

**Analyse zur  
Genexpression während der frühen Photomorphogenese  
von *Arabidopsis thaliana*  
mittels cDNA-Array-Technik**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Fachbereich Biologie

von Urs Hähnel  
geboren am 17. Januar 1968 in Berlin

**urn:nbn:de:gbv:3-000006807**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006807>]

Gatersleben 2004

Gutachter:   1.     Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Klaus Humbeck, Halle/Saale  
              2.     Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Ulrich Wobus, Gatersleben  
              3.     Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Ralf Oelmüller, Jena

Datum der öffentlichen Verteidigung: 05. Mai 2004



Wit Barachs lesendem Klosterwächter \*Wolke & Schmitt: J. S. Lauer

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1. Photorezeptoren	1
1.1.1. UV-Lichtwahrnehmung	2
1.1.2. Blaulichtphotorezeptoren	3
1.1.3. Rotlichtphotorezeptoren	4
1.2. Komplexität der Lichtwahrnehmung	6
1.3. Mutanten der Lichtsignalketten	8
1.4. Lichtabhängige Genregulation	12
1.5. Strategien zur Expressionsanalyse	14
1.6. Zielstellung der Arbeit	16
<b>2. Material und Methoden</b>	17
2.1. Materialien	17
2.1.1. Pflanzenmaterial	17
2.1.2. Bakterien	18
2.1.3. Plasmide	18
2.1.4. Synthetische Oligonukleotide	19
2.1.5. Enzyme	20
2.1.6. Antibiotika	20
2.1.7. DNA-Marker	21
2.1.8. Reagenzien	21
2.1.9. Medien	21
2.1.9.1. Medien für die Bakterienanzucht	21
2.1.9.2. Medien für die Pflanzenanzucht	22
2.1.10. Allgemeine Puffer und Lösungen	22
2.1.11. Kits	22
2.1.12. Spezielle Materialien	23
2.1.13. Software	23
2.1.14. Geräte	23
2.2. Methoden	24
2.2.1. Pflanzenanzucht	24
2.2.2. Isolierung von Nukleinsäuren	26
2.2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	26
2.2.2.2. Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen	27
2.2.2.3. Isolierung von RNA aus Pflanzen	28
2.2.3. Polymerasekettenreaktion	28
2.2.4. Umsortierung von cDNA-Klonen	29
2.2.5. cDNA-Arrays	30
2.2.5.1. Amplifikation der cDNA-Fragmente	30

2.2.5.2. Herstellung der cDNA-Arrays . . . . .	32
2.2.5.3. Synthese von <sup>33</sup> P-markierten cDNA-Sonden . . . . .	33
2.2.5.4. Hybridisierung . . . . .	35
2.2.5.5. Auswertung und Normalisierung . . . . .	35
2.2.6. Überprüfung der verwendeten Mutanten. . . . .	37
<b>3. Ergebnisse</b> . . . . .	<b>38</b>
3.1. Verifizierung des verwendeten Pflanzenmaterials . . . . .	38
3.1.1. Phänotypische Charakterisierung . . . . .	39
3.1.2. Genotypische Charakterisierung . . . . .	41
3.2. Auswahl kernkodierter Gene potenziell plastidärer Proteine und zugehöriger cDNA-Klone . . . . .	43
3.3. Herstellung und Verwendungszweck verschiedener cDNA-Arrays . . . . .	46
3.4. Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Technik . . . . .	47
3.4.1. Unterscheidung von Signalintensitäten und Hintergrundwerten . . . . .	48
3.4.2. Doppelspot als interne Kontrolle . . . . .	49
3.4.3. Überstrahlungseffekte . . . . .	52
3.4.4. Reproduzierbarkeit . . . . .	53
3.4.5. Kreuzhybridisierung zwischen Mitgliedern einer Genfamilie . . . . .	55
3.4.6. Kriterien zur Auswertung der cDNA-Array-Experimente . . . . .	58
3.5. Genexpression während der frühen Photomorphogenese unter Weißlicht- bedingungen . . . . .	59
3.5.1. Gesamtvergleich der Weißlichtexperimente . . . . .	59
3.5.2. Auswahl von Genen mit Relevanz für Ereignisse der frühen Photo- morphogenese . . . . .	63
3.5.2.1. Differenziell exprimierte Gene in Abhängigkeit von der Belichtungszeit . . . . .	63
3.5.2.2. Differenziell exprimierte Gene der Mutanten . . . . .	66
3.5.2.3. Reduzierung des Datensatzes auf die Hauptkomponenten- analyse bestimmende Gene . . . . .	68
3.5.3. Gruppierung der differenziell exprimierten Gene . . . . .	69
3.5.4. Vergleich von Array- und Northern-Blot-Experimenten . . . . .	75
3.5.5. Untersuchung der ko-exprimierten Gene auf gemeinsame Promotorelemente . . . . .	77
3.5.6. Expressionsprofil von Genen mit G-Box und G-Box-ähnlichen Promotorelementen . . . . .	81
3.6. Experimente unter spezifischen Lichtbedingungen . . . . .	85
3.6.1. Unter spezifischen Lichtbedingungen ko-exprimierte Gene . . . . .	85
3.6.2. Untersuchung von ko-exprimierten Genen bei spezifischen Lichtbedingungen auf mögliche Promotorelemente . . . . .	88

3.7. Expressions- und Promotoranalyse der für Proteine des Photosynthese- apparates kodierenden Gene .....	89
<b>4. Diskussion</b>	94
4.1. Auswahl von nicht plastidären cDNA-Fragmenten .....	95
4.2. Kreuzhybridisierung .....	96
4.3. Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Technik .....	97
4.4. Kriterien für reproduzierbare und interpretierbare Daten .....	99
4.5. Hauptkomponentenanalyse .....	100
4.6. Gruppierung von ko-exprimierten Genen .....	101
4.7. Genexpression während der frühen Photomorphogenese .....	103
4.8. Promotorelemente .....	106
4.9. Unbekannter Lichtfaktor .....	111
4.10. Lichtwahrnehmung durch Photorezeptoren .....	116
<b>5. Zusammenfassung</b>	119
<b>6. Anhang</b>	122
6.1. Weißlicht-cDNA-Array-Experimente mit Phytochromchromophormutanten ...	122
6.2. Literaturverzeichnis .....	124
6.3. Protokolle für Biogrid9600 auf CD-ROM	
6.3.1. Sterilisation Arabidopsissamen: Protokoll1.txt	
6.3.2. Umsortierung cDNA-Fragmente: Protokoll2.txt	
6.4. Dateien zur Analyse der Genexpression auf CD-ROM	
6.4.1. Genliste.xls	
6.4.2. Ler-0_repro.xls	
6.4.3. Auswahl_Weißlicht.xls	
6.4.4. Motive_Groupen.xls	
6.4.5. G-Box.xls	
6.4.6. Lichtpuls.xls	

## **Danksagung**

## **Erklärung**

## **Lebenslauf**

**Abkürzungsverzeichnis**

aa	Aminosäuren
AMV-RT	Avian myeloblastosis virus-Reverse Transkriptase
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Ackerschmalwand
ATP	Adenosintriphosphat
B	<i>blue</i> , Licht blauer Wellenlängen
BAC	<i>bacterial artificial chromosomes</i>
BD-Puffer	Birnboim/Doly-Puffer
bHLH	<i>basic-helix-loop-helix</i>
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
cDNA	komplementäre DNA
Col-0	Arabidopsis Ökotyp Columbia
CRY	Cryptochrom
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
d	Tag
Da	Dalton
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	dedesoxy-Nukleotidtriphosphate
dT <sub>25</sub>	Oligodedesoxythymin (25 Thymin)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FADH	radikalisches Flavinadenindinukleotid
FR	<i>far-red</i> , Licht dunkelroter Wellenlängen
g	Gramm
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
l	Liter
Lea	<i>late embryogenesis abundant</i> , abundant in später Embryogenese
Ler-0	Arabidopsis Ökotyp Landsberg erecta
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
m	Meter
M	Mol
min	Minute
mol m <sup>-2</sup>	Mol pro Quadratmeter
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
myb	Onkogen, sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor aus AMV
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)

No-0	Arabidopsis Ökotyp Nossen
p-	Pulsbelichtung, Kurzzeitbelichtung
P <sub>R</sub>	Phytochrom in R-Form
P <sub>FR</sub>	Phytochrom in FR-Form
P <sub>total</sub>	gesamtes Phytochrom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PHY	Phytochrom
pmol µl <sup>-1</sup>	Picomol pro Microliter
PPF	Photosynthetischer Photonenfluss
PR-Motiv	Purin-reiches Motiv
PS	Photosystem
R	<i>red</i> , Licht roter Wellenlängen
RLD	Arabidopsis Ökotyp
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAase	Ribonuclease
RNAsin	Ribonucleaseinhibitor
RT	Reverse Transkription
SSC-Puffer	Natriumchlorid, Natriumcitrat-Lösung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
T <sub>a</sub>	<i>annealing temperature</i> , Annealingtemperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
tDNA	transfer-RNA
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
U	<i>unit</i> , Einheit
UV	ultraviolettes Licht
v	<i>volume</i> , Volumen
w	<i>weight</i> , Gewicht
WD	WD-Motiv (Tryptophan/Asparaginsäure Motiv)
Ws-2	Arabidopsis Ökotyp Wassilewskaja-2
β-ZIP	bZIP-Aminosäuresequenzmotiv

### Schreibweisen

<i>PHYA</i>	Phytochrom A Gen
PHYA	Phytochrom A Protein
<i>phyA</i>	Mutante mit Mutation im <i>PHYA</i> -Gen



## 1. Einleitung

Sonnenlicht dient photoautotrophen Lebewesen als universelle Energiequelle. Zu ihnen zählen alle photosynthetisch lebenden Prokaryoten und Eukaryoten. Nur sie vermögen die Energie des Sonnenlichts in chemische gebundene Energie durch die Photosynthese umzuwandeln. Die möglichst optimale Nutzung des Lichtes für die Photosynthese ist neben der Nährstoffversorgung eine der Lebensgrundlagen für diese Organismen. Für photoautotroph landlebende Pflanzen bedeutet ihre Ortsgebundenheit in der jeweiligen Generation ein Hindernis in der Erlangung optimaler Entwicklungsbedingungen. Licht hat in diesem Zusammenhang eine positive lebenspendende und -erhaltene Wirkung, kann aber auch insbesondere bei hohen Lichtintensitäten oder kurzen Wellenlängen schädigend wirken.

Im Laufe der Evolution erfolgte eine sowohl morphologische als auch metabolische Anpassung an die Umgebungsbedingungen, die sich in der Genregulation auf allen Ebenen der Expression (mRNA, Protein, Enzymaktivität) widerspiegelt. Für die Wahrnehmung der Umgebungsbedingungen sind neben der Photosynthese Detektionssysteme entstanden, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen und Intensitäten oder auch Produkte bzw. Nebenprodukte der Photosynthese als Signale erfassen und verarbeiten können.

### 1.1. Photorezeptoren

Bereits 1881 beschrieb Darwin ein Detektionssystem zur Lichtwahrnehmung. Er konnte zeigen, dass die phototropische Bewegung von Pflanzen bei Verwendung einer durch Kaliumdichromatlösung abgeschirmten Lichtquelle ausblieb. Kaliumdichromat absorbiert speziell die blauen Wellenlängen des sichtbaren Lichtes, folglich waren die Pflanzen für genau diesen Teil des Lichtes sensitiv. Die Wahrnehmung bestimmter Wellenlängen des Lichtes erfolgt durch Photorezeptoren und ist sehr spezifisch. Entsprechend ihrem Wahrnehmungsvermögen für bestimmte Wellenlängen wird zwischen Rotlicht-, Blaulichtphotorezeptoren und einem UV-B Photorezeptor unterschieden, die in Experimenten unter den spezifischen Lichtbedingungen nach einem vereinfachten Modell von Mohr komplex bezüglich der Reaktion der Pflanzen zusammenwirken (Abb. 1).

Photorezeptoren fungieren im Detektionssystem als eine Art Signalwandler, indem sie das Lichtsignal aufnehmen und auf eine Signalkette übertragen (Abb. 1). Zu den Photorezeptoren im roten Wellenlängenbereich zählen die Phytochrome, während zu jenen im blauen Cryptochrome und Phototropine gehören. Dabei überschneiden sich die Photorezeptoren im Wellen-

längenbereich bzw. Wirkungsspektren und auch in der induzierten Lichtantwort (u. a. Casal und Mazzella 1998). Phyto- und Cryptochrome sind die am häufigsten untersuchten Photorezeptoren (s.u.).

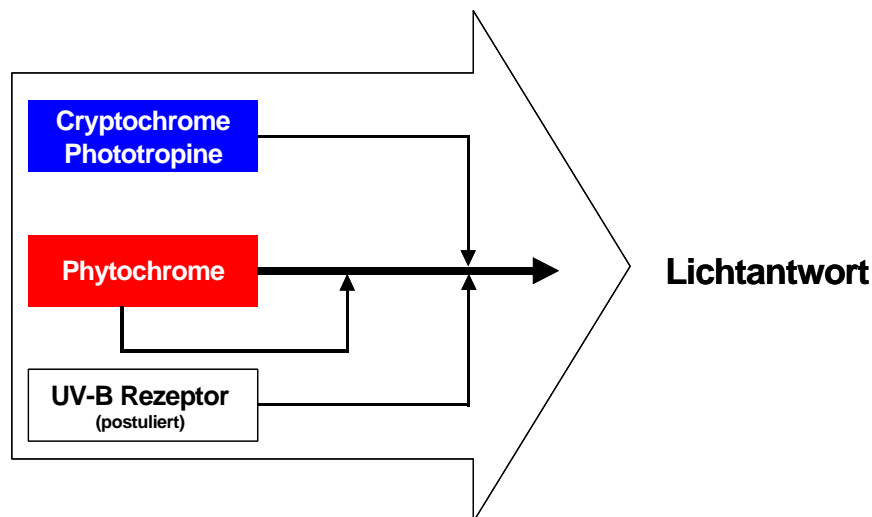


Abb. 1: Modell der Lichtwahrnehmung nach Mohr (in Kendrick und Kronenberg 1994).

### 1.1.1. UV-Lichtwahrnehmung

Ein UV-B Photorezeptor konnte bisher nur postuliert werden (Übersichtartikel Jordan 1996). So gelang u. a. Fuglevand *et al.* (1996) durch Expressionsstudien mit Chalconsynthase (*CHS*) nur der indirekte Nachweis seiner Existenz. Die Autoren zeigten in *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) neben der Stimulierung der Expression von *CHS* durch UV-A Licht auch eine separate Signalkette für die Induktion durch UV-B Licht. Doch sowohl UV-A- als auch Blaulicht ergeben synergistische Effekte auf die Transkription von *CHS*. Erschwerend wirkt bei den Untersuchungen, dass sowohl UV-B (280-320 nm) angeregte Phytochrome als auch UV-A (320-390 nm) angeregte Cryptochrome im UV-Wellenlängenbereich Wirkungsspektren besitzen und in bestimmten Wachstumsstadien diesen ersten Schritt in der Flavonoid-Biosynthese regulieren (Batschauer *et al.* 1991, Frohnmeyer *et al.* 1992, Jackson und Jenkins 1995, Kaiser *et al.* 1995, Batschauer *et al.* 1996, Kim *et al.* 1998).

Photolyasen sind ebenfalls lichtaktivierte Proteine, die Licht im UV-Wellenlängenbereich wahrnehmen. Ihre Funktion ist die Reparatur der DNA (Sancar 1994). Weitere Funktionen sind bisher nicht nachgewiesen.

### 1.1.2. Blaulichtphotorezeptoren

Als Blaulichtrezeptoren sind mit Phototropinen und Cryptochromen gegenwärtig zwei Gruppen von Genen bekannt. Phototropine wurden durch die Identifizierung eines defekten Genes in einer Arabidopsis Mutante entdeckt (*non-phototropic hypocotyl 1* (*nph1*), Liscum und Briggs 1995), in der jener schon von Darwin beschriebene Effekt ausblieb (s. o.). Weitere biochemische Studien zeigten eine direkte Beeinflussung des Phototropismus durch die blaulichtinduzierte Phosphorylierung des 120 kDa membranassoziierten NPH1 Proteins (Short und Briggs 1994, Liscum und Briggs 1995, Briggs und Huala 1999). Der C-terminale Teil des Proteins enthält typische Motive von Serin/Threonin-Kinasen (Hanks und Hunter 1995), während der N-terminale Teil zwei "Per-Arndt-Sim" (PAS) -ähnliche Motive aufweist (Taylor und Zhulin 1999). Letztere Motive dienen auch als interne Sensoren für Licht, Sauerstoff und Redoxpotential (*light oxygen voltage motif* (LOV); Huala *et al.* 1997) und vermitteln Protein-Protein Interaktionen mit spezifischen Kofaktoren (Taylor und Zhulin 1999). Christie *et al.* (1998) beschrieben die blaulichtabhängige Phosphorylierung von rekombinantem NPH1 in Insektenzellen sowie eine nichtkovalente Bindung von Flavinmononukleotid (FMN) als mögliches Chromophor. Sowohl nichtkovalente Bindung von FMN als auch blaulichtabhängige Autophosphorylierung wurde auch für NPL1 (*nph1-like 1*) nachgewiesen, einem zweiten Phototropin mit Sequenzhomologie zu NPH1. NPL1-Mutanten zeigten im Gegensatz zu *nph1* keine Veränderung der phototropischen Reaktion.

