, J.J. (2000). Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochem. Photobiol.* **71**, 1-11.
- Cashmore, A.R.; Jarillo, J.A.; Wu, Y.J. und Liu, D. (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760-765.
- Cavalli-Sforza, L. (1969). *Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik*. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Deutschland.

-
- Chamovitz, D.A. und Deng, X.W. (1996). Light signaling in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**, 455–478.
- Chen, S.X. und Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur. J. Biochem.* **260**, 726-735.
- Choi, D.; Lee, Y.; Cho, H.T. und Kende, H. (2003). Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. *Plant Cell* **15**, 1386-1398.
- Chory, J.; Aguilar, N. und Peto, C.A. (1991). The phenotype of *Arabidopsis thaliana det1* mutants suggests a role for cytokinins in greening. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **45**, 21-29.
- Chory, J.; Peto, C.; Feinbaum, R.; Pratt, L. und Ausubel, F. (1989). *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* **58**, 991-999.
- Chory, J.; Reinecke, D.; Sim, S.; Washburn, T. und Brenner, M. (1994). A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (det mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiol.* **104**, 339-347.
- Chory, J.; Chatterjee, M.; Cook, R.K.; Elich, T.; Frankhauser, C.; Li, J.; Nagpal, P.; Neff, M.; Pepper, A.; Poole, D.; Reed, J. und Vitart, V. (1996). From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12066–12071.
- Clack, T.; Matthews, S. und Sharrock, R.A. (1994). The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequence and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol. Biol.* **25**, 413-417.
- Clouse, S.D. (2001). Integration of light and brassinosteroid signals in etiolated seedling growth. *Trends Plant Sci.* **6**, 443–445.
- Cosgrove, D.J. (1994). Photomodulation of growth. In: Kendrick, R.E. und Kronenberg, G.H.M. (Hrsg.): *Photomorphogenesis in plants*, 2nd ed., Kluwer, Dordrecht, 631-658.

-
- Cosgrove, D.J. (2000). New genes and new biological roles for expansins. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 73-78.
- Cotton, J.; Ross, C.; Byrne, D. und Colbert, J. (1990). Down-regulation of phytochrome mRNA abundance by rde light and benzyladenine in etiolated cucumber cotyledons. *Plant Mol. Biol.* **14**, 707-714.
- Cugini, P. (1993). Chronobiology: principles and methods. *Annali Istituto Superiore Sanità* **29**, 483-500.
- Dale, J.E. (1988). The control of leaf expansion. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 267-295.
- Deikman, J. und Hammer, P.E. (1995). Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **108**, 47-57.
- Deng, X.W.; Caspar, T. und Quail, P.H. (1991). *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **5**, 1172-1182.
- Deshaies, R.J. und Meyerowitz, E. (2000). COP1 patrols the night beat. *Nat. Cell Biol.* **2**, E102-104.
- Devlin, P.F. und Kay, S.A. (2001). Circadian photoperception. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 677-694.
- Downs, R.J. (1955). Photoreversibility of leaf and hypocotyl elongation of dark grown red kidney bean seedlings. *Plant Physiol.* **30**, 468-473.
- Dowson-Day, M.J. und Millar, A.J. (1999). Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J.* **17**, 63-71.

-
- Dresselhaus, T.; Barcelo, P.; Hagel, C.; Lorz, H. und Humbeck, K. (1996). Isolation and characterization of a *Tritordeum* cDNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase that is circadian-clock-regulated. *Plant Mol. Biol.* **30**, 1021-1033.
- Dunlap, J.C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-290.
- Ecker, J.R. (1995). The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**, 667-675.
- Emery, P.T.; So, W.V.; Kaneko, M.; Hall, J.C. und Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* **95**, 669-679.
- Engelmann W. (1988). Evolution and selective advantage of circadian rhythms. *Acta Physiologica Polonica.* **39**, 345-356.
- Engelmann, W. und Antkowiak, B. (1998). Ultradian rhythms in *Desmodium*. *Chronobiol. Internat.* **15**, 293-307.
- Fankhauser, C. und Staiger, D. (2002). Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* **216**, 1-16.
- Feinbaum, R.L.; Storz, G. und Ausubel, F. (1991). High intensity, blue light regulated expression of chimeric chalcone synthase genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Mol. Gen. Genet.* **226**, 449-456.
- Feldman, J.F. und Hoyle, M. (1973). Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **75**, 605-613.
- Fejes, E. und Nagy, F. (1998). Molecular analysis of circadian-clock regulated gene expression in plants: features of the 'output' pathways. In: Lumsden, P.J. und Millar, A.J. (Hrsg.). *Biological rhythms and photoperiodism in plants*. Bios Scientific Publishers, Oxford, 99-114.