Analog zu den Phototropinen konnten Gene für eine zweite Gruppe von Blaulichtrezeptoren, den Cryptochromen, durch die Analyse einer Arabidopsis Mutante identifiziert werden (Koorneef *et al.* 1980, Ahmad und Cashmore 1993). Die Cryptochrome absorbieren im blauen (390-500 nm) und im ultravioletten (nur UV-A, 320-390 nm) Wellenlängenbereich des Lichtes (Lin *et al.* 1995, Malhotra *et al.* 1995). Sie sind wasserlösliche cytosolische Proteine von ca. 75 kDa (Ahmad und Cashmore 1993). Cryptochrome sind mit den Photolyasen verwandt (Ahmad 1999, Cashmore *et al.* 1999). Allerdings besitzen sie nicht mehr deren Fähigkeit zur DNA-Reparatur, wohl aber deren Affinität gegenüber Flavinadenin-dinukleotid (FAD) als Chromophor (Galland und Senger 1991, Ahmad und Cashmore 1993, Lin *et al.* 1995, Malhotra *et al.* 1995). Der N-terminale Teil der Cryptochrome bindet wie bei Photolyasen außerdem ein Pterin (5,10-Methenyltetrahydrofolat, MTHF) als ein zweites Chromophor (Malhotra *et al.* 1995). Dieses zweite Chromophor nutzt die Lichtenergie zur Reduktion des Flavins durch Übertragung eines Elektronenpaares. Im Unterschied zu Photolyasen erfolgt die Photoreduktion bei Cryptochrom (-1, CRY1) über ein relativ stabiles Zwischenprodukt des radikalischen Flavosemiquinons (FADH; Jorns *et al.* 1984, Johnson *et*

al. 1988, Eker *et al.* 1981, Lin *et al.* 1995, Malhotra *et al.* 1995). Der C-terminale Bereich der Cryptochrome ist in den homologen Photolyasen nicht vorhanden. Aus einer Homologie zum Tropomyosin - dem glatten Muskel von Ratten (30% bzw. 45% über 86 aa) - jedoch ohne dessen charakteristische  $\alpha$ -Helix, ist eine Funktion für den C-Terminus schwerlich abzuleiten (Ahmad und Cashmore 1993). In Fusion mit  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) vermitteln die C-Termini eine kontinuierliche Lichtreaktion in etiolierten Keimlingen (Yang *et al.* 2000), die zu einem konstitutivem photomorphogenetischen Phänotyp (*constitutive photomorphogenic* (COP)) führt. Diesen Zusammenhang konnten Wang *et al.* (2001) kürzlich durch den Nachweis einer direkten Interaktion der C-Termini der Cryptochrome mit dem lichtabhängigen Repressor COP1 (s. u.) bestätigen.

### 1.1.3. Rotlichtphotorezeptoren

Eine dritte Gruppe von Photorezeptoren umfasst die Phytochrome, die Licht im roten Wellenlängenbereich absorbieren und im blauen bzw. im UV-B Wellenlängenbereich weitere Absorptionsmaxima besitzen (Grimm und Rüdiger 1986). Phytochrome sind lösliche Proteine von ca. 125 kDa, deren Isolierung in intakter Form erstmals Vierstra und Quail 1983 gelang. Die Phytochromproteine bestehen aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne. Die N-terminale Domäne bindet das Chromophor und ist somit für die Lichtwahrnehmung verantwortlich (Photokonversion; Lagarias und Rapoport 1980, Cherry *et al.* 1992, Stockhaus *et al.* 1992, Edgerton und Jones 1992, 1993, Cherry *et al.* 1993, Boylan *et al.* 1994, Jordan 1996, Jordan *et al.* 1997, Song 1999, Wu und Lagarias 2000). Als Chromophor wird ein offenkettiges Tetrapyrrol (Lagarias und Rapoport 1980) in einer autokatalytischen Reaktion (Terry 1997) kovalent als Thioether an ein Cystein gebunden. Die lichtinduzierte Umwandlung der  $P_R$ -Form in die  $P_{FR}$ -Form (s.u.) erfolgt durch die "Z" zu "E" Isomerisierung der C15-Doppelbindung zwischen dem C- und dem D-Ring des Tetrapyrrols (Andel *et al.* 1996). Anschließend Konformationsänderungen des Proteins sind erforderlich für die Erhaltung des Energiezustandes der Photorezeptoren (Song 1999). Die C-terminale Domäne enthält zwei PAS-ähnliche Motive und ein Kinase-ähnliches Motiv. Sie vermitteln eventuell Protein-Protein-Interaktionen oder Kofaktorbindung und sind wahrscheinlich für die Dimerbildung notwendig. Phytochrome besitzen Homologie zu bakteriellen Zwei-Komponenten-Sensoren - den Histidinkinasen (Schneider-Poetsch 1992, Lagarias *et al.* 1995, Kehoe und Grossman 1996, Bhoo *et al.* 2001). Anstelle von Histidin/Asparaginsäure werden in höheren Pflanzen Serin/Threonin als Phosphorylierungsstellen von Kinasen verwendet (Yeh und Lagarias 1998).

Ursprünglich wurden Phytochrome in Pflanzen als Lichtrezeptoren für den roten Spektralbereich entdeckt (Parker *et al.* 1949, Borthwick *et al.* 1952). In nachfolgenden Arbeiten konnte die Existenz von zwei ineinander photokonvertierbaren isomeren Formen - der inaktiven  $P_R$ -Form und der aktiven  $P_{FR}$ -Form gezeigt werden und führte zu den inzwischen klassisch zu nennenden Reversionsexperimenten (siehe Pkt. 1.2.; Borthwick *et al.* 1952, Butler *et al.* 1959, Mohr 1972, Smith 1975, Hunt und Pratt 1981). Die  $P_R$ -Form besitzt ein Absorptionsmaximum bei 660 nm und wird bei Bestrahlung mit Licht dieser Wellenlänge ("red" (R)) in die  $P_{FR}$ -Form umgewandelt (Vierstra und Quail 1983, Furuya und Song 1994). Diese kann entweder durch eine langsame Dunkelreaktion (Briggs und Rice 1972, Mancinelli 1994) oder durch Bestrahlung mit längerwelligem Rotlicht ("far-red" (FR),  $\lambda = 730$  nm) in die  $P_R$ -Form zurückgeführt werden (Abb. 2). Die  $P_{FR}$ -Form wird als die signalgebende Komponente angesehen (zur Übersicht siehe Fankhauser 2001). Neuere Experimente lassen auch eine Funktion der  $P_R$ -Form vermuten (Liscum und Hangarter 1993, Reed *et al.* 1994, Shinomura *et al.* 1994, 2000). Einhergehend mit der Rot-/Dunkelrotlichtbestrahlung erfolgt jeweils eine Translokation des Proteins vom Cytosol in den Zellkern bzw. *vis versa* (Kircher *et al.* 1999, Yamaguchi *et al.* 1999, Nagy und Schäfer 2000).

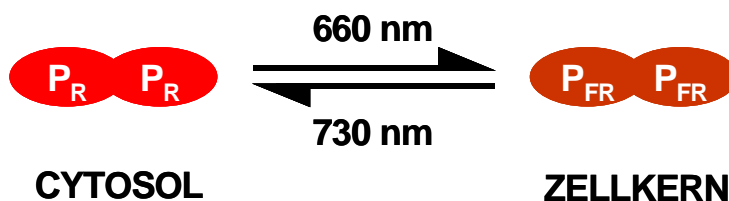


Abb. 2: Vereinfachtes Modell zur revertierbaren Photokonversion von Phytochrommolekülen. Mit dem Formwechsel erfolgt ein Ortswechsel in der Zelle.

Licht führt auch zum Abbau von Phytochromen. Entsprechend werden die Phytochrome in photolabil bzw. Typ1 und photostabil bzw. Typ2 eingeteilt. Als photolabil ist das in etiolierten Keimlingen abundante Phytochrom A (PHYA) zu nennen. Typ 2 oder photostabiles Phytochrom ist vornehmlich in grünen Keimlingen bzw. Gewebe zu finden. Zu diesem Typ gehört z. B. Phytochrom B (PHYB).

Die zugehörigen Gene der blauen und roten Photorezeptoren wurden Anfang der 90er Jahre identifiziert. Sie sind im gesamten Pflanzenreich zu finden und wurden aus Moosen (Thümmeler *et al.* 1990), grünen Algen (Kidd und Lagarias 1990), Farnen (Kanegae und Wada 1998) und höher entwickelten Pflanzen (Sharrock und Quail 1989, Clack *et al.* 1994) isoliert. Die Anzahl differiert in den einzelnen Pflanzenarten. Über Sequenzvergleiche konnten auch in der Tierwelt, sowie in einzelligen Eu- als auch Prokaryoten homologe Gene identifiziert werden (Small *et al.* 1995, Hughes *et al.* 1997, Yeh *et al.* 1997, Emery *et al.* 1998, Davis *et*

al. 1999, van der Horst *et al.* 1999, Jiang *et al.* 1999, Bhoo *et al.* 2001, Giraud *et al.* 2002). In *Arabidopsis* wurden fünf Phytochromgene (*PHYA - E*, Abb. 3; Sharrock und Quail 1989, Clack *et al.* 1994) identifiziert. Die einzelnen Mitglieder dieser kleinen Genfamilie sind zu 50-80 % identisch (Clack *et al.* 1994). Phylogenetisch sind jeweils *PHYA* und *PHYC* sowie *PHYB*, *PHYD* und *PHYE* näher miteinander verwandt (Mathews und Sharrock 1997), obwohl lediglich *PHYA* zu den photolabilen und *PHYB - E* zu den photostabilen Phytochromen zu zählen sind. Cryptochromgene sind dagegen nur *CRY1* und *CRY2* in *Arabidopsis* bekannt (Ahmad und Cashmore 1993, Guo *et al.* 1998).

## 1.2. Komplexität der Lichtwahrnehmung

Licht wird von Pflanzen nicht nur in Form von Wellenlängen wahrgenommen, sondern auch in Richtung (Darwins Experiment s. o.), Dauer und Intensität. Letztere beiden Eigenschaften sind insbesondere für Phytochrome untersucht und für die Regulation der Entwicklung in einer Reihe physiologischer unterscheidbarer Funktionen manifestiert. Die Reaktionen der Pflanzen können in Signalantworten auf hohe (*high irradiance response*, HIR), geringe (*low fluence response*, LFR) und sehr geringe Lichtintensitäten (*very low fluence response*, VLFR) unterschieden werden (Mancinelli 1994). Charakteristisch für die Signalantwort ist das Verhältnis von aktivierten Phytochrom zum gesamt-verfügbaren Phytochrom ( $P_{FR}/P_{TOTAL}$ ).

Der VLFR ist durch sehr wenig aktives Phytochrom ( $P_{FR}/P_{TOTAL} = 10^{-6}$  bis  $10^{-3}$ ) gekennzeichnet.

ein. Die biologischen Phänomene im VLFR wie Keimung bzw. Ergrünung sind nur an Samen oder etiolierten Keimlingen zu beobachten. Bei völliger Dunkelheit mit anschließender geringer Belichtung liegen fast alle Phytochrome in der  $P_R$ -Form vor (Mandoli und Briggs 1981, Mancinelli 1994). Die Effekte sind nicht revertierbar. Kontinuierliche Bestrahlung mit Licht nahe den Infrarotwellenlängen führt ebenfalls zu einem VLFR (Schäfer *et al.* 1982).

Der LFR ist bei mittleren Beleuchtungsstärken von  $10^{-6}$  bis  $10^{-3}$  mol m<sup>-2</sup> durch ein Verhältnis  $P_{FR}/P_{TOTAL} = 10^{-2}$  bis 0,87 gekennzeichnet (Mancinelli 1994). Charakteristisch für den LFR ist die klassische Rot/Dunkelrotlicht Reversion, d.h. einem kurzem induzierendem Rotlichtpuls folgt ein revertierender Dunkelrotlichtpuls (R/FR). Die Reversion kann u. a. bei Keimung und Ergrünung beobachtet werden.

Der HIR ist nur bei kontinuierlicher Belichtung mit hoher Beleuchtungsstärke ( $>10^{-3}$  mol m<sup>-2</sup>) zu beobachten. Analog zum VLFR ist der HIR nicht revertierbar (Mancinelli 1994). Der Effekt ist abhängig von der Wellenlänge, Bestrahlung und Dauer der Lichtbehandlung. Dieser

verursacht in etiolierten Keimlingen bei FR-HIR Behandlung eine Inhibierung der Hypokotylverlängerung. Die Abhängigkeit von der Wellenlänge zeigt sich in der Ergrünung der Pflanzen nach 2 - 3 Tagen kontinuierlicher Belichtung in R bzw. FR und einem anschließenden Wechsel zu Weißlicht. Aus diesem Grund wird zwischen R- und FR-HIR unterschieden (Hartmann 1966, Heim und Schäfer 1984, McCormac *et al.* 1992, Goto *et al.* 1993). Anstelle der kontinuierlichen Belichtung sind auch wiederholte Kurzzeitbelichtungen (Lichtpulse) in R bzw. FR möglich, um ein HIR zu erzeugen. Die Zeitabstände der Lichtpulse im FR müssen bedeutend kürzer als im R sein (Mancinelli 1994).

Unter natürlichen Bedingungen treten die Effekte meist gleichzeitig und in Zusammenwirkung mit anderen Photorezeptoren komplex auf. Die unterschiedliche Ort-Zeitverteilung der Phytochrome einhergehend mit dem Konformationswechsel (siehe Abb. 2) bestimmt wesentliche Entwicklungsprozesse wie Keimung, Ergrünung und Inhibierung des Hypokotylwachstums der Pflanzen. PHYA gilt als verantwortlich für die Keimung (Reed 1994, Shinomura *et al.* 1994, 1996, Botto *et al.* 1996, Whitelam und Devlin 1997). Mazella *et al.* (1997) gehen von einer Zwei-Phasen-Reaktion für die Keimung aus. In der ersten Phase erfolgt die Initiation durch das lichtlabile PHYA in einem breiten Spektrum im VLFR. Das Verhältnis von lichtaktivierten Phytochrom ( $P_{FR}$ ) zum gesamt messbaren Phytochrom ( $P_{total}$ ) beträgt weniger als 0,1%. Die zweite Phase der Keimung ist durch ein Verhältnis  $P_{FR}/P_{total} = 1$  charakterisiert, wobei diese durch die lichtstabilen Phytochrome im LFR insbesondere PHYB bestimmt werden. Entsprechend stimuliert Rotlicht die Keimung und Dunkelrotlicht wirkt revertierend. Mit PHYE erwies sich erst kürzlich ein weiteres Phytochrom als essentiell für die Keimung (Hennig *et al.* 2002). In den Experimenten konnte die Abhängigkeit der Keimung von PHYE im LFR durch die Revertierbarkeit als auch im FR-HIR durch ausbleibende Keimung nachgewiesen werden.

Ein weiteres Beispiel für das komplexe Zusammenspiel der Phytochrome bzw. der Photorezeptoren ist der Prozess der Ergrünung in engem Zusammenhang mit der Inhibierung der Hypokotylverlängerung, des Öffnens des Hypokotylhakens und der Keimblättentfaltung. PHYA vermittelt die Detektion im FR-HIR, indem die Ergrünung der entsprechenden Mutante ausbleibt (Dehesh *et al.* 1993, Nagatani *et al.* 1993, Reed *et al.* 1993, Whitelam *et al.* 1993, Barnes *et al.* 1996a, Yanovsky *et al.* 1997, Chun *et al.* 2001), während PHYB in Weiß- und Rotlicht (LFR) durch Inhibierung der Hypokotylverlängerung agiert (Casal 1995). Letzterer Prozess wird durch weitere Phytochrome (A und D) und Cryptochrom (CRY1) beeinflusst (Neff und van Volkenburgh 1994, Chory *et al.* 1996, Folta und Spalding 2001). PHYB moduliert auch die Keimblättentfaltung in Abhängigkeit von CRY1 (Neff und Chory 1998).

Weitere biologische Phänomene wie Blühzeitpunkt (Weller *et al.* 2001), Schattenvermeidung (Bagnall *et al.* 1995, Casal 1996) und circadianer Rhythmus (Devlin und Kay 2000, Toth *et al.* 2001) werden ebenfalls von den Photorezeptoren gesteuert. Dabei agieren die Photorezeptoren nicht immer parallel oder additiv sondern ebenso antagonistisch (siehe Übersichtsartikel Nagy und Schäfer 2002).

### 1.3. Mutanten der Lichtsignalketten

Arabidopsis hat sich im Laufe der letzten Jahrzehnte durch ihre Eigenschaften als Modellpflanze für die Forschung entwickelt. Sie zeichnet sich insbesondere durch eine kurze Generationszeit und einer hohen Samenausbeute aus, ist selbstbefruchtend und transformierbar, von kleinem Wuchs und besitzt mit 125 Mbp das kleinste bekannte Genom höherer Pflanzen. Sie diente in der vorliegenden Arbeit als Objekt der Experimente, sodass sich die Ausführungen in diesem Abschnitt auf diese Pflanze beziehen. Die genomische Sequenz ist seit 2000 fast vollständig bekannt und somit sind alle Gene theoretisch verfügbar (The Arabidopsis Genome Initiative 2000).

Die zuvor beschriebenen Experimente als auch die Identifizierung der Photorezeptorgene wäre ohne die Isolierung der entsprechenden Mutanten unter bestimmten Lichtbedingungen und der Ausprägung der unterschiedlichen Phänotypen nicht denkbar (Abb. 3; Koornneef *et al.* 1980, Ahmad und Cashmore 1993, Guo *et al.* 1998). Für die Phytochrommutanten wurden bereits einige Phänomene beschrieben (siehe Pkt. 1.2). So kann die *PHYA*<sup>-</sup>-Mutante unter Dunkelrotlichtbedingungen nicht ergrünen, während gleiches für die *PHYB*<sup>-</sup>-Mutante unter Rotlichtbedingungen gilt. Im Unterschied zu *phyA* erfolgt in *phyB* die Öffnung des Hypokotylhakens und der Keimblätter. Unter "normalen" Lichtbedingungen gleichen beide Phytochrommutanten dem Wildtyp. Für diese beiden Phytochrome (A und B) existieren auch eine Reihe von Allelen (siehe Übersichtartikel: Fankhauser und Chory 1997, Hudson 2000). Für die Phytochrome D und E wurde bisher nur jeweils eine Mutante und für Phytochrom C noch keine isoliert. Als *PHYD*<sup>-</sup>-Mutante mit einer 14 bp Deletion für das Gen erwies sich mit Ws-2 ein Wildtyp als Null-Mutante (Aukerman *et al.* 1997). Aus dem natürlichen Vorkommen als Wildtyp wird geschlußfolgert, dass *PHYD* unter normalen Bedingungen nicht essentiell ist. Möglicherweise kann *PHYB* bei einer Sequenzidentität von 80 % zu *PHYD* dessen Funktion übernehmen (Aukerman *et al.* 1997). Eine Mutante für *PHYE* konnte nur über die Identifizierung einer Tripelmutante (*phyABE*) isoliert werden (Devlin *et al.* 1998). Die einfache Mutante *phyE*, über Rückkreuzungen erzeugt, zeigt unter Normalbedingungen keine phäno-



typischen Veränderungen gegenüber den Wildtypen.