- Fejes, E.; Pay, A.; Kanevsky, I.; Szell, M.; Adam, E.; Kay, S. und Nagy, F. (1990). A 268 bp upstream sequence mediates the circadian clock-regulated transcription of the wheat Cab-1 gene in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **15**, 921-932.
- Finlayson, S.A.; Lee, I.J. und Morgan, P.W. (1998). Phytochrome B and the regulation of circadian ethylene production in *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol.* **116**, 17-25.
- Flores, S. und Tobin, E. (1986). Benzyladenine modulation of the expression of two genes for nuclear-encoded chloroplasts proteins in *Lemna gibba*: apparent post-transcriptional regulation. *Planta* **168**, 340-349.
- Flores, S. und Tobin, E. (1988). Cytokinin modulation of LHCP mRNA levels: the involvement of post-transcriptional regulation. *Plant Mol. Biol.* **11**, 409-415.
- Frensch, J. und Hsiao, T.C. (1994). Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential. *Plant Physiol.* **104**, 247-254.
- Gaba, V. und Black, M. (1983). The control of cell growth by light. In: *Encycl. Plant Physiol., New Series Vol. 16A*; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 358-400.
- Gao, J. und Kaufman, L.S. (1994). Blue-light regulation of the *Arabidopsis thaliana Cab1* gene. *Plant Physiol.* **104**, 1251-1257.
- Gendreau, E.; Traas, J.; Desnos, T.; Grandjean, O.; Caboche, M. und Hofte, H. (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**, 295-305.
- Gomez, L.A. und Simon, E. (1995). Circadian rhythm of *Robinia pseudoacacia* leaflet movements: role of calcium and phytochrome. *Photochem. Photobiol.* **61**, 210-215.
- Gooch, V.D.; Wehseler, R.A. und Gross, C.G. (1994). Temperature effects on the resetting of the phase of the *Neurospora* circadian rhythm. *J. Biol. Rhythms* **9**, 83-94.
- Gorton, H.L.; Williams, W.E. und Assmann, S.M. (1993). Circadian rhythms in stomatal responsiveness to red and blue light. *Plant Physiol.* **103**, 399-406.

- Green, R.M. und Tobin, E.M. (1999). Loss of the circadian clock associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clockregulated gene expression. Proc. Natl Acad. Sci. USA **96**, 4176–4179.
- Green, R.M.; Tingay, S.; Wang, Z.Y. und Tobin, E.M. (2002). Circadian rhythms confer a higher level of fitness to *Arabidopsis* plants. Plant Physiol. **129**, 576-584.
- Gwinner, E. und Brandstätter, R. (2001). Complex bird clocks. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **356**, 1801-1810.
- Hardeland, R. (1995). Cosine or non-sinusoidal fitting as a means of detection of rhythms and determination of period lengths in short biological time series. Biol. Rhythm Res. **26**, 194-201.
- Harlow, H.J.; Hillman, S.S. und Hoffman, M. (1976). The effect of temperature on digestive efficiency in the herbivorous lizard *Dipsosaurus dorsalis*. J. Comp. Physiol. **111**, 1-6.
- Harmer, S.L.; Hogenesch, J.B.; Straume, M.; Chang, H.-S. und Han, B. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. Science **290**, 2110-2113.
- Heintzen, C.; Melzer, S.; Fischer, R.; Kappeler, S.; Apel, K. und Staiger, D. (1994). A light- and temperature-entrained circadian clock controls expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue. Plant J. **5**, 799-813.
- Heintzen, C.; Nater, M.; Apel, K. und Staiger, D. (1997). AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 8515-8520.
- Helfrich-Forster, C.; Winter, C.; Hofbauer, A.; Hall, J.C. und Stanewsky, R. (2001). The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. Neuron **30**, 249-261.

- Helliwell, C.A.; Chin-Atkins, A.N.; Wilson, I.W.; Chapple, R.; Dennis, E.S. und Chaudhury A. (2001). The *Arabidopsis* *AMPI* gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell* **13**, 2115-2125.
- Hennessey, T.L. und Field, C.B. (1991). Circadian rhythms in photosynthesis. *Plant Physiol.* **96**, 831-836.
- Hicks, K.A.; Millar, A.J.; Carré, I.A.; Somers, D.E. und Straume. M. (1996). Conditional circadian dysfunction of the *Arabidopsis* *early-flowering 3* mutant. *Science* **274**, 790–792.
- Holm, M. und Deng, X.W. (1999). Structural organization and interactions of COP1, a light-regulated developmental switch. *Plant Mol. Biol.* **41**, 151-158.
- Honma, S.; Kanematsu, N.; Katsuno, Y. und Honma, K. (1996). Persistence of circadian oscillation while locomotor activity and plasma melatonin levels became aperiodic under prolonged continuous light in the rat. *Neuroscience Letters.* **216**, 49-52.
- Hutin, C.; Nussaume, L.; Moise, N.; Moya, I.; Kloppstech, K. und Havaux, M. (2003). Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4921-4926.
- Ibrahim, C.A.; Lecharny, A. und Millet, B. (1981). Circadian endogenous growth rhythm in tomato. *Plant Physiol.* **67** (Suppl. 636), 113.
- Jarillo, J.A.; Gabrys, H.; Capel, J.; Alonso, J.M.; Ecker, J.R. und Cashmore, A.R. (2001). Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* **410**, 952-954.
- Jaworski, K.; Szmidt-Jaworska, A.; Tretyn, A. und Kopcewicz, J. (2003). Biochemical evidence for a calcium-dependent protein kinase from *Pharbitis nil* and its involvement in photoperiodic flower induction. *Phytochemistry* **62**, 1047-1055.

- Johnson, C.H. (2000). PRC atlas.
<http://johsonlab.biology.vanderbilt.edu/prcatlas/prcatlas.html>.
- Johnson, C.H. (2001). Endogenous timekeepers in photosynthetic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 695-728.
- Johnson, C.H.; Knight, M.R.; Kondo, T.; Masson, P.; Sedbrook, J.; Haley, A. und Trewavas, A. (1995). Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science* **269**, 1863-5186.
- Jones, T.L. und Ort, D.R. (1997). Circadian regulation of sucrose phosphate synthase activity in tomato by protein phosphatase activity. *Plant Physiol.* **113**, 1167-1175.
- Jones, T.L.; Tucker, D.E. und Ort, D.R. (1998). Chilling delays circadian pattern of sucrose phosphate synthase and nitrate reductase activity in tomato. *Plant Physiol.* **118**, 149-58.
- Jouve, L.; Greppin, H. und Agosti, R.D. (1998). *Arabidopsis thaliana* floral stem elongation: evidence for an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 469-472.
- Kaczorowski, K.A. und Quail, P.H. (2003). *Arabidopsis Pseudo-Response Regulator7* is a signaling intermediate in phytochrome-regulated seedling deetiolation and phasing of the circadian clock. *Plant Cell* **15**, 2654-65.
- Karlin-Neumann, G.A.; Sun, L. und Tobin, E. (1988). Expression of light harvesting chlorophyll a/b binding protein genes is phytochrome-regulated in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **88**, 1323-1331.
- Kay, S.A. und Millar, A.J. (1993). Circadian-regulated *cab* gene transcription in higher plants. In: *The molecular genetics of biological rhythms*. Young, M.W. (Hrsg), Marcel Dekker, New York, 73-89.
- Kellmann, J.W.; Hoffrogge, R. und Piechulla, B. (1999). Transcriptional regulation of oscillating steady-state *Lhc* mRNA levels: characterization of two *Lhca* promoter fragments in transgenic tobacco plants. *Biol. Rhythm Res.* **30**, 264-271.

-
- Khanna, R.; Kikis, E.A. und Quail, P.H. (2003). *Early Flowering 4* functions in phytochrome B-regulated seedling de-etiolation. *Plant Physiol.* (in Druck).
- Kloppstech, K. (1985). Diurnal and circadian rhythmicity in the expression of light- induced plant nuclear messenger RNAs. *Planta* **165**, 502-506.
- Kloppstech, K. (1990). Wie wird die Innere Uhr von Pflanzen eingestellt. *Spektrum der Wissenschaft* **5**, 24-28.
- Kloppstech, K.; Otto, B. und Sieralta, W. (1991). Cyclic temperature treatments of dark pea seedlings induce the rise of specific transcript levels of light regulated genes related to photomorphogenesis. *Mol. Gen. Genet.* **225**, 468-473.
- Kloss, B.; Price, J.L.; Saez, L.; Blau, J.; Rothenfluh, A.; Wesley, C.S. und Young, M.W. (1998). The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I ϵ . *Cell* **94**, 97-107.
- Kolar, C.; Fejes, E.; Adam, E.; Schäfer, E.; Kay, S. und Nagy, F. (1998). Transcription of *Arabidopsis* and wheat *Cab* genes in single tobacco transgenic seedlings exhibits independent rhythms in a developmentally regulated fashion. *Plant J.* **13**, 563-569.
- Konopka, R.J. und Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2112-2116.
- Körtner, G. und Geiser, F. (2000). The temporal organisation of daily torpor and hibernation: circadian and circannual rhythms. *Chronobiol. Internat.* **17**, 103-128.
- Koyro, H.W. (1989). Physiologische und feinstrukturelle Grundlagen ökologischer Anpassungen an Salzstandorte. Dissertation, Universität Hannover, Deutschland.
- Kroczek, R.A.und Siebert, E. (1990). Optimization of northern analysis by vacuum blotting, RNA-transfer visualization, and ultraviolet fixation. *Anal. Biochem.* **184**, 90-95.