Analog zu den Phytochrommutanten *phyA* und *phyB* zeigt die Blaulichtrezeptormutante *cry1* bei bestimmten Lichtbedingungen eine veränderte Reaktion auf die Inhibierung der Hypokotylverlängerung (Koornneef *et al.* 1980, Ahmad und Cashmore 1993). CRY1 fungiert als Blaulichtrezeptor vornehmlich bei hohen Lichtintensitäten, wohingegen das zweite Cryptochromgen aufgrund einer schnellen Degradation bei niedrigen Lichtintensitäten agiert (Lin *et al.* 1998, Guo *et al.* 1999). Die Mutante *cry2 (pha-1)* zeigt eine spätblühenden Phänotyp und somit eine Funktion in der Messung der Photoperiode (Guo *et al.* 1998).

Neben der Isolierung von Photorezeptormutanten gelang Koornneef *et al.* (1980) auch die Isolierung von zwei Chromophormutanten, die sowohl unter Rot- als auch Dunkelrotlichtbedingungen keine Ergrünung zeigten. Die Mutanten *hyl* und *hy2 (elongated hypocotyl)* sind in der Chromophor-Biosynthese blockiert und verhindern somit die Lichtwahrnehmung durch die Phytochrome (Parks und Quail 1991). Die defekten Gene konnten erst kürzlich als Hämoxygenase für *HY1* (Muramoto *et al.* 1999) und Phytochromobillinsynthase für *HY2* bestimmt werden (Kohchi *et al.* 2001).

Trotz der Erkenntnisse über Struktur und Mechanismus der Photorezeptoren im Zusammenhang mit der Lichtdetektion der Pflanzen ist die Funktionsweise der Detektionssysteme, die Signalweitergabe und -verarbeitung noch nicht geklärt. In den letzten Jahren wurden zunehmend Mutanten isoliert, deren defektes Gen in der Signalkaskade einem Photorezeptor nachgeordnet agiert. Die Zuordnung erfolgte aufgrund der Sensitivität gegenüber bestimmten Wellenlängen bzw. der beobachteten Lichtantwort der Mutanten. In Abb. 3 wurde das Modell von Mohr (Abb. 1; Mohr 1994) um die Photorezeptoren und deren möglichen nachgeordneten Mitgliedern der Signalkette erweitert.

Mutanten mit reduzierter Sensitivität bei Dunkelrotlicht wurden als *PHYA* bzw. bei Rotlicht als *PHYB* abhängig betrachtet. Mit der reduzierten Sensitivität im FR-HIR fand Whitelam *et al.* (1993) die Mutanten *fhy1* und *fhy3 (far-red elongated hypocotyl)*. Im Unterschied zu *fhy3* ist in *fhy1* die Ergrünung auch im VLFR verändert. Eine zu *fhy3* ähnliche Mutante konnte mit *fin2 (far-red insensitive)* isoliert werden, die im Unterschied zu *fhy3* auch einen veränderten Rotlichtphänotyp aufweist (Soh *et al.* 1998). Als *pat3 (phytochrome A signal transduction)* wurde eine weitere Mutante mit den zuvor beschriebenen Eigenschaften im FR isoliert, die ein Allel von *fhy1* darstellt. Das mutierte Gen *FHY1* entspricht einem lichtregulierten Protein, dass in Dunkelheit akkumuliert wird (Desnos *et al.* 2001, Zeidler *et al.* 2001). Ebenfalls durch Sensitivität im FR wurde *pat1* isoliert und das defekte Gen über die T-DNA-Insertion bestimmt. Interessanterweise ist das Protein wahrscheinlich im Cytoplasma lokalisiert und somit möglicherweise eine Komponente der sehr frühen Signaltransduktion von *PHYA*

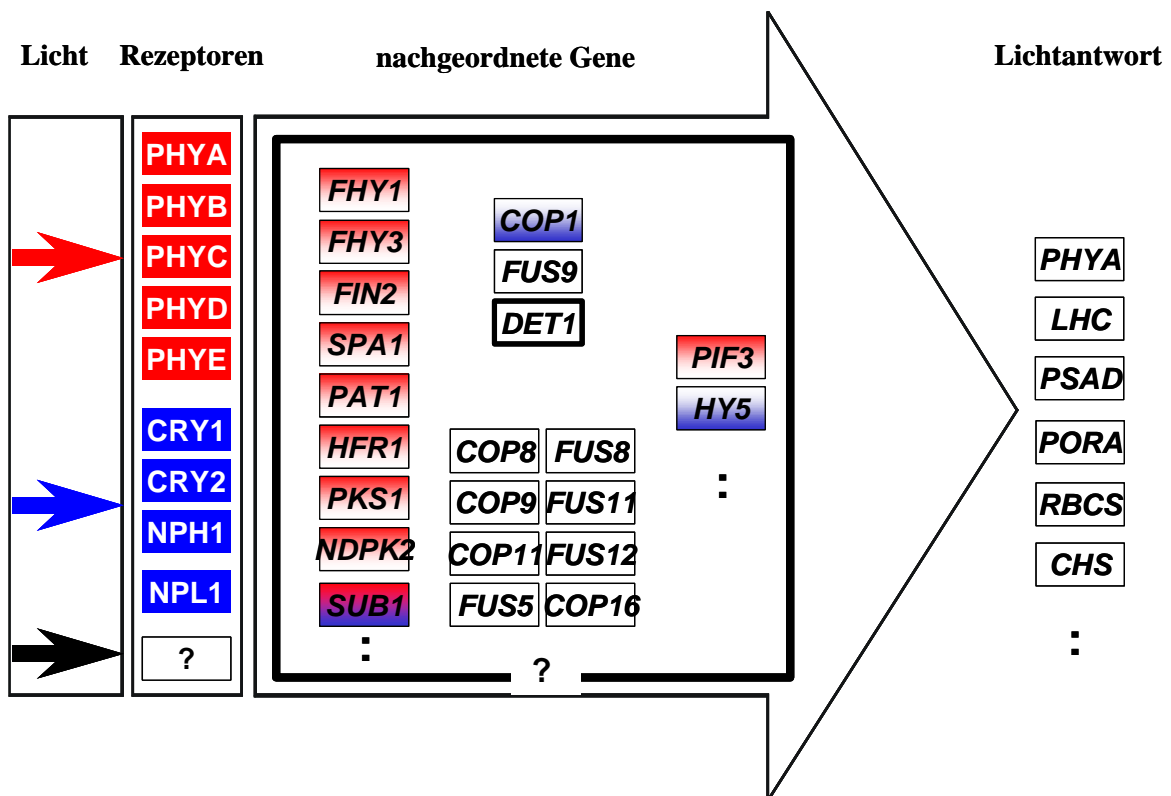


Abb. 3: Erweiterung des Modells von Schopfer und Mohr (vgl. Abb. 1) mit Photorezeptoren und ihren in der Signalkette nachgeordneten Genen. Farblich markierte nachgeordnete Gene entsprechen der möglichen Interaktion mit den jeweiligen Photorezeptoren.

(Bolle *et al.* 2000). Mit *FAR1* konnte ein weiteres Mitglied der PHYA-Signalkette über die Isolation einer Mutante (*far1*, *far-red impaired response*) identifiziert werden. Das kernlokalisierte Gen besitzt keines der bisher bekannten funktionellen Motive (Hudson *et al.* 1999). Einen veränderten Phänotyp speziell unter FR Bedingungen zeigten auch weitere Mutanten wie *fin219* (Hsieh *et al.* 2000), *laf1* (*long after far-red*, Ballesteros *et al.* 2001), *laf6* (Möller *et al.* 2001) und *hfr1/rep1/rsf1* (*long hypocotyl in far-red*, Fairchild *et al.* 2000; *reduced phytochrome signaling*, Soh *et al.* 2000; *reduced sensitivity to far-red light*, Spiegelman *et al.* 2000). *HFR1/REP1/RSF1* sind Allele eines Genes, das einen *basic-helix-loop-helix* Transkriptionsfaktor kodiert, während *LAF1* zur Genfamilie der MYB-Transkriptionsfaktoren gehört. Im Gegensatz zu den bisher isolierten Mutanten der PHYA Signalkette zeichnen sich *spa1* (*suppressor of phyA-105*, Hoecker *et al.* 1998) und *eid1* (empfindlicher im dunkelroten Licht, Buche *et al.* 2000) durch ihre Hypersensitivität gegenüber R und FR aus. Das Gen *SPA1* wurde von Hoecker *et al.* (1999) identifiziert und besitzt neben der Homologie zu Kinasen noch ein WD-Motiv (*WD-repeat motif*), eine typische Struktur für Signalproteine. Auch *EID1* konnte genetisch als ein neues F-Box Protein mit einer *Leucinezipper*-Struktur isoliert werden (Dieterle *et al.* 2001). Mit *pef1* (*phytochrome-signaling early flowering*,

Ahmad und Cashmore 1996) und *psi2* (*phytochrome signaling*, Genoud *et al.* 1998) wurden zwei weitere Mutanten entdeckt, die ebenfalls phänotypische Veränderungen in R und FR aufwiesen. Beiden ist auch gemeinsam, dass sie in ihrer Lichtantwort mehreren Phytochromen zugeordnet werden könnten.

Mutanten mit Sensitivität in R und der daraus resultierenden Abhängigkeit von PHYB sind rar. Das könnte auf kurze Signalketten oder deren essentielle Notwendigkeit hindeuten. Mit *pef2*, *pef3* (Ahmad und Cashmore 1996) und *red1* (*red-light specific extragenic revertants*, Wagner *et al.* 1997) konnten lediglich 3 Mutanten mit ausbleibender Ergrünung unter Rotlichtbedingungen isoliert werden. Die jeweiligen Mutationen sind noch nicht bekannt. Nach der Isolation von 3 weiteren Mutanten und der Bestimmung der Gendefekte gelang für diese Gene ein direkter Nachweis der Interaktion mit dem Photorezeptor im "Two Hybrid Screen". Demnach interagieren die Proteine ELF3 (*early flowering*, Hicks *et al.* 1996, Zagotta *et al.* 1996, Liu *et al.* 2001), ARR4 (*Arabidopsis response regulator*, Sweere *et al.* 2001) und PIF4 (*phytochrome interacting factor*, Huq und Quail 2002) spezifisch mit dem C-Terminus von PHYB. Ebenso konnte die Interaktion der C-Termini von Phytochrom A und B mit PIF3 (Ni *et al.* 1998, Zhu *et al.* 2000, *poc1: photocurrent1*, Halliday *et al.* 1999), PKS1 (*phytochrome kinase substrat*, Fankhauser *et al.* 1999) und NDPK2 (*nucleoside diphosphate kinase 2*, Choi *et al.* 1999) gezeigt werden. Auch für den C-Terminus von CRY2 gelang der Nachweis zur Bindung an COP1 (s.u., Wang *et al.* 2001), während selbige Bindung für CRY1 aufgrund der Experimente nur vermutet werden kann. Allerdings zeigten beide konstitutiv exprimierten C-Termini denselben für COP-Mutanten typischen Phänotyp (Yang *et al.* 2000).

Mit *sub1* (*short under blue light*) gelang die Isolation einer Mutante, die hypersensitiv auf Blaulicht als auch Dunkelrotlicht reagiert und folglich eine Komponente eines Cryptochrom- bzw. Phytochromsignalweges darstellt. SUB1 kodiert ein Ca<sup>2+</sup>-Bindeprotein, das die lichtabhängige Akkumulation des Transkriptionsfaktors HY5 unterdrückt (Guo *et al.* 2001).

Die Mutante *hy5* entstammt ebenfalls einer Reihe Mutanten von Koornneef *et al.* (1980). Das mutierte Gen konnte durch Oyama *et al.* (1997) einem  $\beta$ -ZIP Transkriptionsfaktor zugeordnet werden. Als positiver Regulator unterdrückt HY5 DET1 und wird selbst durch die COP1 reprimiert (s.u.; Deng *et al.* 1992, Pepper und Chory 1997, Oyama *et al.* 1997). Ang *et al.* (1998) konnten eine direkte Interaktion zwischen HY5 und COP1 zeigen, während Chattopadhyay *et al.* (1998) für HY5 die Bindung an die G-Box nachwies.

Während alle bisher genannten Mutanten ihren Phänotyp nur unter Lichteinfluss ausbilden, so fallen *cop1* und *det1* (*de-etiolated*) in eine Gruppe von Mutanten, die ihren Phänotyp schon als etiolierte Keimlinge zeigen. Diese Gruppe der *cop/det/fus* (*fusca*) Mutanten umfasst 11 Gene (Abb. 3), die zu den negativen Regulatoren in der Photomorphogenese zählen (Müller

und Heidecker 1968, Chory *et al.* 1989, Deng *et al.* 1991, Jürgens *et al.* 1991, Misera *et al.* 1994). Mit geöffneten Keimblättern, unterdrückter Hypokotylverlängerung und Anthocyanakkumulation weisen sie in Dunkelheit den Phänotyp lichtgewachsener Keimlinge auf. Neben den morphologischen konnten auch zelluläre Veränderungen wie Differenzierung von Chloroplasten und Expression von lichtinduzierten Genen nachgewiesen werden. Das Vorhandensein des COP9-Signalosomes dient einer weiteren Untergliederung dieser Gruppe negativer Regulatoren (Abb. 3; Chamovitz *et al.* 1996, Karniol *et al.* 1999, Serino *et al.* 1999, Deng *et al.* 2000). Interessanterweise bilden mit *cop1*, *cop10* und *det1* gerade jene Mutanten kein COP9-Signalosom aus, deren Nullmutanten unter Normalbedingungen nicht lebensfähig sind. Folglich stehen mit *cop1*, *cop10* und *det1* nur weniger ausgeprägte Allele der Mutanten zur Verfügung (Chory *et al.* 1989, Kwok *et al.* 1996, Vogel *et al.* 1998). *COP1* und *DET1* wurden bereits genetisch identifiziert (Deng *et al.* 1992, Pepper *et al.* 1994). Für *COP1* konnten diverse Interaktionen mit anderen Proteinen wie HY5 (s. o.; Ang *et al.* 1998), SPA1 (s. o., Hoecker und Quail 2001) und dem Blaulichtrezeptor CRY2 (s. o.; Wang *et al.* 2001) gezeigt werden. Mit CIP1 (*COP1 interacting partner*), CIP4, CIP7 und CIP8 interagieren weitere Proteine mit *COP1* (Matsui *et al.* 1995, Yamamoto *et al.* 1998, 2001, Torii *et al.* 1999). Möglicherweise ist *COP1*, *COP10* und das COP9 Signalosom Bestandteil eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, welches interagierende Proteine wie HY5 für deren Abbau markiert (Hardtke und Deng 2000, Osterlund *et al.* 2000). *COP10* wird in diesem Zusammenhang eine mögliche Funktion als E2-Ligase aufgrund der Sequenzidentität zu ähnlichen Proteinen zugeschrieben (Suzuki *et al.* 2002). Im Gegensatz zu *COP1* ist *DET1* lichtunabhängig im Zellkern lokalisiert (von Arnim und Deng 1994, Pepper *et al.* 1994). Eine biochemische Funktion konnte für *DET1* bisher nicht gezeigt werden.

#### **1.4. Lichtabhängige Genregulation**

Mit der genetischen Identifizierung der Photorezeptoren und ihren teilweise gezeigten Interaktionen mit nachfolgenden Komponenten der Lichtsignalkette (siehe Abb. 3) ist die Art und Weise der Signalaufnahme und -weitergabe sowie die Wirkung auf unterschiedliche Prozesse und den daraus resultierenden bzw. zu beobachtenden Phänomenen nicht geklärt.

In Ermangelung einer größeren Anzahl klonierter Gene, wurde früher versucht, die Wirkung der Photorezeptoren auf Stoffwechselwege über die Genregulation auf mRNA-Ebene ausgewählter Schlüsselgene zu bestimmen. Mit Blick auf die lichtabhängige Regulation der Gene durch die Photorezeptoren betraf dies Gene der photosynthetischen Komplexe (z.B.

*LHC*-Gene, *PSAD*, Abb. 3: Lichtantwort) bzw. deren Promotoren, sowie mit *CHS* einem Gen der Pigmentbildung (Anthocyanbiosynthese) und mit Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (*RBCS*) ein stromales Protein des Calvin-Zyklus. Die lichtinduzierte Expression von Genen des Lichtsammelkomplexes (*LHC*: *light harvesting complex* vormals *CAB*: *chlorophyll a/b binding protein*) und des *CHS*-Genes waren die häufigsten Untersuchungen, die allerdings hauptsächlich an Wildtypen durchgeführt wurden.

Im folgenden werden einige Gene des Photosyntheseapparates und deren Expression näher betrachtet. Bei den *LHC*-Genen handelt es sich um Chlorophyll-a/b-bindende Proteine einer Multigenfamilie (Leutwiler *et al.* 1986, Jansson 1999), dem häufigsten Protein der Thylakoidmembran. Es bildet den *LHC-II* Komplex im Photosystem II und dient zum Sammeln des Lichtes durch Aufnahme der Anregungsenergie und Weiterleitung zu den Reaktionszentren. Ferredoxin-NADP-Reduktase (*FNR*, *PETH*) wurde früher Photosystem I zugeordnet, ist jedoch relativ leicht dissoziierbar an die Thylakoidmembran im Stroma angelagert. Dem Protein obliegt die Funktion, im Komplex mit Ferredoxin Elektronen auf  $\text{NADP}^+$  zu *NADPH* zu übertragen. Der *ATPase* Komplex als Teil des Photosyntheseapparates besteht ebenfalls aus mehreren Untereinheiten. Die gamma-Untereinheit (*ATP $\gamma$* ) kontrolliert den Protonenfluss durch den Komplex und ist neben der delta- und epsilon-Einheit singulär im Komplex vertreten. Außerdem ist *ATP $\gamma$*  am Regulationsmechanismus zur Aktivierung der *ATP*-Synthese über Ferredoxin/Thioredoxin beteiligt. Rieske (*PETC*) ist ein kernkodiertes Protein des Cytochrom-b<sub>6</sub>/f-Komplexes mit einem Eisen-Schwefel-Zentrum. Dessen Lage wird durch die Cysteinbausteine des Proteins bestimmt. *PETC* oxidiert Quinol zu Plastosemiquinon und überträgt ein Elektron auf Plastocyanin (Malkin und Niyogi 2000). Die Expression dieser Gene des Photosyntheseapparates nimmt unter Lichteinfluss zu (Tobin und Silverthorne 1985).