-
- Kubasek, W.L.; Shirley, B.W.; McKillop, A.; Goodman, H.M.; Briggs, W. und Ausubel, F.M. (1992). Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* **4**, 1229-1236.
- Kume, K.; Zylka, M.J.; Sriram, S.; Shearman, L.P. und Weaver, D.R. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193-205.
- Kutschera, U (2000). Cell expansion in plant development. *Revista-Brasileira-de-Fisiologia-Vegetal.* **12**, 65-95.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lecharyny, A. und Wagner, E. (1984). Stem extension rate in light-grown plants. Evidence for an endogenous circadian rhythm in *Chenopodium rubrum*. *Physiol. Plant* **60**, 437-443.
- Lee, K.; Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (2000). Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science* **289**, 107-110.
- Li, H.; Washburn, T. und Cory, J. (1993). Regulation of gene expression by light. *Opin. Cell. Biol.* **5**, 455-460.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **148**, 350-382.
- Lin, C. (2000). Plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* **5**, 337-342.
- Lin, R.F.; Chou, H.M. und Huang, T.C. (1999). Priority of light/dark entrainment over temperature in setting the circadian rhythms of the prokaryote *Synechococcus* RF-1. *Planta* **209**, 202-206.

- Lin, C.T.; Yang, H.Y.; Guo, H.W.; Mockler, T.; Chen, J. und Cashmore, A.R. (1998). Enhancement of blue light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2686-2690.
- Liscum, E. und Hangarter, R.P. (1993). Light-stimulated apical hook opening in wildtype *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **101**, 567-572.
- Liu, Y. (2003). Molecular mechanisms of entrainment in the *Neurospora* circadian clock. *J. Biol. Rhythms* **18**, 195-205.
- Liu, Y.; Loros, J. und Dunlap, J.C. (2000). Phosphorylation of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY determines its degradation rate and strongly influences the period length of the circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 234-239.
- Liu, Y.; Mellow, M.; Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1998). How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science* **281**, 825-829.
- Loercher, L. (1966). Phytochrome changes correlated to mesocotyl inhibition in etiolated *Avena* seedlings. *Plant Physiol.* **41**, 932-936.
- Lopez-Juez, E.; Kobayashi, M.; Sakurai, A.; Kamiya, Y. und Kendrick, R.E. (1995). Phytochrome, gibberellins, and hypocotyl growth. *Plant Physiol.* **107**, 131-140.
- Lopez-Molina, L.; Conquet, F.; Dubois-Dauphin, M. und Schibler, U. (1997). The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J.* **16**, 6762-6771.
- Loros, J.J. und Feldman, J.F. (1986). Loss of temperature compensation of circadian period length in the *frq-9* mutant of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Rhythms* **1**, 187-198.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951). Protein measurements with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

-
- Luo, C.; Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1998). Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ. *EMBO J.* **17**, 1228-1235.
- Majercak, J.; Sidote, D.; Hardin, P.E. und Edery, I. (1999). How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. *Neuron* **24**, 219-230.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York, 7.19-7.22.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning, a laboratory manual*, 1st ed., Cold Spring Harbor, New York, 191-201.
- Martino-Catt, S. und Ort, D.R. (1992). Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling-sensitive plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3731-3735.
- Mas, P.; Alabadi, D.; Yanovsky, M.J.; Oyama, T. und Kay, S.A. (2003). Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 223-236.
- McClung, C.R. (2001). Circadian rhythms in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 139-162.
- McNellis, T.W. und Deng, X.W. (1995). Light control of seedling morphogenetic pattern. *Plant Cell* **7**, 1749-1761.
- McWatters, H.G.; Bastow, R.M.; Hall, A. und Millar, A.J. (2000). The ELF3 Zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* **408**, 716-720.
- Merrow, M.; Brunner, M. und Roenneberg, T. (1999) Assignment of circadian function for the *Neurospora* clock gene frequency. *Nature* **399**, 584-586.
- Meyer, V. (1990). *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 6.Auflage, Verlag Salle und Sauerländer.

-
- Millar, A.J. und Kay, S.A. (1996). Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling CAB gene transcription in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 15491-15496.
- Millar, A.J.; McGrath, R.B. und Chua, N.H. (1994). Phytochrome phototransduction pathways. Annu. Rev. Genet. **28**, 325–349.
- Millar, A.J.; Short, S.R.; Chua, N.-H. und Kay, S.A. (1992). A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. Plant Cell **4**, 1075-1087.
- Mitsui, A.; Kumazawa, S.; Takahashi, A.; Ikemoto, H. und Arai, T. (1986). Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. Nature **323**, 720-722.
- Mittag, M.; Lee, D.-H. und Hastings, J.W. (1994). Circadian expression of the luciferin-binding protein correlates with the binding of a protein to the 3' untranslated region of its mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 5257-5261.
- Mohr, H. (1994). Coaction between pigment systems. In: Kendrick, R.E. und Kronenberg, G.H.M. (Hrsg.): Photomorphogenesis in plants, 2nd ed., Kluwer, Dordrecht, 353-373.
- Mok, D.W. und Mok, M.C. (2001). Cytokinin metabolism and action. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **52**, 89-118.
- Moore, R.Y. und Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. Brain Res. **42**, 201-206.
- Murata, N. und Los, D.A. (1997). Membrane fluidity and temperature perception. Plant Physiol. **115**, 875-879.
- Nagy, F.; Kay, S.A. und Chua, N.-H. (1988). A circadian clock regulates transcription of the wheat Cab-1 gene. Genes Dev. **2**, 376-382.

-
- Nagy, F. und Schäfer, E. (2002). Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 329-355.
- Naidoo, N.; Song, W.; Hunter-Ensor, M. und Sehgal, A. (1999). A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. *Science* **285**, 1737-1741.
- Nakamichi, N.; Matsushika, A.; Yamashino, T. und Mizuno, T. (2003). Cell autonomous circadian waves of the APRR1/TOC1 quintet in an established cell line of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **44**, 360-365.
- Nakashima, H. (1986). Phase shifting of the circadian conidiation rhythm in *Neurospora crassa* by calmodulin antagonists. *J. Biol. Rhythms* **1**, 163-169.
- Nakashima, H. und Hastings, J.W. (1989). Phase determination of the circadian rhythm of conidiation in heterocaryons between two out-of-phase mycelia in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Rhythms* **4**, 377-387.
- Neff, R.; Blasius, B.; Beck, F. und Lüttge, U. (1998). Thermodynamics and energetics of the tonoplast membrane operating as a hysteresis switch in an oscillatory model of Crassulacean acid metabolism. *J. Membr. Biol.* **165**, 37-43.
- Neff, M.M.; Fankhauser, C. und Chory, J. (2000). Light: an indicator of time and place. *Genes Dev.* 2000 **14**, 257-271.
- Ni, M.; Tepperman, J.M. und Quail, P.H. (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**, 657-667.
- Nishiwaki, T.; Iwasaki, H.; Ishiura, M. und Kondo, T. (2000). Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 495-499.

-
- Njus, D.; McMurry L. und Hastings J. W. (1977). Conditionality of circadian rhythmicity: synergistic action of light and temperature. *J. Comp.e Physiol.* **117**, 335-344.
- Norris, S.R.; Barrette, T.R. und DellaPenna, D. (1995). Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* **7**, 2139-2149.
- Oberschmidt, O.; Hücking, C. und Piechulla, B. (1995). Diurnal Lhc gene expression is present in many but not all species of the plant kingdom. *Plant Mol.* **27**, 147-153.
- Oelmuller, R.; Schneiderbauer, A.; Herrmann, R.G. und Kloppstech, K. (1995). The steady-state mRNA levels for thylakoid proteins exhibit coordinate diurnal regulation. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 478-484.
- Oh-hashii, K.; Naruse, Y. und Tanaka, M. (2002). Intracellular calcium mobilization induces period genes via MAP kinase pathways in NIH3T3 cells. *FEBS Lett.* **516**, 101-105.
- Oltmanns, O. (1960). Über den Einfluß der Temperatur auf die endogene Tagesrhythmik und Blühinduktion bei der Kurztagpflanze *Kalanchoe blossfeldiana*. *Planta* **54**, 233-264.
- O'Neill, D.P.; Ross, J.J. und Reid, J.B. (2000). Changes in gibberellin A1 levels and response during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiol.* **124**, 805–812.
- Otto, B.; Ohad, I. und Kloppstech, K. (1992). Temperature treatments of dark grown pea seedlings cause an accelerated greening in the light at different levels of gene expression. *Plant Mol. Biol.* **18**, 887-896.
- Orvar, B.L.; Sangwan, V.; Omann, F. und Dhindsa, R. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* **23**, 785-794.
- Osterlund, M.T.; Hardtke, C.S.; Wie, N. und Deng, X.W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**, 462-466.

- Ouyang, Y.; Andersson, C.R.; Kondo, T.; Golden, S.S. und Johnson, C.H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8660-8664.
- Oyama, T.; Shimura, Y. und Okada, K. (1997). The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.* **11**, 2983–2995.
- Pangerl, B.; Pangerl, A. und Reiter R. J. (1990). Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland. *J. Neural Transmission* **81**, 17-29.
- Pardossi, A.; Pritchard, J. und Tomos, A.D. (1994). Leaf illumination and root cooling inhibit bean leaf expansion by decreasing turgor pressure. *J. Exp. Bot.* **45**, 415-422.
- Pemberton, R.E.; Liberti, P. und Baglioni, C. (1975). Isolation of messenger RNA from polysomes by chromatography on oligo(dT)-cellulose. *Analyt. Biochem.* **66**, 18-28.
- Piechulla, B. (1999). Circadian expression of the light-harvesting complex protein genes in plants. *Chronobiol Int.* **16**, 115-128.
- Pilgrim, M.L.; Caspar, T.; Quail, P.H. und McClung, C.R. (1993). Circadian and light-regulated expression of nitrate reductase in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **23**, 349–64.
- Pilgrim, M.L. und 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.
- Pittendrigh, C.S. (1966). The circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* pupae: A model for the photoperiodic clock. *Z. Pflanzenphysiol.* **54**, 275–307.
- Pittendrigh, C.S. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**, 1018-1029.