Protochlorophyllidoxydoreduktase (*POR*) ist ein Enzym im Chlorophyllsyntheseweg und reduziert Protochlorophyllid zu Chlorophyllid. Diese Reaktion ist in Angiospermen strikt lichtabhängig, wohingegen in Gymnospermen, Algen und photosynthetischen Bakterien Chlorophyll auch im Dunkeln synthetisiert wird. Es existieren drei Gene im Genom von *Arabidopsis* (*PORA*, *PORB* und *PORC*). *PORA* ist neben *PHYA* eines der wenigen bisher bekannten Gene, deren Expression bei Belichtung abnimmt (Apel 1981, Bruce *et al.* 1989).

Chalconsynthase (*CHS*) und Chalconisomerase (*CHI*) sind die ersten beiden Enzyme in der Flavonoid-Biosynthese (Anthocyanbiosyntheseweg). Flavonoide bilden u. a. Blütenfarben und fungieren als Schutz gegen UV-B-Strahlung. Für beide Gene wurde eine zunehmende Expression bei Belichtung ermittelt (Batschauer *et al.* 1991, Barnes *et al.* 1996b, Fuglevand *et al.* 1996, Wade *et al.* 2001).

Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase (Rubisco) katalysiert im Calvinzyklus durch Aufnahme von Wasser und Kohlendioxid den regenerierten C5-Zucker zu 2 C3-Molekülen (3-Phosphoglycerat). Diese Reaktion erfolgt sowohl in Funktion als Carboxylase als auch Oxygenase. Das Enzym selbst besteht aus zwei Untereinheiten - der kleinen kernkodierten (RBCS) und der großen plastidär kodierten Untereinheit (RBCL). Für beide Gene wurde zunehmende Expression bei Belichtung festgestellt (Tobin und Silverthorne 1985).

### 1.5. Strategien zur Expressionsanalyse

Die Untersuchung der Genregulation einiger weniger Gene reicht aufgrund der Diversität der Signalkettenkomponenten und deren angedeuteten Komplexität zur Erklärung der beobachteten Phänomene nicht aus. Möglicherweise ist auch eine unterschiedliche Regulation nicht erkennbar, weil die entsprechenden Gene als auch deren Regulation bisher nicht identifiziert und analysiert wurden.

Heute ist die Anzahl der bekannten und klonierten Gene drastisch gestiegen. Dies ist insbesondere auf die Entwicklung von Methoden zurückzuführen, die eine systematische Untersuchung vieler Proben einschließlich einer automatisierten Datenerfassung und -auswertung ermöglichen (*high throughput*). Der methodische Fortgang wäre nicht ohne den Gleichschritt der technischen Entwicklung erfolgt. Eine Art Initialzündung auf der molekularbiologischen Seite war die Sequenzierung von "*Expressed Sequence Tags*" (ESTs, Adams 1991), der ungeordneten Klonierung von cDNA-Banken und anschließender Sequenzierung kurzer Abschnitte (300 bp) zur eindeutigen Identifizierung der klonierten Fragmente. Zwei Wege wurden seither beschritten. Zum einen die Isolierung von (differentiell) exprimierten Genen, um einen möglichst vollständigen Gensatz eines Organismus zu erhalten. Hierzu dienen Methoden wie "*Differential Display*" (Liang und Pardee 1992), "*Representational Difference Analysis*" (Lisitsyn *et al.* 1993, Hubank und Schatz 1994), "*Fluorescent Differential Display*" (Ito *et al.* 1994), "*Amplified restriction fragment length polymorphism*" (Vos *et al.* 1995), "*Serial Analysis of Gene Expression*" (Velculescu *et al.* 1995), "*Suppressions-PCR*" (Siebert *et al.* 1995), "*Suppression Subtractive Hybridisation*" (Diatchenko *et al.* 1996). Diese auch als offene Systeme bezeichneten Methoden sind nicht auf schon bestehende Datenbanken oder Banken von Klonen beschränkt, d.h. sie sind beliebig erweiterbar. Nachteilig ist u. a. der ständig neu zu bearbeitende variable Datensatz, die hohe Redundanz in der Analyse sowie die Abhängigkeit von der Expression, der Überlagerung von Signalen und Genfamilien. Allerdings entstanden auf diese Art und Weise zunehmend größere Bibliotheken von Genbanken

für verschiedene Prokaryoten als auch Eukaryoten.

Jedoch ist nicht nur die Sequenz sondern auch die Funktion jedes Genes und sein komplexes Zusammenwirken in der Zelle bzw. Organismus von Interesse. So gibt es z.B. für das fast vollständig sequenzierte Genom von Arabidopsis ca. 26000 annotierte Gene (April 2003), aber nur von rund 20 % ist eine Funktion bekannt. Die Genexpression in der eukaryotischen Zelle wird primär auf Transkriptionsebene reguliert. mRNA-Stabilität, posttranskriptionalen Modifikationen, Proteinabbau u. a. sind untergeordnete Prozesse. Aus diesem Grund wurde eine Reihe von Methoden entwickelt, die eine vergleichende Analyse der Expression der Gene basierend auf den vorhandenen geordneten Datenbanken, Genbanken etc. zwischen unterschiedlichen physiologischen Zuständen oder zwischen Wildtyp und Mutanten bzw. transgenen Pflanzen oder zwischen unterschiedlichen Geweben erlauben. Hierfür werden geordnete Genbanken als Bakterienkolonien (Klone von genomischen oder cDNA Banken) oder als DNA (Plasmid-DNA, PCR-Fragmente oder Oligonukleotide) auf einen festen Träger aufgetragen. Trägermaterialien sind Nylon- oder Nitrozellulosemembranen im “*Macro-Arraying*” bzw. Glas- oder Plastikobjektträger im “*Micro-Arraying*”. Die Expressionsprofile werden durch Hybridisierung einer markierten Sonde auf den Arrays bestimmt (siehe Pkt. 2.5.). Die Markierung erfolgt radioaktiv (Macro-Array) bzw. per Chemifluoreszenz oder Chemilumineszenz (Micro-Array). Erste vergleichende Experimente mit Hilfe von Macro-Arrays wurden durch Lennon und Lehrach (1991) bzw. Gress *et al.* (1992) durchgeführt. Micro-Arrays sind die konsequente Fortentwicklung der Macro-Arrays hin zu höheren Spotdichten und stabileren Materialien (Skena *et al.* 1995, Skena 1996, Skena *et al.* 1998). Eine weitere Möglichkeit bietet sich in der Nutzung von Protein-Arrays (Lueking *et al.* 1999), um Regulationsprozesse der Zellen auf der posttranskriptionalen Ebene zu untersuchen. Die Gensätze der Banken sind durch ihre Immobilisierung an eine feste Oberfläche nicht beliebig erweiterbar, deshalb gelten diese letzten Methoden auch als geschlossene Systeme. Die Vorteile beruhen in der simultanen Erfassung vieler Expressionsprofile mit einem Experiment, der Speicherung in entsprechenden Datenbanken, den vielfältigen Analysemöglichkeiten, der Verfügbarkeit der Klone und der Informationen.

### **1.6. Zielstellung der Arbeit**

Die cDNA-Array Methode auf der Basis einer größeren Anzahl von Klonen sollte kombiniert mit der Untersuchung von Photorezeptormutanten eine umfassendere Analyse der lichtabhängigen Genregulation auf der mRNA-Ebene (Genexpression) ermöglichen. Insbesondere

während der frühen Phase der Photomorphogenese müßte aufgrund der vielfach beobachteten Phänomene wie Ergrünung, Inhibierung der Hypokotylverlängerung, Öffnung der Keimblätter und des Hypokotylhakens eine veränderte Genexpression in den Keimlingen messbar sein. Folglich wurden Belichtungsexperimente mit den verfügbaren etiolierten Keimlingen der Wildtypen, der Phytochromrezeptormutanten (*phyA*, *phyB*, *phyAB*), den Cryptochromrezeptormutanten (*cry1*, *cry2*), der Mutante *det1* und der PHYB-überexprimierenden Linie (35S::PHYB) bei kontinuierlicher Bestrahlung mit Weißlicht durchgeführt. Für diese multiparallele Expressionsanalyse war die cDNA-Array Methode in der vorliegenden Arbeit als Experimentalsystem an der Modellpflanze Arabidopsis zu etablieren. Die Einführung des Experimentalsystems beinhaltete die Auswahl der cDNA-Klone aus den zur Verfügung stehenden cDNA-Kollektionen für die Herstellung der cDNA-Arrays, die Sondenpräparation und nach erfolgter Hybridisierung die Auswertung der Expressionsdaten für die im cDNA-Array verwendeten cDNA-Fragmente. Die vergleichende Analyse der normalisierten Expressionsdaten der Gene aus den Belichtungsexperimenten sollten neue Erkenntnisse bezüglich der lichtabhängigen Regulation der Gene während der frühen Photomorphogenese ergeben. Aufgrund der zeitintensiven Experimente war auf eine zunehmende Automatisierung der Prozesse zu achten.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad "pro analysi" und wurden von den Firmen Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg), Amresco (Solon, USA), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Merck KgaA (Darmstadt), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) bezogen. Radiochemikalien stammten von den Firmen Amersham ( $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP) und DuPont (Basel, Schweiz,  $[\alpha^{33}\text{P}]$ -dCTP). Enzyme und sonstige Materialien sind mit ihren Bezugsquellen gesondert angegeben.

#### 2.1.1. Pflanzenmaterial

Das verwendete Pflanzenmaterial ist in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt. Die Samen stammen aus dem Arabidopsis Ressourcenzentrum (Ohio, USA) oder direkt von ihren Eignern.

Tab. 1: Verwendetes Pflanzenmaterial

Bezeichnung	Alias	Genotyp	genetische Veränderung	Literatur
Ler-0		Ler-0		
Col-0		Col-0		
Ws-2		Ws-2	<i>phyD-1</i> Stop bei Pos 75 durch 14 bp Deletion	Aukerman <i>et al.</i> 1997
<i>phyA-201</i>	<i>fre1-1</i>	Ler-0	<i>PHYA</i> Q980⇒Stop	Nagatani <i>et al.</i> 1993
<i>phyB-5</i>	<i>hy3</i> 8-36	Ler-0	<i>PHYB</i> W552⇒Stop	Koornneef <i>et al.</i> 1980, Reed <i>et al.</i> 1993
<i>phyAB</i>		Ler-0	<i>phyA-201</i> x <i>phyB-5</i>	Reed <i>et al.</i> 1994
<i>cry1</i>	<i>hy4</i> 2.23	Ler-0	in <i>CRY1</i> keine Prozessierung des 3. Introns	Koornneef <i>et al.</i> 1980
<i>cry2</i>	<i>fha-1</i>	Ler-0	<i>CRY2</i> W54⇒Stop	Guo <i>et al.</i> 1998
<i>hy1</i>	<i>hy1</i> 21.84N	Ler-0	13 bp Deletion verursacht Leserahmenverschiebung	Koornneef <i>et al.</i> 1980, Muramoto <i>et al.</i> 1999

Bezeichnung	Alias	Genotyp	genetische Veränderung	Literatur
<i>hy2</i>		Ler-0	<i>HY2</i> P128⇒L	Koornneef <i>et al.</i> 1980, Kohchi <i>et al.</i> 2001
<i>det1-1</i>		Col-0	in <i>DET1</i> keine Prozessierung des 1. Introns	Chory <i>et al.</i> 1989, Pepper <i>et al.</i> 1994
35S:: <i>PHYB</i>		No-0	transgene Linie; <i>PHYB</i> konstitutiv exprimiert unter Kontrolle des 35S-Promotors	Wagner <i>et al.</i> 1991

### 2.1.2. Bakterien

- E. coli DH5 $\alpha$  (Woodcock 1989)  
*F'*/*endA1 hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>M<sub>K</sub><sup>+</sup>) *thi-1 recA gyrA*(nal<sup>r</sup>) *relA1*  
 $\Delta$ (*lacIZYA-argF*)U169 *deoR*  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15
- E. coli XL1-Blue (Stratagene, San Diego, USA)  
*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1*  
*lac*[*F'*proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>lacI<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)]
- E. coli XL1-Blue MRF6' (Stratagene)  
 $\Delta$ (*mcrA*)183  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1*  
*recA1 gyrA96 relA1 lac*[*F'*proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>lacI<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]
- E. coli DH10B (Invitrogen)  
*F' mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 deoR*  
*recA1 endA1 ara* $\Delta$ 139  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *galU galK*  $\lambda^-$  *rpsL*  
*nupG*  $\lambda^-$

### 2.1.3. Plasmide

- pZL1 (Gibco BRL Life Technologies)  
pBSC SK- (Stratagene)  
pWH802 (Tovar und Hillen 1991)

### 2.1.4. Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Planegg-Martinsried) und MWG AG Biotech (Ebersberg) lyophilisiert bezogen, in TE-Puffer pH 8,0 gelöst und auf 100 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$  eingestellt. Zusammengehörige Oligonukleotidprimerpaare sind in Tabelle 2 in einer Zeile aufgelistet. Die Annealingtemperatur ( $T_a$ ) im PCR-Zyklus (siehe Pkt. 2.2.3) für die Bindung der Oligonukleotide an die komplementäre DNA-Sequenz ist in den entsprechenden Abschnitten angegeben.

Tab. 2: Primerpaare für Polymerasekettenreaktion. Zusammengehörige Paare stehen in einer Zeile. Unterstrichene Nukleotide differieren in Wildtypen (oberer Primer) und Mutanten (unterer Primer).

Sequenz	Name	Name	Sequenz
GGT TTT CCC AGT CAC GAC GTT G	forLA	revLA	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC C
GAA ACG CCG CGT ATC GTC G	sgfor	sgrev	GCC GCC AAA GAA AGA GAA G
ATG GCC GCC TCA ACA ATG GC	lhcb1.3f	lhcb1.3r	TCA CTT TCC GGG AAC AAA GTT G
ATG GCC ACA TCA GCT ATC CAA C	lhcb1.4f	lhcb1.4r	TTA CTT TCC GGG GAC AAA GTT AG
ATG GCT TCC TCA ACC ATG GC	lhcb2.2f	lhcb2.2r	TCA CTT TCC GGG GAC GAA G
GTT GAC TGC TTC CAC AAG <u>T</u> CA	phyA1	phyA3	AGA TTA GCA AGA TGC ACA GAA C
GTT GAC TGC TTC CAC AAG <u>T</u> TA	phyA2		
CGC AGT GTG AGA TCG AAA <u>C</u> C	phyB1	phyB3	GTT GGG TGT TGC TCC TAG TG
CGC AGT GTG AGA TCG AAA <u>T</u> C	phyB2		
GCA GAA <u>C</u> AA <u>G</u> CT <u>C</u> AG <u>T</u> CG <u>T</u> C	phyD1	phyD3	GTC CTC GAT GCT TGG TAC AG
ACA CCA GCG CTG CAG <u>A</u> GA <u>G</u>	phyD2		
GAC GAA <u>T</u> GA <u>T</u> TG GCA GAA <u>A</u> GG	hy1A	hy1C	GGA CAA TAT GAG ACG AAG TAT CTC
CTG GTG GAC GAA <u>T</u> G <u>A</u> AA <u>A</u> AC	hy1B		
GCT ACT TGC AGA ATC ACC ATG	cry1A	cry1C	ACA GTC CAA CCA GAT TTC ACC
CTG GAA GAG CTT CAA GAT <u>G</u> GT	cry2A	cry2C	GTC TGA CGC TTA TTT CCC CG
CTG GAA GAG CTT CAA GAT <u>G</u> AT	cry2B		

**2.1.5. Enzyme**

	Konzentration	
Klenow-Polymerase	10 U $\mu\text{l}^{-1}$	(Amersham)
Lysozym		(Serva)
Proteinase K	20 mg $\text{ml}^{-1}$	(ICN Biomedicals GmbH, Eschwege)
Reverse Transkriptase	9 U $\mu\text{l}^{-1}$	(AMV RT, Promega GmbH, Mannheim)
RNAse A	10 mg $\text{ml}^{-1}$	(Roth)
RNAasin	40 U $\mu\text{l}^{-1}$	(Promega)
Taq-Polymerase		(DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i> , im Labor selbst isoliert, Engelke <i>et al.</i> 1990)
BstEII	10 U $\mu\text{l}^{-1}$	(Isochizomer Eco91I, MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
ClaI	10 U $\mu\text{l}^{-1}$	(Isochizomer Bsu15I, MBI Fermentas)
EcoRI	12 U $\mu\text{l}^{-1}$	Amersham
MseI	10 U $\mu\text{l}^{-1}$	(Isochizomer Tru1I, MBI Fermentas)

**2.1.6. Antibiotika**

Ampicillin	(Roth)	Stammlösung 10 mg $\text{ml}^{-1}$ in 50 % Ethanol, Konzentration im Medium 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Chloramphenicol	(Roth)	Stammlösung 30 mg $\text{ml}^{-1}$ in 96 % Ethanol, Konzentration im Medium 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Kanamycin	(Duchefa, Haarlem, Niederlande)	Stammlösung 25 mg $\text{ml}^{-1}$ in Aqua dest., Konzentration im Medium 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Ampicillin- und Kanamycinstammlösungen wurden sterilfiltriert.

### 2.1.7. DNA Marker

DNA Marker zur Bestimmung von DNA-Fragmentlängen wurden durch eine Restriktionsverdauung (24 h) des Vektors pWH801 ( $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ , Laborbestand Dr. Altschmied) mit den unten angegebenen Restriktionsenzymen hergestellt, stöchiometrisch zusammengesetzt und mit Ficoll-Marker (siehe Pkt. 2.1.10) auf die angegebene Konzentration eingestellt.

AG-Marker pWH801/EcoRI, pWH801/EcoRI/ClaI, pWH801/EcoRI/BstEII  $40 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$   
3740, 2310, 1660, 1430, 1260, 830 bp

Mse-Marker pWH801/EcoRI /MseI  $20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$   
925, 603, 500, 411, 282, 266, 188, 178, 128, 89, 65, 32, 31, 28, 13 bp

### 2.1.8. Reagenzien

Agar	(Difco Laboratories, Detroit, USA)
Agarose	(Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf )
BSA	(Roth)
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	(Roth)
Lachssperma DNA	(Stratagene)

### 2.1.9. Medien

Alle Komponenten wurden in Aqua dest. gelöst und anschließend autoklaviert.

#### 2.1.9.1. Medien für die Bakterienanzucht

LB-Medium (Luria Bertiani Medium)

$10 \text{ g l}^{-1}$  Bacto-Trypton (Duchefa),  $5 \text{ g l}^{-1}$  Hefeextrakt (Duchefa),  
 $10 \text{ g l}^{-1}$  NaCl, pH 7,5

2x 2YT Medium (*Yeast-Tryptone* Medium)

$16 \text{ g l}^{-1}$  Bacto-Trypton,  $10 \text{ g l}^{-1}$  Hefeextrakt,  $5 \text{ g l}^{-1}$  NaCl, pH 7,0

10x HMFM (*Hogness Modified Freezing Medium*)

Lsg. A: 1,3 M  $K_2HPO_4$ , 0,66 M  $KH_2PO_4$

Lsg. B: 5 mM  $MgSO_4$ , 20 mM tri-Natriumcitrat, 85 mM  $(NH_4)_2SO_4$ ,  
45 % Glycerin

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und anschließend  
200 ml Lsg. A mit 800 ml Lsg. B steril gemischt.

**2.1.9.2. Medien für die Pflanzenanzucht**

Murashige/Skoog-Medium (MS-Medium, Murashige und Skoog 1962)

4,3 g  $l^{-1}$  MS-Salz (Duchefa), 8 g  $l^{-1}$  Agar, pH 5,8 einstellen mit KOH  
Nach dem Autoklavieren wurden 1 ml  $l^{-1}$  sterilfiltrierte 1000x B5  
Vitamine (Duchefa) hinzugefügt.

MS-Medium + Saccharose

MS-Medium + 20 g  $l^{-1}$  Saccharose

**2.1.10. Allgemeine Puffer und Lösungen**

Ficoll-Marker: 15 % (w/v) Ficoll 400, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v)  
Xylencyanol in 1x TBE-Puffer

20x SSC-Puffer: 3,0 M NaCl, 300 mM tri-Natriumcitrat, pH 7,0

10x TBE-Puffer: 0,89 M Tris/HCl, 0,89 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,3

TE-Puffer 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 8,0

**2.1.11. Kits**

Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

Genomic DNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Megaprime DNA labelling system (Amersham)

Plasmid Isolation Kit (Qiagen)

ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

(Applied Biosystems, Foster City, USA)

**2.1.12. Spezielle Materialien**

AnaporePlus Membranfilter 0,2 µm	(Whatman International Ltd., Maidstone, UK)
Centrisep Säulen	(emp Biotech GmbH, Berlin)
Disposable Tips für Biorobot 9600	(Qiagen)
Dynabeads Oligo dT <sub>25</sub>	(Deutsche Dynal GmbH, Hamburg)
Gel Blotting Paper (Filterpapier)	(Schleicher & Schüll GmbH, Dassel)
Imagefolien	(Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokio, Japan)
Microtiterplatten (96er/384er)	(Nunc, Genetix oder Greiner über Heinemann Labor- technik GmbH, Duderstadt)
Nylonmembran "Biodyne B"	(Pall GmbH Filtrationstechnik, Dreieich)
Petrischalen	(Greiner, Frickenhausen)
Sterilfilter 0,2 µm	(Heinemann Labortechnik)
Vermiculit Körnung 2	(Kakteen Schwarz, Nürnberg-Katzwang)

**2.1.13. Software**

"Arrayvision" Version 5.1	(Imaging Research, Toronto, Kanada)
"BAS-Reader" Version 2.26ß	(Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt)
"ChloroP" Version 1.1	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/index.html">www.cbs.dtu.dk/services/index.html</a>
"Excel" Version 2000	(Microsoft Corporation, Redmond, USA)
"Husar" Version 5	(DKFZ Heidelberg, Heidelberg)
"J-Express" Version 2.1	<a href="http://www.molmine.com">www.molmine.com</a>
"Meme" Version 3.0	<a href="http://www.meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html">www.meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html</a>
"Sequencher" Version 3.1.1.	(Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA)
"Tina" Version 2.09	(Raytest)
"PERL" Scripte	(IPK Gatersleben)

**2.1.14. Geräte**

Biogrid	(Biorobotics, Cambridge, UK)
Fluoroimager	(SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim)

Biorobot 9600	(Qiagen)
PCR Mastercycler gradient	(Eppendorf AG, Hamburg)
Pflanzenkulturschrank Percival Scientific I-35LLVL	(CLF Analytische Laborgeräte, Emersacker)
Phosphorimager FLA3000	(Raytest)
Strahlungsmessgerät IL1700 mit Detektor SED 033/2767	(International Light, Newburyport, USA)
Sequenzierer ABI Prism 377	(Applied Biosystems, Foster City, USA)
UV-Stratalinker	(Stratagene)

## 2.2. Methoden

Die nachfolgend aufgeführten Methoden wurden wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben durchgeführt:

- photometrische DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen
- Agarosegelelektrophoresen mit DNA
- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAA) mit DNA
- Formamidgelelektrophoresen mit RNA
- Northern Transfer.

DNA-Sequenzierungen erfolgten als Serviceleistung durch das zentrale Sequenzierlabor am IPK Gatersleben unter Verwendung des Sequenzierers ABI Prism 377 und des "ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits". Alle verwendeten Kits wurden entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

### 2.2.1. Pflanzenanzucht

*Arabidopsis* wurde zur Samengewinnung in einer Klimakammer bei  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  und einer Lichtstärke von  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF unter Langtagsbedingungen (16 h Tag/8 h Nacht) kultiviert. Für die Aussaat wurden die Samen ( $3,5 \text{ mg dm}^{-2} \pm 0,17 \text{ mg dm}^{-2}$ ; 10 mg Samen entsprechen ~500 Samen) in 0,1 %iger Agarlösung suspendiert und in Schalen auf einem Gemisch aus 50 % Erde und 50 % Vermiculit gleichmäßig verteilt.

Zur keimfreien Kultivierung wurden 10 mg *Arabidopsis* Samen auf MS-Medium in Petrischalen ( $16,6 \text{ mg dm}^{-2} \pm 0,8 \text{ mg dm}^{-2}$ ) ausgebracht. Hierzu wurden die Samen mit 1 ml



70 %igem Ethanol für 1 min, mit 5 %igem Calciumhypochlorid für 30 min behandelt und anschließend 5mal mit sterilem H<sub>2</sub>O für je 10 min gewaschen. Nach Suspensieren in 1 ml 0,1 %igem Agar konnten sie auf MS-Medien gleichmäßig verteilt werden. Um 96 Samenproben gleichzeitig bearbeiten zu können, wurde ein Sterilisierungsprotokoll auf dem Biorobot 9600 etabliert (siehe Anhang: Protokoll1.txt). Zur Vereinheitlichung des Keimzeitpunktes wurden alle Aussaaten einer zweitägigen Vernalisation in der Kühlkammer (4°C) in Dunkelheit unterzogen und zu Beginn der Kultivierung mit Weißlicht (Tab. 3) für 1 h belichtet. Die Anzucht der etiolierten Keimlinge erfolgte im Pflanzenkulturschrank bei 22°C ± 2°C bei ausgeschaltetem Licht. Zusätzlich wurden die Petrischalen in Aluminiumfolie eingepackt. Neben Weißlicht wurden weitere spezifische Lichtquellen für Belichtungsexperimente verwendet, deren Parameter in Tab. 3 aufgeführt sind. Die Verwendung der Lichtquellen einschließlich der weiteren Kultivierung kann den einzelnen Abschnitten entnommen werden (siehe Pkt. 3.4, 3.5 und 3.6). Unmittelbar nach der Ernte bei Sicherheitslicht (Tab. 3) wurden die Keimlinge in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tab. 3. Verwendete Lichtquellen und Filtersysteme der Belichtungsexperimente

Licht	Lampen	Filter	Bestrahlungstärke	Charakteristik
Weißlicht	LR TLD18W/25 <sup>2</sup>		50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR	
Rotlicht	HL 24 V/250 W	Glasfilter RG645 <sup>3</sup> ; dichroitischer Filter IR7 <sup>4</sup> , 3 mm	60 $\text{W m}^{-2}$ 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\lambda_{\text{max}} = 683 \text{ nm}$ hbw = 63 nm
Dunkelrotlicht	HL 24 V/250 W	Glasfilter RG9 <sup>3</sup> ; dichroitischer Filter IR6 <sup>4</sup> , 3 mm	10 $\text{W m}^{-2}$ 65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\lambda_{\text{max}} = 774 \text{ nm}$ hbw = 57 nm
Blaulicht	HgDL HBO200 <sup>1</sup>	HgMon 436 <sup>5</sup>	8 $\text{W m}^{-2}$ 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\lambda_{\text{max}} = 436 \text{ nm}$
Sicherheitslicht	LR TL 18 W/17 <sup>2</sup>	Plexiglas <sup>6</sup> 303,3 nm, 3 mm + 627,3 nm, 3 mm	< 0,0001 $\text{W m}^{-2}$ < 0,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\lambda_{\text{max}} = 553 \text{ nm}$ hbw = 8 nm

LR - Leuchtstoffröhre, HL - Halogenlampe, HgDL - Quecksilber-Dampf Lampe, hbw - Halbbandweite, <sup>1</sup> NARVA, Branderbisdorf, <sup>2</sup> Phillips, Eindhoven, Niederlande, <sup>3</sup> Schott, Mainz, <sup>4</sup> Optochem, Stromberg, <sup>5</sup> Carl Zeiss, Jena, <sup>6</sup> Röhlm & Haas, Darmstadt.

## 2.2.2. Isolierung von Nukleinsäuren

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

BD1:	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
BD2:	200 mM NaOH 1 % SDS
BD3:	3 M Kaliumacetat 1,8 M Ameisensäure

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte zu analytischen Zwecken nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) durch alkalische Lyse. Mit der Methode konnten bis zu 500 µg Plasmid-DNA aus 50 ml *E. coli* Flüssigkultur gewonnen werden.

50 ml Bakterienmedium (LB oder 2YT) wurden mit einer Bakterienkolonie oder 10 µl Stammkultur beimpft, für 20 h bei 37°C geschüttelt und die Bakterien durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 3500 x g geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 850 µl BD1 unter Zugabe von 50 µl RNaseA und 4 mg Lysozym resuspendiert, auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von je 450 µl BD2 und weitere Inkubation für 5 min auf Eis. Durch Zugabe von je 450 µl BD3 wurden Proteine und genomische DNA ausgefällt und nach erneuter Inkubation für 5 min auf Eis durch Zentrifugation (10 min, 16000 x g, 4°C) sedimentiert. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und mit 5 µl Proteinase K für je 30 min bei 37°C und 55°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 16000 x g, 4°C) und Überführung des Überstandes in neue Reaktionsgefäße wurde die DNA durch Zugabe von 0,6 Volumenteilen (800 µl) eiskaltem Isopropanol gefällt. Nach 5 min Inkubation bei RT - die Zeit kann bis zu 16 h ausgedehnt und die Temperatur bis auf -20°C abgesenkt werden - wurde die DNA durch 15minütige Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C sedimentiert. Nach kurzem Trocknen bei RT wurden die beiden Aliquots in je 400 µl TE-Puffer gelöst und vereinigt. Die weitere Reinigung erfolgte durch Fällung mit 400 µl 30% (w/v) PEG 8000 in 1,5 M NaCl, Inkubation für 30 min auf Eis und anschließender Sedimentation bei 16000 x g und 4°C für 15 min. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die DNA in 300 µl TE-Puffer gelöst. Zur Entfernung von Restmengen PEG erfolgte eine weitere Ethanol-fällung durch Zugabe von 30 µl 3 M Natriumacetatlösung, pH 6,0 und 750 µl 96 %igem eiskaltem Ethanol. Nach

Zentrifugation (s. o.) wurde die DNA mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 - 400 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Abschließend wurde die Konzentration der DNA photometrisch oder durch Vergleich mit einem DNA-Standard in einem Agarosegel (1,0 % in 0,5x TBE-Puffer) bestimmt.

#### 2.2.2.2. Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen

CTAB-Puffer:	1 % CTAB	Zusatz vor Gebrauch:
	100 mM Tris/HCl , pH 8,0	1 % β-Mercaptoethanol
	10 mM EDTA, pH 8,0	0,5 % PVP40000
	0,7 M NaCl	

Die Isolierung kleiner Mengen genomischer DNA aus Pflanzenmaterial z. B. für den Nachweis von Mutationen erfolgte mit dem *Plant DNA Isolation Kit* (Roche). Die Proben wurden zur Isolierung der genomischen DNA entsprechend dem mitgelieferten Protokoll aufgearbeitet.

Größere Mengen genomischer DNA von Pflanzen wurde mit der CTAB-Methode isoliert (nach Saghai-Marooft *et al.* 1984). Dazu wurden 10 g frisches Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in vorgekühlte 50 ml Reagenzröhrchen überführt. Der Zugabe von 20 ml CTAB-Puffer und dem Mischen folgte eine Inkubation bei 65°C für 90 min im Wasserbad. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 0,5 Volumenteile Chloroform zugegeben und das Gemisch für 30 min im Überkopfschüttler bewegt. Zur Phasentrennung wurde die Probe zentrifugiert (10 min, 3000 x g, 10°C), die organische Phase entfernt und die Extraktion der wässrigen Phase wiederholt. Anschließend wurde diese mit 100 µl RNaseA versetzt, für 30 min bei 37°C inkubiert, und nach dem Abkühlen die DNA mit 1 Volumenteil eiskalten Isopropanol gefällt. Die DNA wurde sedimentiert (10 min, 4°C, 25000 x g), kurz getrocknet und in 400 µl TE-Puffer gelöst. Nach der Überführung in ein 2 ml Reaktionsgefäß folgte ein Reinigungsschritt durch Präzipitation mit 200 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 1,2 ml 96 %igem Ethanol für 1 h bei RT. Nach Zentrifugation (10 min, 4°C, 16000 x g) wurde das Präzipitat mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet, in TE-Puffer gelöst und nach UV-spektrometrischer Messungen die Konzentration auf 1 µg µl<sup>-1</sup> eingestellt.

**2.2.2.3. Isolierung von RNA aus Pflanzen**

Extraktionspuffer:	4 M Guanidiniumisothiocyanat	Zusatz vor Gebrauch:
	25 mM tri-Natriumcitrat	100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
	0,5 % (w/v) Natriumlauroylsarcosinat	

Gesamt-RNA aus Pflanzen für die Nutzung im “Northern”-Transfer und die Hybridisierung von cDNA-Arrays wurde nach der Methode von Chromczynski und Sacchi (1987) präpariert. Der hohe Guanidiniumthiocyanatanteil der Lösung sorgt für die sofortige Denaturierung von Proteinen und beugt somit einer Degradierung der RNA durch RNasen vor. Gleichzeitig wird durch den niedrigen pH-Wert die Verdrängung der genomischen DNA in die Phenolphase bewirkt und die Isolierung der RNA in nur einem Schritt ermöglicht.

500 mg gefrorenes Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und sofort in 5 ml Extraktionspuffer überführt. Nacheinander wurden 1 ml 1 M Natriumacetat pH 4,0 und 5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) hinzugegeben und die Suspension jeweils gut durchmischt. Der Inkubation auf Eis (15 min) folgte die Trennung der Phasen durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 10000 x g). Die Nukleinsäuren der wässrigen Phase wurden durch Zusatz von 2,5 Volumenteilen Ethanol in 10 min bei 4°C präzipitiert, durch Zentrifugation (15 min, 16000 x g, 4°C) sedimentiert, in 750  $\mu$ l Aqua dest. gelöst und die RNA mit 750  $\mu$ l 4 M LiCl bei 4 °C für 20 h erneut gefällt. Nach der Zentrifugation (15 min, 4°C, 16000 x g) wurde die sedimentierte RNA nochmals mit 1 ml 2 M LiCl und 1 ml 70 %igen Ethanol gewaschen, sedimentiert (s. o.), getrocknet und in 100  $\mu$ l Aqua dest. gelöst. Abschließend wurde die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt und in einem denaturierenden Agarosegel (1,0 %) mit Formaldehyd kontrolliert.

**2.2.3. Polymerasekettenreaktion**

10x PCR-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 9,0
	500 mM KCl
	1 % Triton X-100

dNTP: je 2 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Zum Nachweis von Mutationen und zur Amplifikation von Genfragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR, White *et al.* 1989) eingesetzt. Für analytische Zwecke wurde die

Reaktion in 20  $\mu\text{l}$  und für präparative Zwecke in 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 1/10 Volumenteil 10x PCR-Puffer, dNTP's (je 2 mM) und 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , je 1/50 Volumenanteil der beiden Oligonukleotide (100 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$ ) und Taq-Polymerase (Konzentration im Reaktionsansatz:  $\sim 1\text{U } \mu\text{l}^{-1}$ ). Pro Reaktionsansatz wurden entweder 10 ng Plasmid-DNA, 1  $\mu\text{g}$  genomische DNA oder 1/10 PCR-Reaktionsvolumen Bakterienkultur (Kolonie-PCR) verwendet. Die zu amplifizierende DNA wurde grundsätzlich beim Pipettieren vorgelegt und anschließend mit dem PCR-Reaktionsansatz vermischt. Zum Abtöten und Aufschließen der Bakterien wurde in einer Kolonie-PCR die Vorlage vor der Zugabe des PCR-Reaktionsgemisches für 5 min auf 95°C erhitzt. Der PCR-Reaktion wurden unter Standardbedingungen 5 min 95°C zur Denaturierung der DNA vorangestellt. Der PCR-Zyklus erfolgte in den Abschnitten Denaturierung der DNA (1 min, 94°C), Anlagern der Oligonukleotide (1 min) und Kettenverlängerung (1 min, 72°C) und wurde 30mal durchlaufen. Zur abschließenden Kettenverlängerung wurde 5 min bei 72°C inkubiert, bevor die Reaktion auf 20°C abgekühlt und die Temperatur konstant gehalten wurde. Zur Kontrolle der PCR-Experimente wurden die PCR-Produkte auf Agarosegelen (1,0 % in 0,5x TBE-Puffer) analysiert. Unter den aufgeführten Bedingungen konnten Fragmente bis zu 3 kbp sicher amplifiziert werden.