- Pittendrigh C.S. (1974). Circadian oscillations in cells and the circadian organization of multicellular systems. In: Schmitt, F.O. und Worden, F.G. (Hrsg.), The neurosciences third study program. MIT Press, Cambridge. 437-458.
- Pittendrigh, C.S. und Minis, D. (1964). The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. Amer. Nat. **98**, 261-294.
- Pjon, C.J. und Furuya, M. (1967). Phytochrome action in *Oryza sativa* L. I. Growth responses of etiolated coleoptiles to red, far-red and blue light. Plant Cell. Physiol. **8**, 709-718.
- Pott, M.B.; Kellmann, J.W. und Piechulla, B. (2000). Circadian and phytochrome control act at different promotor regions of the tomato Lhca3 gene. J. Plant Physiol. **157**, 449-452.
- Pritchard, J.; Hetherington, P.R.; Fry, S.C. und Tomos, A.D. (1993). Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along growing regions of maize roots. J. Exp. Bot. **44**, 1281-1289.
- Pursiheimo, S.; Mulo, P.; Rintamaki, E. und Aro, E.M. (2001). Coregulation of light-harvesting complex II phosphorylation and *lhcb* mRNA accumulation in winter rye. Plant J. **26**, 317-327.
- Quail, P.H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **3**, 85-93.
- Quail, P.H.; Boylan, M.T.; Parks, B.M.; Short, T.W.; Xu, Y. und Wagner, D. (1995). Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. Science **268**, 675-680.
- Rascher, U.; Blasius, B.; Beck, F. und Lüttge, U. (1998). Temperature profiles for the expression of endogenous rhythmicity and arrhythmicity of CO₂ exchange in the CAM plant *Kalanchoë daigremontiana* can be shifted by slow temperature changes. Planta **207**, 76-82.

-
- Reid, J.B.; Hasan, O. und Ross, J.J. (1990). Internode length in *Pisum*: giberellins and the response to far-red rich light. *J. Plant Physiol.* **137**, 46-52.
- Reid, J.B.; Ross, J.J. und Swain, S.M. (1992). Internode length in *Pisum*: a new, slender mutant with elevated levels of C(19) giberellins. *Planta* **188**, 462-467.
- Renn, S.C.P.; Park, J.H.; Rosbash, M.; Hall, J.C. und Taghert, P.H. (1999). A *pdf* neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* **99**, 83-95.
- Rensing, L.; Kallies, A.; Gebauer, G. und Mohsenzadeh, S. (1995). The effects of temperature change on the circadian clock of *Neurospora*. *Circadian clocks and their adjustment*. Ciba Foundation Symposium, J. Wiley, Chichester, Vol. **183**, 26-50.
- Riesselmann, S. und Piechulla, B. (1990). Effect of dark phases and temperature on the chlorophyll a/b binding protein mRNA level oscillations in tomato seedlings. *Plant Mol. Biol.* **14**, 605-616.
- Roenneberg, T. und Merrow, M. (1998). Molecular circadian oscillators: an alternative hypothesis. *J. Biol. Rhythms* **13**, 167-179.
- Roenneberg, T. und Merrow, M. (2000). Circadian clocks: *Omnes viae Romam ducunt*. *Curr. Biol.* **10**, R742-R745.
- Roenneberg, T. und Rehman, J. (1996). Nitrate, a nonphotic signal for the circadian system. *FASEB J.* **10**, 1443-1447.
- Ross, J.J.; Willis, C.L.; Gaskin, P. und Reid, J.B. (1992). Shoot elongation in *Lathyrus elongatus* L.: giberellin levels in light and dark-grown tall and dwarf seedlings. *Planta* **187**, 10-13.
- Rundle, S.J. und Zielinski, R.E. (1991). Alterations in barley ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase gene expression during development and in response to illumination. *J. Biol. Chem.* **266**, 14802-14807.