Für den Nachweis von genomischen Mutationen wurden spezifische PCR-Protokolle für die jeweiligen Oligonukleotidpaare verwendet (siehe Pkt. 3.1.2). Die Kontrolle der PCR erfolgte aufgrund der kurzen Reaktionsprodukte mit 1,5 %igen Agarosegelen (in 0,5x TBE-Puffer).

### 2.2.4. Umsortierung von cDNA-Klonen

Zur Isolierung einer großen Zahl von Klonen aus geordneten cDNA-Bibliotheken in 384er Microtiterplatten wurde der Biorobot 9600 unter Verwendung von Wechselspitzen benutzt. Für die Neuordnung der interessierenden Klone wurden Tabellen in "Excel" mit deren Ausgangsplattenadressen und den Adressen der 96er Zielplatte erstellt und ein Programm zum automatischen Einlesen und Ausführen der Tabellen auf dem Biorobot 9600 etabliert (siehe Anhang: Protokoll2.txt). Je 5  $\mu\text{l}$  einer ausgewählten Bakterienkultur in einer Ausgangsplatte wurden in 200  $\mu\text{l}$  2YT+HMFM einer Zielplatte abgelegt und für 20 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Wachstumskontrolle erfolgte durch Messung der scheinbaren Absorption bei 595 nm im Fluoroimager. Aus Sicherheitsgründen wurden zwei Kopien dieser Microtiterplatten mit Hilfe des Roboters "Biogrid" und des zugehörigen 0,2 mm 96er *Pin-Tools* angefertigt. Die inokulierten Mikrotiterplatten wurden wie oben bebrütet und an-

schließend das Bakterienwachstum (s. o.) kontrolliert.

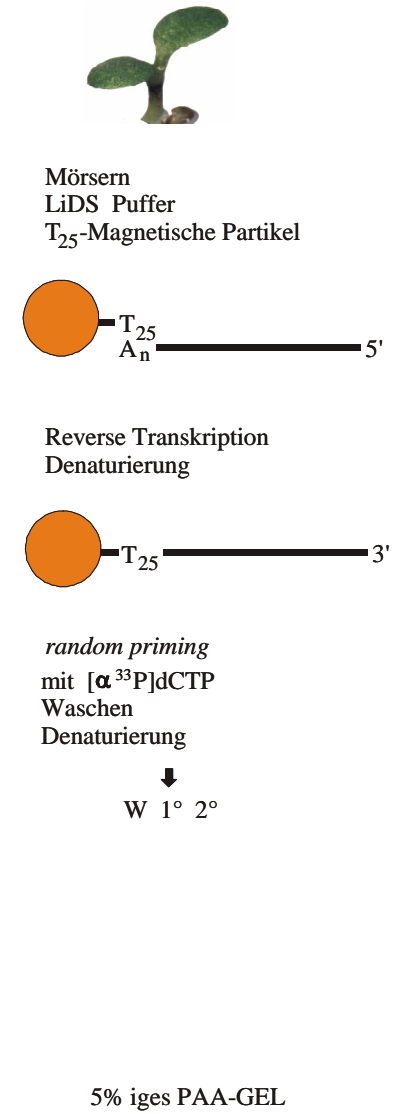
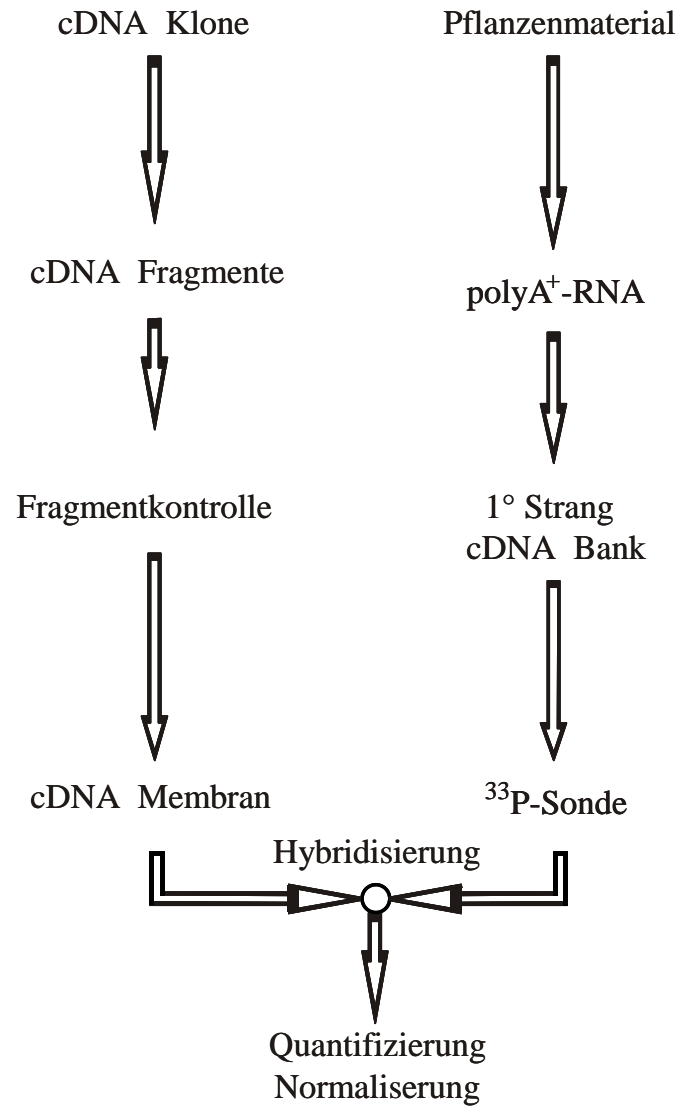
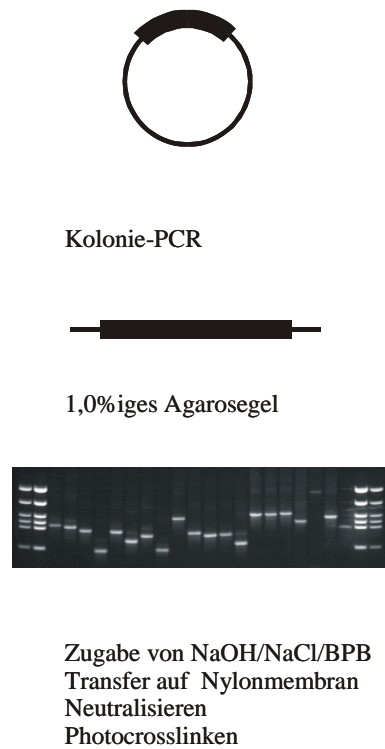
### 2.2.5. cDNA-Arrays

cDNA-Arrays bieten die Möglichkeit der parallelen Expressionsanalyse vieler verschiedener Gene (Gress *et al.* 1992, Schena *et al.* 1995). Hierzu müssen die cDNA-Fragmente bereitgestellt, auf Membranen übertragen und diese mit radioaktiv markierter cDNA hybridisiert werden. Anschließend folgt die Auswertung mit Spottedetektion und Normalisierung der gemessenen Signale, um den Vergleich mehrerer Experimente zu ermöglichen (Abb.4).

#### 2.2.5.1. Amplifikation der cDNA-Fragmente

Für die Amplifikation der cDNA-Fragmente wurden die Klone mikrotiterplattenweise mit Hilfe des Roboters "Biogrid" und des zugehörigen 0,2mm 96er *Pin-Tools* in je 200 µl LB-Medium überimpft und für 20 h bei 37°C inkubiert. Nach Wachstumskontrolle (s. o.), manueller Überführung von je 5 µl jeder Bakterienkultur einer Mikrotiterplatte in zwei PCR-Mikrotiterplatten wurde eine Kolonie-PCR im präparativen Maßstab mit dem Primerpaar "forLA/revLA" durchgeführt (siehe Pkt. 2.2.3;  $T_a = 62^\circ\text{C}$ ). Anschließend wurden die gleichen Reaktionsansätze aus beiden PCR-Platten vereinigt und in einem Brutschrank bei 37°C auf ca. 50 µl eingeeengt. Zur Kontrolle der PCR wurden Agarosegele (1,0 % in 0,5x TBE-Puffer) angefertigt und fotografiert.

Abb. 4 (Seite 31): Herstellung eines membranbasierten cDNA-Arrays (linke Hälfte) und einer  $^{33}\text{P}$ -markierten cDNA-Sonde (rechte Hälfte). Die Signalintensitäten der einzelnen cDNA-Fragmente nach der Hybridisierung sind die Grundlage für die Analyse.



### 2.2.5.2. Herstellung der cDNA-Arrays

2x Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH  
 2,5 M NaCl  
 (zur Visualisierung des übertragenen Materiales:  
 + 1 % (w/v) Bromphenolblau (BPB))

Zur Herstellung von cDNA-Arrays wurden die amplifizierten PCR-Fragmente (Pkt. 2.2.5.1) geordnet auf eine positiv geladene Nylonmembran (BiodyneB, Pall) übertragen. Hierfür wurden 10 µl der 2x Denaturierungslösung in jede Vertiefung einer 384er Mikrotiterplatte vorgelegt und mit je 10 µl eines PCR-Amplifikats gemischt. Die alkalisch denaturierte DNA wurde mit Hilfe des Roboters "BioGrid" und des 384er 0,4 mm *Pin-Tools* mikrotiterplattenweise auf die Membran überführt. Durch Versetzung der Aufsetzpunkte des *Pin-Tools* auf der Membran 3fach in x-Richtung als auch 3fach in y-Richtung entsteht ein Muster bestehend aus 384 kleinen Quadraten mit je 9 Punkten (3 x 3; siehe Abb. 5). Durch Belegung von je zwei Punkten in diesem 3 x 3 Muster mit identischen cDNA-Fragmenten (Doppelspot) konnten der Inhalt von vier 384er Mikrotiterplatten auf eine Membran von 12 x 8 cm übertragen werden. Der zentrale Punkt des 3 x 3 Musters blieb unbelegt. Um die Variabilität des übertragenen Volumens zu verringern, wurde jedes PCR-Fragment drei Mal auf denselben Punkt übertragen.

Nach der Übertragung aller PCR-Fragmente wurden die Membranen in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl und anschließend in 1,5 M NaCl /0,5 M Tris/HCl, pH 7,4 jeweils 5 min behandelt. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung (125 kJ) der noch feuchten Membran kovalent fixiert, danach noch zweimal mit 2x SSC für 5 min gewaschen, bei 80°C für 30 min getrocknet und bis zur Verwendung zwischen Filterpapier ("Gel Blotting Paper") bei RT gelagert.

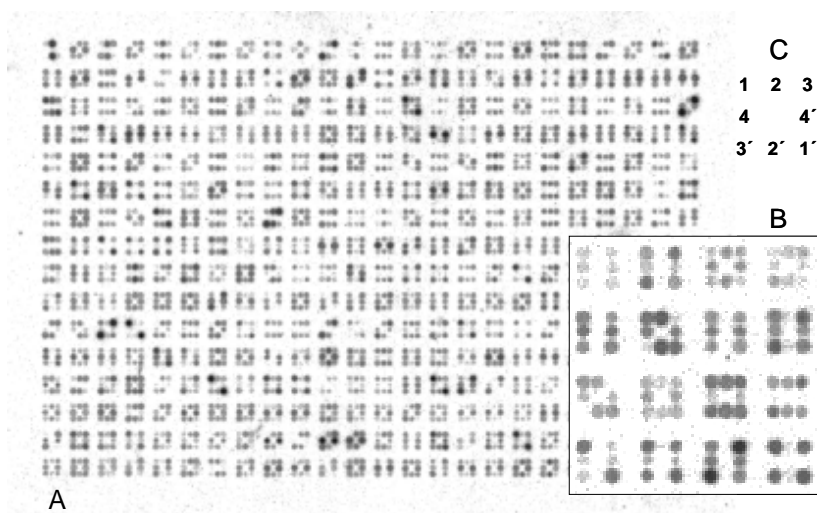


Abb. 5: Darstellung des Spotmusters. A: Hybridisierte cDNA-Membran. Auf der Membran sind 1536 PCR-Fragmente in 384 (24 x 16) kleinen Quadraten im Spotmuster 3 x 3 zu je 4 doppelt aufgetragenen PCR-Fragmenten angeordnet. B: Vergrößerter Ausschnitt der Membran. C: Belegung eines kleinen Quadrates von 9 (3 x 3) Punkten mit jeweils 2 identischen cDNA-Fragmenten, der Mittelpunkt blieb frei.



**2.2.5.3. Synthese von <sup>33</sup>P-markierten cDNA-Sonden**

dNTP:	je 2 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Elutionspuffer:	2 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0
Lysepuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 7,5 500 mM LiCl 10 mM EDTA 1 % (w/v) LiDS Nach dem Autoklavieren wurden 5 mM DTT hinzugefügt.
5x RT-Puffer:	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 250 mM KCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
RT-Mix:	1x RT Puffer 1 mM DTT 0,5 mM dNTP 50 U RNAsin 50 U AMV RT ad 50 µl H <sub>2</sub> O
Waschpuffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM LiCl 1 mM EDTA/HCl 0,1 % LiDS

Die Isolierung von mRNA für die Sondenherstellung erfolgte mit Hilfe von DynaBeads Oligo dT<sub>25</sub> (Dyna). Der Vorteil dieser magnetischen Partikel besteht in der einfachen Separation des jeweiligen Überstandes. Vor ihrer Verwendung wurden 100 µl der in Suspension vorliegenden magnetischen Partikel zweimal in 250 µl Lysispuffer gewaschen. 300 mg Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert, das entstandene Pulver in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Lysispuffer überführt und zur Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile für 1 min bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenom-

men, zu den gewaschenen magnetischen Partikeln gegeben und die Suspension unter ständiger Bewegung 5 min bei RT inkubiert. Nach der Bindung der mRNA an die dT<sub>25</sub>-Kette der magnetischen Partikel wurde der Überstand durch magnetische Separation entfernt und die partikelgebundene mRNA dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gereinigt. Danach wurden die magnetischen Partikel mit der angehängten mRNA noch zwei Mal in je 250 µl 1x RT-Puffer gewaschen, um die Pufferbedingungen für die cDNA-Erststrangsynthese einzustellen (siehe Abb. 4). Mit der Zugabe von 50 µl RT-Mix und der Inkubation für 1 h bei 42°C erfolgte die Reverse Transkription der mRNA in cDNA ausgehend vom kovalent an die Partikeloberfläche gebundenen dT<sub>25</sub> als Primer. Anschließend wurde der RT-Mix durch magnetische Separation entfernt und zweimal mit 250 µl 1x RT-Puffer gewaschen. Nach Entfernung der mRNA durch thermische Denaturierung in 50 µl Elutionspuffer (95°C, 2 min) und sofortiger magnetischer Separation, der Wiederholung dieses Vorganges und dem zweimaligem Waschen der Partikel in Wasser wurde die <sup>33</sup>P-markierte cDNA-Sonde durch *random priming* an dem kovalent gebundenen Erststrang hergestellt (*Megaprime-Kit*, Amersham-Pharmacia). Da es sich um eine Festphasenreaktion handelt, wurden statt 1 U nach Herstellervorschrift 10 U Klenow-Polymerase (Amersham-Pharmacia) eingesetzt. Für die radioaktive Markierung wurden 50 µCi [ $\alpha^{33}$ P]-dCTP verwendet. Zur Abtrennung von nicht-eingebauten radioaktiven Nukleotiden wurde nach der "random priming" Reaktion der Überstand durch magnetische Separation entfernt. Die neusynthetisierten, radioaktiv markierten cDNA-Fragmente wurden durch thermische Denaturierung in 50 µl Elutionspuffer (95°C, 2 min) vom kovalent gebundenen Erststrang abgelöst und durch magnetische Separation von den Partikeln getrennt. Das Eluat wurde über einen 0,2 µm Filter (Anopore Plus, Whatman) von eventuell verschleppten Partikeln befreit (Zentrifugation 16000 x g, 1 min, RT) und diente anschließend als Sonde in der Hybridisierung mit einem cDNA-Array. Zur Kontrolle der Einbauraten wurde die radioaktive Strahlung der Sonde sowie jedes Rückstandes semi-quantitativ mit einem Geigermüllerzählrohr bestimmt.

Für Kreuzhybridisierungsexperimente wurden mit dem "Megaprime Kit" und 50 µCi [ $\alpha^{33}$ P]-dCTP jeweils 100 ng der drei *LHCB*-Gen PCR-Fragmente (Amplifikation von Plasmid-DNA) nach vorheriger Kontrolle der Fragmentlängen und Reinigung durch Elution aus einem 1,0 %igen Agarosegel radioaktiv markiert. Die Abtrennung der nichteingebauten Nukleotide erfolgte mit Centriscap Säulen nach Herstelleranleitung (emp Biotech). Die Einbaurate wurde ebenfalls semi-quantitativ kontrolliert (s. o.).

#### 2.2.5.4. Hybridisierung

Church -Puffer:        0,5 M Na-Phosphat pH 7,2  
                              7 % (w/v) SDS  
                              1 % (w/v) BSA  
                              1 mM EDTA

Die Hybridisierung ist eine Reassoziationsreaktion von komplementären einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen (DNA-Strang auf der Membran und markierter cDNA-Strang in der Sonde) in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit. Vor der Erstbenutzung wurde jede Membran einmal ohne Sonde für mindestens 1 h bei 65°C in 10 ml Church-Puffer inkubiert und der Behandlung zur Wiederverwendbarkeit (s.u.) unterzogen, um lose gebundene DNA zu entfernen.

Vor jeder Hybridisierung wurden die Nylonmembranen zur Absättigung unspezifischer Bindestellen und zur Temperierung des Systems mindestens 1 h bei 65°C in 10 ml Church-Puffer mit 100 µl thermisch denaturierter Lachssperma-DNA (10 mg ml<sup>-1</sup>; 5 min, 95 °C mit anschließender Abkühlung für 10 min auf Eis) inkubiert. Nach Zugabe der denaturierten Sonde (5 min, 95°C mit anschließender Abkühlung für 3 min auf Eis) folgte die Hybridisierung für 18 h bei 65°C. Im Anschluss wurde die Membran zweimal in 0,2x SSC/0,1 % SDS bei 65°C für 15 min gewaschen, auf ein mit dieser Lösung angefeuchtetes Filterpapier gelegt und zusammen mit diesem in Haushaltsfolie verpackt. Die Exposition erfolgte mit Imagefolien im Bleischrank bei RT bis an die Grenze der Überexposition (für ca. 18 h).

Um eine Wiederverwendung der Membranen zu ermöglichen, wurden die gebundenen, radioaktiv markierten DNA-Stränge (Sonde) durch Schwenken der Membran in kochender 0,1x SSC/0,1 % SDS Lösung für 30 min und anschließender alkalischer Behandlung in 0,4 M NaOH (65°C, 15 min) mit nachfolgender Neutralisierung (0,1x SSC/0,1 % SDS/0,5M Tris/HCl, pH 7,5, RT, 2x 15 min) entfernt. Die vollständige Entfernung der radioaktiven Sonde wurde durch eine lange Exposition (>50 h) überprüft und die feuchten Membranen bei -20°C gelagert. Die Membranen wurden in bis zu fünf Mal wiederverwendet.

#### 2.2.5.5. Auswertung und Normalisierung

Die exponierten Imagefolien wurden mit dem Phosphorimager FLA3000 und dem Programm "BAS-Reader" bei einer Pixelgröße von 100 µm und einer Auflösung von 65536 Graustufen ausgewertet. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Programm "ArrayVi-

sion" Version 5.1, indem zunächst das 3 x 3 Spotschema der 1536 Klone einer Membran (siehe Pkt. 2.2.5.2) als ideales Spotmuster vordefiniert wurde. Die 3 x 3 Punkte eines kleinen Quadrates bildeten die Primärelemente des Rasters, die 384 kleinen Quadrate die Sekundärelemente. Der Hintergrund wurde als Rahmen von 3 Pixeln Breite im Abstand von 3 Pixeln lokal um jedes der Sekundärelemente bestimmt. Nach dem Einlesen der Phosphorimagerdateien erfolgte im ersten Schritt die grobe Anpassung des idealen Musters durch manuelle Verzerrung an das reale Muster auf der Membran. Der nachfolgenden Feinanpassung des Rasters schloss sich eine visuelle Kontrolle und gegebenenfalls eine manuelle Korrektur einzelner Elemente des Musters an. Die Signalintensitätsdaten für alle Elemente des Musters einschließlich der zugehörigen Hintergrundwerte wurden durch "ArrayVision" als Textdatei abgelegt und diese für die weitere Auswertung eingesetzt.

Nach dem Import der Textdateien in das Programm "Excel" wurden die Mittelwerte jedes Doppelspots errechnet. Signalmittelwerte, die kleiner als 20 % des lokalen Hintergrundes betragen, wurden auf diesen Wert gesetzt, um im Vergleich der Experimente untereinander keine hohen Faktoren zwischen den Experimenten zu erzeugen, die auf einem hohem (Meß-) Fehler beruhen.

Um den Vergleich mehrerer Experimente zu ermöglichen (Normalisierung), wurde der Median für die logarithmierten Signalintensitäten aller Gene eines Experimentes zu Null gesetzt (Eisen *et al.* 1998). Dazu wurde der Median aller logarithmierten Signalmittelwerte eines Experimentes von jedem logarithmierten Signalmittelwert subtrahiert. Um Gene mit unterschiedlichen Expressionsniveaus in einem Experiment jedoch gleichartigem Expressionsverhalten in allen betrachteten Experimenten bezüglich ihrer Ko-Expression miteinander vergleichen zu können, wurden die Signalintensitäten auf ihre Relationen (Faktoren) zwischen den Experimenten abstrahiert. Ausgehend von den median-zentrierten Signalwerten wurde für jedes cDNA-Fragment in den betrachteten Experimenten der Mittelwert bestimmt und dieser von den median-zentrierten Signalwerten des cDNA-Fragmentes subtrahiert. Analog zur medianen Zentrierung eines Experimentes betrug der Mittelwert nach erfolgter Subtraktion für jedes cDNA-Fragment in diesen Experimenten gleich Null (Mittelwertzentrierung). Abschließend erfolgte nochmals eine Zentrierung über den Median aller mittelwertzentrierten Signalwerte eines Experimentes (s. o.). Weitere Wiederholungen waren nicht erforderlich, da sich die Relation der Signalwerte zwischen den Experimenten nicht mehr veränderten.

Für die weitere Auswertung der Expressionsdaten wurde das Programm "J-Express" für das Gruppieren von cDNA-Fragmenten mit ähnlichem Expressionsverhalten eingesetzt (siehe Pkt. 3.5 ff).

### 2.2.6. Überprüfung einer verwendeten Mutante

Für die Überprüfung einer Mutante (siehe Pkt. 2.1.1) wurde die Mutation in der genomischen DNA durch PCR (siehe Pkt 2.2.3) mit spezifischen Oligonukleotidpaaren nachgewiesen. Hierzu wurden die PCR-Bedingungen so angepasst, dass Wildtypen und Mutanten anhand der Amplifikate eindeutig unterschieden werden konnten (siehe Pkt. 3.1.2). Die Optimierung der PCR-Bedingungen erfolgte vornehmlich durch die Veränderung der Annealingtemperatur des PCR-Zyklus. War die Erhöhung der Annealingtemperatur zur Unterscheidung zwischen Wildtyp und Mutante nicht ausreichend, wurde zusätzlich die  $MgCl_2$  Konzentration des Reaktionsgemisches erniedrigt (Cline *et al.* 1996). Die Optimierung erfolgte unter Nutzung eines PCR-Gerätes mit einstellbaren Temperaturgradienten im Reaktionsblock.

Nach der Isolierung der genomischen DNA aus den Pflanzen (Pkt. 2.2.2.2) wurden die Proben auf ihre Verwendbarkeit in der PCR mit dem Standardprotokoll und dem Oligonukleotidpaar (sgfor/sgrev,  $T_a = 58^\circ C$ ) eines im Arabidopsisgenom singulär enthaltenen Genes sowie anschließender Kontrolle auf einem 1,0 %igem Agarosegel überprüft. Anschließend erfolgte die PCR unter den optimierten Bedingungen mit dem Wildtyp- und dem Mutantenoligonukleotidpaar, sodass in der PCR-Reaktion für die jeweilige genomische DNA mit dem zugehörigen Oligonukleotidpaar ein Fragment entstand (= Positivkontrolle, z. B. Wildtyp-Oligonukleotide mit genomischer DNA der Wildtypen bzw. Mutantenoligonukleotide mit genomischer DNA der Mutanten). Hingegen durfte die kreuzweise Benutzung der Oligonukleotide keine Fragmente in der PCR ergeben (= Negativkontrolle, z. B. Wildtyp-Oligonukleotide mit genomischer DNA der Mutanten bzw. Mutantenoligonukleotide mit genomischer DNA der Wildtypen).

Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte aufgrund der erwarteten geringen Längen der PCR-Fragmente mit 1,5 %igen Agarosegelen.

### 3. Ergebnisse

Während der frühen Phase der Photomorphogenese sind eine Reihe von pflanzenspezifischen Phänomenen wie Ergrünung, Inhibierung der Hypokotylverlängerung und Öffnung der Keimblätter und des Hypokotylhakens zu beobachten. Für die Lichtwahrnehmung sind Photorezeptoren verantwortlich (siehe Pkt. 1). Die Signalweitergabe bzw. -verarbeitung zur Steuerung der durch Licht regulierten morphogenetischen Veränderungen ist noch ungeklärt. Das gilt auch für die Genexpression während der frühen Photomorphogenese. Bisherige Untersuchungen erfolgten nur mit einigen wenigen ausgewählten, lichtabhängig regulierten Genen (Apel 1981, Tobin und Silverthorne 1985, Leutwiler *et al.* 1986, Bruce *et al.* 1989, Batschauer *et al.* 1991, Orozco und Ogren 1993; siehe auch Pkt. 1).

Um die frühe Photomorphogenese näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Pflanzen mit Defekten in der Photomorphogenese (photomorphogenetische Mutanten) mittels multiparalleler Expressionsanalyse analysiert. Als Untersuchungsobjekt wurde Arabidopsis gewählt, weil u. a. mit den Photorezeptormutanten entsprechendes Pflanzenmaterial und für die Erstellung von cDNA-Arrays eine große Zahl von cDNA-Klonen vom Arabidopsis-Ressourcenzentrum in Ohio bezogen werden konnten.

Zunächst wurde das verwendete Pflanzenmaterial auf Phänotyp und Vorhandensein der beschriebenen Mutation überprüft. Anschließend wurden potenziell lichtregulierte Gene für die Herstellung von cDNA-Arrays ausgewählt sowie die Methode auf biologische und technische Charakteristika getestet. Die Etablierung der Methode war Voraussetzung für die Untersuchungen zur Genexpression. Für das Studium der frühen Photomorphogenese wurden etiolierte Keimlinge von Wildtypen und photomorphogenetischen Mutanten belichtet und anschließend deren Genexpression mit Hilfe der hergestellten cDNA-Arrays analysiert.

#### 3.1. Verifizierung des verwendeten Pflanzenmaterials

Die Auswahl der Pflanzen erfolgte nach ihren Defekten in der Photomorphogenese (siehe Pkt. 1). Insbesondere Pflanzen mit Mutationen in Photorezeptorgenen waren von Interesse. Entsprechend wurden Mutanten der Rotlichtrezeptorgene *phyA* (*phyA-201*), *phyB* (*phyB-5 = hy3*), *phyAB* und der PHYB-überexprimierenden Linie (35S::*PHYB*; siehe Pkt. 1 und 2.1.1), sowie der Blaulichtrezeptorgene *cry1* (*hy4*) und *cry2* (*fha-1*; siehe Pkt. 1 und 2.1.1) ausgesucht und vom Arabidopsis-Ressourcenzentrum in Ohio bezogen. Zum Vergleich der Photomorphy-

genese in diesen Pflanzen wurde die Mutante *det1-1 (det1)* aufgrund ihres schon in Dunkelheit lichtgewachsenen Phänotyps (kurzes Hypokotyl; siehe auch 3.1.1) mit in die Analyse einbezogen. Als Basis für die Untersuchung wurden die Wildtypen Ler-0, Col-0 sowie Ws-2 gewählt. Der Wildtyp Ws-2 ist eine Besonderheit, weil der in der Natur vorkommende Wildtyp gleichzeitig auch eine *PHYD*-Mutante ist (Aukerman *et al.* 1997). Zur Verifizierung wurden die Keimlinge der Pflanzen phänotypisch und genotypisch charakterisiert.

### 3.1.1. Phänotypische Charakterisierung

Neben anderen Merkmalen sind die Keimlinge einiger Mutanten phänotypisch durch eine veränderte Hypokotyllänge bei Belichtung charakterisiert. Die Anzucht für die phänotypische Charakterisierung erfolgte auf MS-Medium für 5 Tage. In Abb. 6 sind etiolierte und lichtgewachsene Keimlinge (kontinuierliches Weißlicht) der ausgewählten Pflanzen dargestellt. Die etiolierten Keimlinge besitzen mit Ausnahme der Mutante *det1* ein langes Hypokotyl (Abb. 6). Dagegen ist für die lichtgewachsenen Keimlingen ein kurzes Hypokotyl charakteristisch. Das Hypokotyl der Photorezeptormutanten ist im Vergleich zu den Wildtypen bei Anzucht im Licht verlängert (Koornneef *et al.* 1980). Auffällig länger, jedoch deutlich kürzer als das etioliert gewachsener Keimlinge, ist das Hypokotyl der lichtgewachsenen Phytochromdoppelmutante *phyAB* (Abb. 6).

Diese Beobachtungen wurden durch Messung der Hypokotyllänge von jeweils 50 Keimlingen bestätigt (Abb. 7). Die Hypokotyllängen etiolierter Keimlinge der photomorphogenetischen Mutanten sind jenen der Wildtypen Col-0, Ler-0 und Ws-2 ähnlich. Das entspricht den Erwartungen, denn der Phänotyp wird bei spezifischer Belichtung ausgeprägt (Koornneef *et al.* 1980). Allerdings zeigen die Mutanten *phyB* und *cry2* kürzere Hypokotyle etioliert gewachsener Keimlinge als die Wildtypen (Abb. 7). Wie beschrieben (Chory *et al.* 1989), entspricht der Phänotyp etioliert gewachsener Keimlinge der Mutante *det1* dem Phänotyp lichtgewachsener Keimlinge der Wildtypen. Die in kontinuierlichem Weißlicht gewachsenen Keimlinge sind durch kurze Hypokotyle gekennzeichnet (Abb. 7). Im Vergleich zur Hypokotyllänge der Wildtypen sind die Hypokotyle der Mutanten *phyB*, *phyAB* und *cry1* wie erwartet verlängert (Abb. 7, Koornneef *et al.* 1980, Reed *et al.* 1994). Der Phänotyp der Mutante *phyA* entspricht bei Weißlichtbestrahlung dem der Wildtypen und somit ebenfalls den Erwartungen (Abb. 7, Nagatani *et al.* 1993, Whitelam *et al.* 1993). Veränderungen der Hypokotyllänge unter spezifischen Lichtbedingungen wurden nicht getestet.

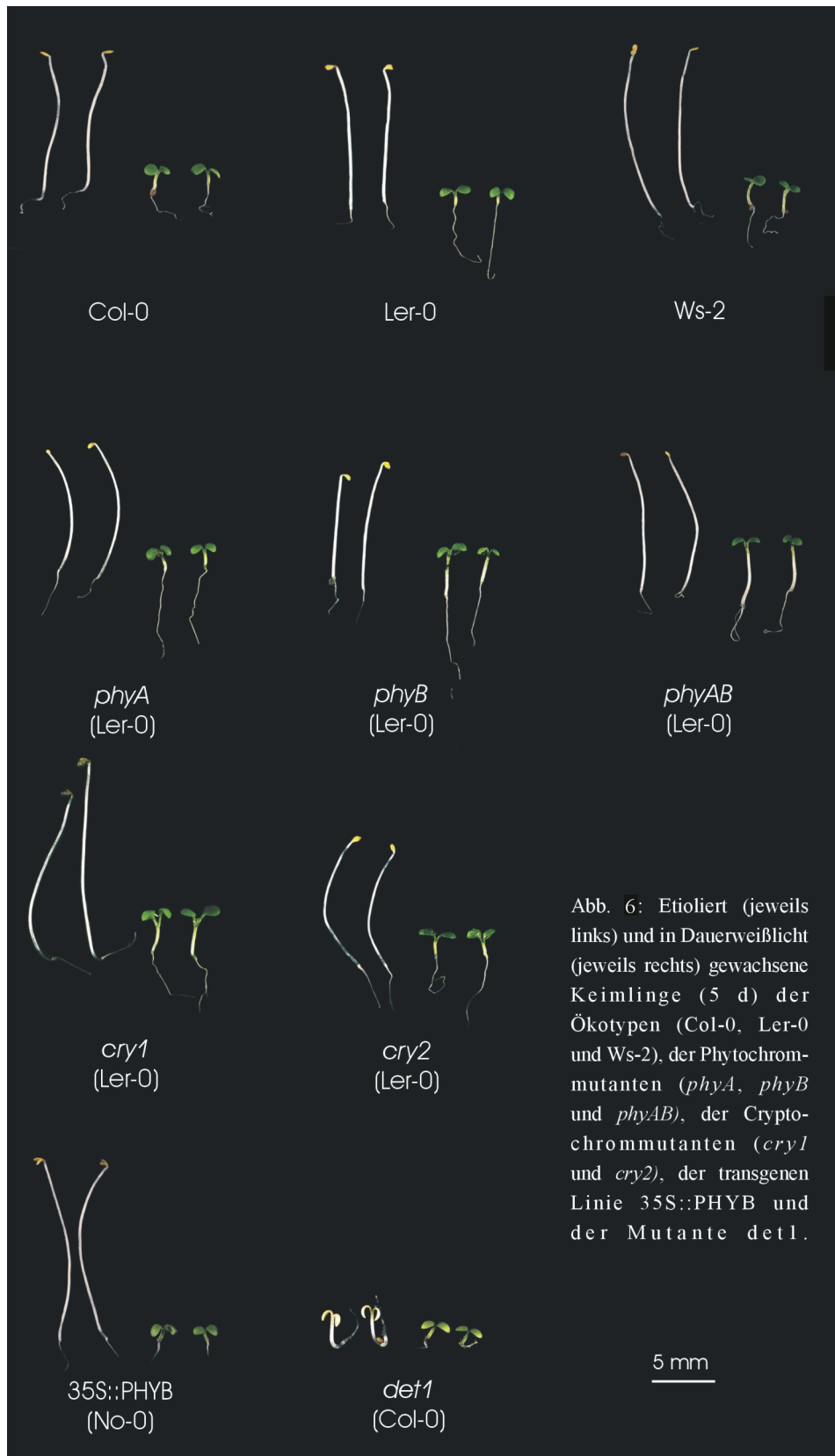


Abb. 6: Etioliert (jeweils links) und in Dauerweißlicht (jeweils rechts) gewachsene Keimlinge (5 d) der Ökotypen (Col-0, Ler-0 und Ws-2), der Phytochrommutanten (*phyA*, *phyB* und *phyAB*), der Cryptochrommutanten (*cry1* und *cry2*), der transgenen Linie 35S::PHYB und der Mutante *det1*.