-
- Sage-Ono, K.; Ono, M.; Harada, H. und Kamada, H. (1998). Accumulation of a clock-regulated transcript during flower-inductive darkness in *Pharbitis nil*. *Plant Physiol.* **116**, 1479-1485.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanders, D.; Brownlee, C. und Harper, J.F. (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell.* **11**, 691-706.
- Schaffer, R.; Ramsay, N.; Samach, A.; Corden, S.; Putterill, J.; Carré, I.A. und Coupland, G. (1998). The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**, 1219-1229.
- Selby, C.P.; Thompson, C.; Schmitz, T.M.; van Gelder, R.N. und Sancar, A. (2000). Functional redundancy of cryptochromes and classical photoreceptors for nonvisual ocular photoreception in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14697–14702.
- Sharrock, R.A. und Quail, P.H. (1989). Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* **3**, 1745-1757.
- Shibaoka, H. (1994). Plant hormone induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the crosslinking between microtubules and the plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 527-544.
- Somers, D.E.; Sharrock, R.A.; Tepperman, J.M. und Quail, P.H. (1991). The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell.* **12**, 1263-1274.
- Somers, D.E.; Webb, A.A.; Pearson, M. und 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.

- Spalding, E. und Cosgrove, D.J. (1989). Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light induced growth inhibition in cucumber. *Planta* **178**, 407-410.
- Spalding, E. und Cosgrove, D.J. (1992). Mechanism of blue-light induced plasma-membrane depolarization in etiolated cucumber hypocotyls. *Planta* **188**, 199-205.
- Staiger, D.; Allenbach, L.; Salathia, N.; Fiechter, V.; Davis, S.J.; Millar, A.J.; Chory, J. und Fankhauser, C. (2002). The *Arabidopsis* *SRR1* gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function. *Genes and Development* **17**, 256-268.
- Stephan, F.K. und Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1583-1586.
- Stern, K. und Bünning, E. (1929). Über die tagesperiodischen Bewegungen der Primärblätter von *Phaseolus multiflorus*. I. Der Einfluß der Temperatur auf die Bewegungen. *Ber. Dtsch. Biol. Ges.* **47**, 565-584.
- Sugano, S.; Andronis, C.; Ong, M.S.; Green, R.M. und Tobin, E.M. (1999). The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12362–12366.
- Sugiyama, N; Izawa, T; Oikawa, T und Shimamoto, K. (2001). Light regulation of circadian clock-controlled gene expression in rice. *Plant J.* **26**, 607-15.
- Sweeney, B.M. (1987). *Rhythmic phenomena in plants*, 2nd ed. Academic Press, London, 172 ff.
- Symons, G.M. und Reid, J.B. (2003). Hormone levels and response during de-etiolation in pea. *Planta* **216**, 422-431.
- Takahashi, J. S. und Zatz, M. (1982). Regulation of circadian rhythmicity. *Science.* **217**, 1104-1111.

- Tavladoraki, P.; Kloppstech, K. und Argyroudi-Akoyunoglou, 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.
- Terry, O.W. und Edmuns, L.N. (1970). Phasing of cell division by temperature cycles in *Euglena* cultured autotrophically under continuous illumination. *Planta* **93**, 106-127.
- Terzaghi, W.B. und Cashmore, A.R. (1995). Light-regulated transcription. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **46**, 445-474.
- Thain, S.C.; Hall, A. und Millar, A.J. (2000). Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Curr. Biol.* **10**, 951-956.
- Thomas, B. (1998). Photoperiodism: an overview. In: Lumsden, P.J.; Millar, A.J. (Hrsg.), *Biological rhythms and photoperiodism in plants*, Bios Scientific Publishers, Oxford, 151-165.
- Thomas, P.S. (1980). Hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5201-5205.
- Thomas, B. und Vince-Prue, D. (1997). *Photoperiodism in plants*. 2nd, Academic Press, San Diego.
- Thomashow, M.F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **50**, 571-599.
- Tian, Q. und Reed, J. (2001). Molecular links between light and auxin signalling pathways. *Plant Growth Regul.* **20**, 274-280.
- Tomos, A.D. und Pritchard, J. (1994). Biophysical and biochemical control of cell expansion in roots and leaves. *J. Exp. Bot.* **45**, 1721-1731.
- Torre, S. und Moe, R. (1998). Temperature, DIF and photoperiod effects on the rhythm and rate of stem elongation in *Campanula isophylla* Moretti. *Scientia Horticulturae* **72**, 123-133.

- Towbin, H.; Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4350-4354.
- Trewavas, A.J. (1983). Plant growth substances - metabolic flywheels for plant development. Cell Biol. Int. Rep. **7**, 569-575.
- Tutty, J.R.; Hicklenton, P.R.; Kristie, D.N. und McRae, K.B. (1994). The influence of photoperiod and temperature on the kinetics of stem elongation in *Dendranthema grandiflorum*. J.Am.Soc.Hort.Sci. **119**, 138-143.
- Underwood, H. und Calaban, M. (1987). Pineal melatonin rhythms in the lizard *Anolis carolinensis*: I. Response to light and temperature cycles. J. Biol. Rhythms **2**, 179-193.
- van der Horst, G.T.; Muijtjens, M.; Kobayashi, K.; Takano, R.; Kanno, S.; Takao, M.; de Wit, J.; Verkerk, A.; Eker, A. P. M.; van Leenen, D.; Buijs, R.; Bootsma, D.; Hoeijmakers J. H. J. und Yasui, A. (1999). Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. Nature **398**, 627-630.
- van Volkenburgh, E. und Cleland, R.E. (1990). Light-stimulated cell expansion in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. I. Growth can occur without photosynthesis. Planta **182**, 72-76.
- van Volkenburgh, E.; Cleland, R.E. und Watanabe, M. (1990). Light-stimulated cell expansion in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. II. Quantity and quality of light required. Planta **182**, 77-80.
- Viner, N.; Whitelam, G. und Smith, H. (1988). Calcium and phytochrome control of leaf unrolling in dark-grown barley seedlings. Planta **175**, 209-213.
- Virgin, H.I. (1972). Chlorophyll biosynthesis and phytochrom action. In: Mitrakos, K.; Shropshire, W. (Hrsg.): Phytochrom, Academic Press New York, 371-404.

-
- Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 615-619.
- Wang, Z.Y. und Tobin, E.M. (1998). Constitutive expression of the *circadian clock associated 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**, 1207-1217.
- Warneck, H.M.; Fulton, D.C.; Seitz, H.U. und Fry, S.C. (1998). Transport, degradation and cell wall integration of XXFGol, a growth-regulating nonasaccharide of xyloglucan, in pea stems. *Planta* **204**, 78-85.
- Watillon, B.; Kettmann, R.; Boxus, P. und Burny, A. (1993). Developmental and circadian pattern of rubisco activase mRNA accumulation in apple plants. *Plant Mol. Biol.* **23**, 501-509.
- Weber, E. (1957). *Grundriß der biologischen Statistik*. VEB G. Fischer Verlag, Jena, DDR.
- Wei, N. und Deng, X.W. (1992). COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**, 1507-1518.
- Wheeler, D.A.; Hamblen-Coyle, M.J.; Dushay, M.S. und Hall, J.C. (1993). Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind, or both. *Biol. Rhythms* **8**, 67-94.
- Whitelam, G.C. und Harberd, N.P. (1994). Action and function of phytochrome family members revealed through the study of mutant and transgenic plants. *Plant Cell Environ.* **17**, 615-625.
- Wilkins, M.B. (1983). The circadian rhythm of carbon-dioxide metabolism in *Bryophyllum*: the mechanism of phase shift induction by thermal stimuli. *Planta* **157**, 471-480.
- Wilkins, M.B. (1992). Tansley review No. 37. Circadian rhythms: their origin and control. *New Phytol.* **121**, 347-375.

-
- Wollnik, F. (1992). Neural control of circadian rhythms in mammals. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft.* **85.2**, 231-246.
- Xu, W.; Purugganan, M.M.; Polisensky, D.H.; Antosiewicz, D.M.; Fry, S.C. und Braam, J. (1995). *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**, 1555-1567.
- Young, M.W. und Kay, S.A. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 702-715.
- Zheng, C.C.; Porat, R.; Lu, P. und O'Neill, S.D. (1998). PNZIP is a novel mesophyll-specific cDNA that is regulated by phytochrome and the circadian rhythm and encodes a protein with a leucine zipper motif. *Plant Physiol.* **116**, 27-35.
- Zhong, H.H. und McClung, C.R. (1996). The circadian clock gates expression of two *Arabidopsis* catalase genes to distinct and opposite circadian phases. *Mol Gen Genet.* **251**, 196-203.
- Zhong, H.H.; Painter, J.E.; Salomé, P.A.; Straume, M. und McClung, C.R. (1998). Imbibition, but not release from stratification, sets the circadian clock in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* **10**, 2005-2017.
- Zhong, H.H.; Resnick, A.S.; Straume, M. und McClung, C.R. (1997). Effects of synergistic signaling by phytochrome A and cryptochrome 1 on circadian clock-regulated catalase expression. *Plant Cell* **9**, 947-955.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Müller und Prof. Dr. K. Kloppstech für die Betreuung dieser Arbeit, ihr Interesse an deren Fortgang, für die freien Gestaltungsräume innerhalb des Projekts und für die vielen hilfreichen Kommentare sowie den unkomplizierten Dialog.

Allen Angehörigen des Instituts für Botanik, insbesondere der AG Kloppstech, möchte ich für das ausgesprochen nette und kollegiale Arbeitsklima danken. Margret Möller-Reinbold danke ich für ihre aufmerksame Hilfe bei allen Laborarbeiten und ihren von Zeit zu Zeit unverzichtbaren Einsatz bei der „Ernte“.

Ein ganz besonderer Dank geht an Astrid.