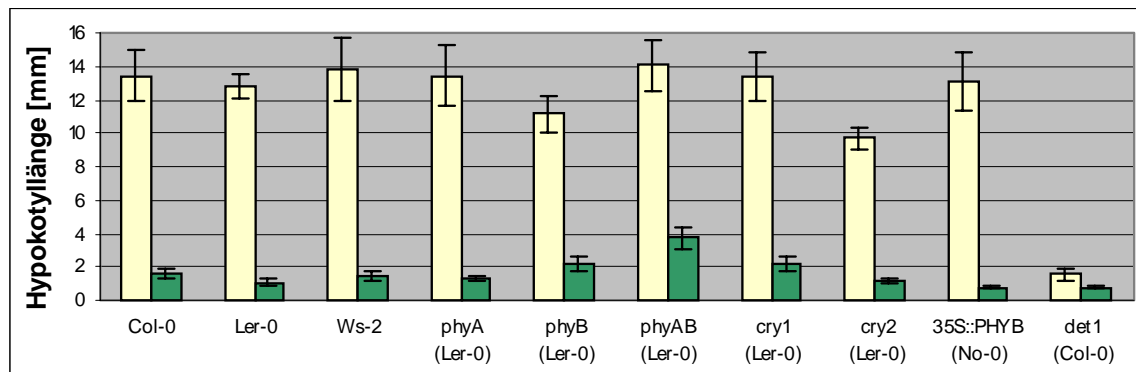


Abb. 7: Hypokotyllängen etioliert (hellgelbe Balken) und in kontinuierlichem Weißlicht (grüne Balken) gewachsener Keimlinge (5 d) der Wildtypen Col-0, Ler-0 und Ws-2, der Photorezeptormutanten *phyA*, *phyB*, *phyAB*, *cry1* und *cry2*, der PHYB-überexprimierenden transgenen Linie und der Mutante *det1*. In Klammer geschriebene Wildtypen entsprechen dem jeweiligen Genotyp der Mutanten.

### 3.1.2. Genotypische Charakterisierung

Einige Mutanten wie z.B. *phyA* und *cry2* weisen keinen Hypokotylphänotyp bei Bestrahlung mit Weißlicht auf (siehe Abb. 6 und 7). Auch ist der Phänotyp allein für den Nachweis einer verwendeten Mutante nicht ausreichend, da für die defekten Gene eine Reihe weiterer Allele existieren, die einen ähnlichen Phänotyp ausprägen (Fankhauser und Chory 1997, Hudson 2000). Aus diesem Grund erfolgte der Nachweis der Mutation mittels PCR (siehe Pkt. 2.2.6) unter Verwendung genomischer DNA der Wildtypen bzw. Mutanten mit spezifischen Oligonukleotiden (Tab.2, Tab. 4). Zunächst wurden Menge und Qualität der genomischen DNA in einer Kontroll-PCR mit dem Primerpaar *sgfor/sgrev* (siehe Pkt. 2.1.4) überprüft. Für den Nachweis der Mutation wurden die jeweiligen PCR-Bedingungen entsprechend den Oligonukleotidpaaren für Annealingtemperatur und  $MgCl_2$ -Konzentration optimiert, um eindeutig zwischen Wildtyp und Mutante unterscheiden zu können. Die angewandten PCR-Bedingungen sind in Tab. 4 aufgeführt. Abb. 8 zeigt den Nachweis der Mutationen für *PHYA* und *PHYB* an den Beispielen von Doppelmutante *phyAB* und Einzelmutanten *phyA* und *phyB*. Der direkte Nachweis der Mutation auf Basis der genomischen Sequenz konnte für die verwendeten Phytochromrezeptormutanten *phyA*, *phyB*, und Ws-2 (*phyD*), für die Phytochromdoppelmutante *phyAB* und für die Cryptochromrezeptormutanten *cry1* und *cry2* erbracht werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tab. 4: Übersicht zum Nachweis der Mutation auf der Basis der jeweiligen genomischen DNA. Dargestellt sind verwendete Oligonukleotidpaare (Sequenzen siehe Tab. 2) und die gegenüber dem Standard-PCR-Protokoll veränderten PCR-Bedingungen (Annealingtemperatur und  $MgCl_2$ -Konzentration).

Mutanten	Oligonukleotidpaare Annealingtemperatur Endkonzentration $MgCl_2$	
	für Wildtyp	für Mutation
<i>phyA201</i>	<b>phyA1/phyA3</b> 67°C 1,5 mM $MgCl_2$	<b>phyA2/phyA3</b> 67°C 1,5 mM $MgCl_2$
<i>phyB5</i>	<b>phyB1/phyB3</b> 64°C 1,0 mM $MgCl_2$	<b>phyB2/phyB3</b> 70°C 2,0 mM $MgCl_2$
Ws-2 ( <i>phyD</i> )	<b>phyD1/phyD3</b> 62°C 2,0 mM $MgCl_2$	<b>phyD2/phyD3</b> 62°C 2,0 mM $MgCl_2$
<i>cry1</i>	<b>cry1A/cry1C</b> 62°C 2,0 mM $MgCl_2$	
<i>cry2</i>	<b>cry2A/cry2C</b> 65°C 1,0 mM $MgCl_2$	<b>cry2B/cry2C</b> 69°C 2,0 mM $MgCl_2$

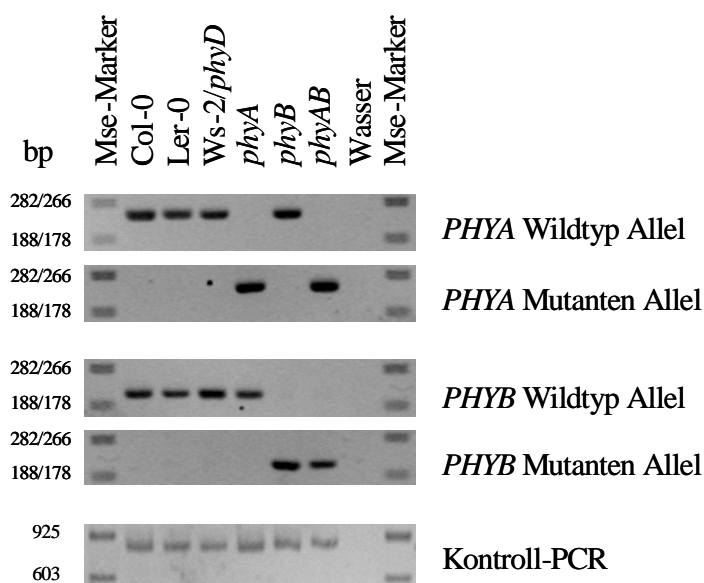


Abb. 8: Nachweis der Mutation in *PHYA* und *PHYB* in den *phyA*- und *phyB*-Einzelmutanten sowie der *phyAB*-Doppelmutante. Der Nachweis erfolgte per PCR mit den spezifischen Oligonukleotiden *phyA1/3* bzw. *phyB1/3* für die Wildtyp Allele (siehe Tab. 1 und 3) und mit *phyA2/3* bzw. *phyB2/3* für die Mutation (siehe Tab. 1 und 3) an genomischer DNA der Wildtypen Col-0, Ler-0 und Ws-2, den Mutanten *phyA*, *phyB* und *phyAB*. Kontroll-PCR mit dem Primerpaar *sgfor/sgrev* wurde die Menge und Qualität der in der PCR eingesetzten genomischen DNA getestet.

### 3.2. Auswahl kernkodierter Gene potenziell plastidärer Proteine und zugehöriger cDNA-Klone

Für die Herstellung der cDNA-Arrays stand die cDNA-Kollektion des Arabidopsis-Ressourcenzentrums in Ohio als Quelle für cDNA-Klone zur Verfügung. Diese Sammlung beinhaltete im Oktober 1998 ca. 37.000 Klone. Interessierende Klone konnten vom Arabidopsis-Ressourcenzentrum bezogen werden. Eine Reihe von Genen waren mehrfach als cDNA-Fragmente in der Kollektion vertreten, weshalb eine um diese Redundanz reduzierte Kollektion vom Arabidopsis-Ressourcenzentrum erstellt wurde. Diese redundanzreduzierte Kollektion von ca. 12.000 Klonen liegt als Kopie im IPK Gatersleben vor und wurde ebenfalls als Quelle für klonierte cDNA-Fragmente genutzt.

Da Untersuchungen zur Genexpression während der frühen Photomorphogenese das Ziel der vorliegenden Arbeit waren, sollten möglichst viele lichtregulierte Gene auf dem cDNA-Array repräsentiert sein. Hierfür schienen Gene des Photosyntheseapparates und andere nukleäre Gene plastidenlokalisierter Proteine besonders geeignet, weil die Umwandlung von Etioplasten zu Chloroplasten und der damit verbundene Aufbau des Photosyntheseapparates frühe Ereignisse der Photomorphogenese darstellen (Alberts *et al.* 1990). Die Auswahl der Gene bzw. der cDNA-Klone erfolgte auf drei Wegen:

(a) Zunächst wurden alle bekannten Proteine des Photosyntheseapparates der Thylakoidmembran einschließlich ihrer Sequenz aus der Proteindatenbank "Swissprot" herausgesucht. Nachfolgend wurden die Proteinsequenzen dieser Gene mit den Nukleotidsequenzen bereits klonierter cDNA-Fragmente (EST's) von Arabidopsis verglichen (Datenbank "Genbank" EST-Sektion, "tblastn" in "HUSAR") und die identifizierten Klone ("score" von "tblastn" > 300) der entsprechenden Gene vom Arabidopsis-Ressourcenzentrum direkt bezogen.

(b) Weitere Plastidenproteine wurden durch den Vergleich von Plastidengenomen photosynthetisch aktiver Organismen identifiziert (Martin *et al.* 1998). Der Vergleich von Martin *et al.* (1998) zeigte, dass im Gegensatz zu niederen Pflanzen und Algen eine Reihe von Genen im Plastidengenom höherer Pflanzen fehlen. Ein Teil der Gene konnte im Kerngenom von Landpflanzen mit entsprechender Transitpeptidsequenz wiedergefunden werden (siehe auch Stoebe *et al.* 1998). Die während der Evolution in den Kern transferierten Gene dienten wiederum in der Datenbanksuche zur Identifizierung von annotierten Genen von Arabidopsis ("blastp" in "HUSAR", Datenbank TrEMBL). Die gefundenen Gene wurden zuerst auf eine N-terminale Verlängerung gegenüber dem plastidären Gen analysiert. Anschließend wurde mit dem Programm "ChloroP" (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>, Emanuelsson *et al.*

1999) überprüft, ob es sich um ein plastidäres Transitpeptid handelt. Mit der Nukleotidsequenz von Genen mit plastidärem Transitpeptid wurde wiederum nach entsprechenden klonierten cDNA-Fragmenten durch Datenbankvergleich ("blastn" in HUSAR) gesucht und diese ebenfalls von Arabidopsis-Ressourcenzentrum direkt bezogen.

(c) Die Transitpeptidvorhersage wurde auch genutzt, um weitere potenziell kernkodierte plastidäre Proteine zu identifizieren. Hierfür wurden die Nukleotidsequenzen für Leserahmen der annotierten Gene aus den verfügbaren genomischen Sequenzen einzeln sequenzierter BAC-Klone (Datenbank EMBL, Oktober 1998) extrahiert, translatiert und 150 N-terminale Aminosäuren für die Transitpeptidvorhersage mit "ChloroP" eingesetzt. Für Gene mit vorhergesagtem Transitpeptid wurden alle annotierten cDNA-Klone aus der Datenbank (s. o.) herausgesucht, mit der Liste der zur Verfügung stehenden 12.000 cDNA-Klone umfassenden redundanzreduzierten Kollektion des Arabidopsis-Ressourcenzentrums verglichen und 1.228 cDNA-Klone selektiert.

Die Verwendung unterschiedlicher Ansätze führte teilweise zur Auswahl gleicher Klone bzw. zur Auswahl unterschiedlicher cDNA-Fragmente desselben Genes. Diese Redundanz konnte durch Nutzung der Informationen über die Gruppierung von cDNA-Fragmenten (TIGR Datenbank) verringert werden. Für die cDNA-Array-Herstellung wurde derjenige cDNA-Klon aus einer Gruppe gewählt, dessen Sequenz im Vergleich (s. o.) mit der Nukleotidsequenz des betrachteten Genes die höchste Identität aufwies. Weil Wiederholungen von Genen bzw. cDNA-Fragmenten auf der Membran möglicherweise eine interne Hybridisierungskontrolle darstellen, wurde ein Teil der redundanten Gene/cDNA-Fragmente in der Auswahl belassen. Letztlich wurden 1.068 cDNA-Klone für kernlokalisierte Gene potenziell plastidärer Proteine ausgewählt und in neue Mikrotiterplatten umsortiert (siehe Pkt. 2.2.4). Zur Kontrolle ihrer Identität und der Übereinstimmung mit der Datenbank wurde ein Teil der cDNA-Klone beidseitig (an-)sequenziert. Zunächst erfolgte die Überprüfung der Sequenz eines Klonen mit der annotierten Sequenz in der Datenbank durch das Programm "Bestfit" in "HUSAR". Ein cDNA-Fragment mußte im Vergleich zu seiner annotierten Sequenz eine Identität von  $\geq 90\%$  über eine Sequenzlänge von mindestens 100 bp aufweisen, um als richtig zu gelten. In einem zweitem Datenbankvergleich ("blastn" in "HUSAR") wurde die Zuordnung des cDNA-Fragmentes zu einem bestimmten Arabidopsisgen ("score" von "blastn"  $> 300$ ) überprüft.

Aus den direkt im Arabidopsis-Ressourcenzentrum bestellten cDNA-Klonen für kernkodierte Proteine des Photosyntheseapparates der Thylakoidmembran (a) und in Arabidopsis kernlokalisierte Gene von Plastidengenomen anderer photosynthetisch aktiver Organismen (b)

entstand zusammengefasst ein Satz von 170 cDNA-Klonen kernkodierter potenziell plastidärer Proteine. Sequenzierung und Datenbankvergleich zeigten, dass 26 der bestellten Klone (15 %) nicht das erwartete cDNA-Fragment enthielten. Von den 1.068 cDNA-Fragmenten der redundanzreduzierten cDNA-Kollektion wurden 268 (25 %) überprüft. 62 cDNA-Fragmente entsprachen nicht ihrer Zuordnung in der Datenbank und wurden aufgrund der Überprüfung anderen Genen zugeordnet. Folglich war die redundanzreduzierte cDNA-Kollektion mit einer Fehlerrate von 23 % belastet. Die hohe Fehlerrate wurde auch von anderen Nutzern der Kopie dieser redundanzreduzierten cDNA-Kollektion festgestellt (B. Weisshaar, T. Altmann; persönliche Mitteilung). Aufgrund der hohen Fehlerrate wurden fast alle in die Auswertung einbezogenen cDNA-Fragmente durch Sequenzierung und Datenbankvergleich verifiziert (siehe Pkt. 3.5.2.1, 3.5.2.2 und 3.5.3).

Ein Teil der Gene/cDNA-Fragmente, der doppelt oder mehrfach auf der Membran repräsentiert sind, sollte ursprünglich als interne Hybridisierungskontrolle dienen (s. o.), weil für jedes einzelne cDNA-Fragment eine vergleichbare Intensität des Hybridisierungssignals zu erwarten ist. Da 75 % der 1068 cDNA-Klone nicht per Sequenzanalyse und Datenbankvergleich überprüft wurden, kann aufgrund der Nichtübereinstimmung von cDNA-Fragment und vorgegebener Sequenz in 23 % der überprüften Fälle die Wiederholung von Genen/cDNA-Fragmenten auf der Membran nicht als interne Kontrolle der Hybridisierungsergebnisse verwendet werden.

Die in der Arbeit verwendete Zuordnung von Genen bzw. Funktionen beruht auf dem derzeitigen Vergleich der Sequenzen (WUblastn2, Perlscript) mit den Sequenzen der annotierten Gene von Arabidopsis der Datenbank MAtdB ([www.gsf.mips.de](http://www.gsf.mips.de), Version 111202). Dieser Vergleich erfolgte mit institutseigenen "PERL" Skripten, indem zunächst die annotierten Gene von Arabidopsis einschließlich ihrer Sequenzen aus MatDB entnommen und in eine Datenbank überführt wurden. Anschließend erfolgte der Vergleich von Nukleotidsequenzen der cDNA-Fragmente mit den Sequenzen der neu angelegten Datenbank und die Umwandlung der Ergebnisdatei in ein für "Excel" lesbares Dateiformat.

Zusätzlich zu den gewählten cDNA-Fragmenten potenziell plastidärer Proteine wurden 243 cDNA-Fragmente anderer Arbeitsgruppen (siehe Anhang: Genliste.xls) zur Herstellung der cDNA-Arrays verwendet.

### 3.3. Herstellung und Verwendungszweck verschiedener cDNA-Arrays

Aufgrund der Zweiteilung der Arbeit in Etablierung der cDNA-Array-Methode (siehe Pkt. 3.4) und Studium der frühen Photomorphogenese (siehe Pkt. 3.5ff) wurden cDNA-Arrays mit einer unterschiedlichen Anzahl von cDNA-Fragmenten hergestellt. Die Amplifikation der cDNA-Insertionen erfolgte jeweils durch Kolonie-PCR mit den plasmidspezifischen Oligonukleotiden “forLA” und “revLA” im präparativen Maßstab (siehe Pkt. 2.2.5.1).

Für die Durchführung von ersten Testversuchen zur Herstellung von cDNA-Arrays (Daten nicht gezeigt) und für Kreuzhybridisierungsexperimente wurden 44 cDNA-Fragmente, insbesondere Gene des Photosyntheseapparates (siehe Pkt. 3.2 (a)) ausgewählt, da eine Reihe dieser Gene mehrfach im Arabidopsisgenom enthalten sind. Diese 44 cDNA-Fragmente entsprachen nach Sequenzierung und Datenbank-Analyse (s. o.) 41 Genen und wurden auf die Membranen der Serie “1A” übertragen (Tab. 5, siehe Anhang: genliste.xls).

Tab. 5: Belegung der cDNA-Arrays

cDNA-Array	“1A”	“2A”	“2B”
Spotschema	3 x 3	3 x 3	3 x 3
Anzahl Klone	44	1438	1514
Anzahl Gene	41	1047	1188
Wiederholungen von			
• Genen	3	264	238
• cDNA-Fragmenten	6	655	564
Klone anderer Arbeitsgruppen	0	89	243

Mit der Membranserie “2A” (Tab. 5) wurden Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Methode und zur Genexpression durchgeführt. Für diese Membranserie wurden die zuvor gewählten cDNA-Fragmente der kernkodierten Gene von potenziell plastidären Proteinen verwendet (siehe Pkt. 3.2 (a - c)) sowie 89 cDNA-Fragmente anderer Arbeitsgruppen. Insgesamt enthält die Membran “2A” 1.438 cDNA-Fragmente. Diese entsprechen

nach derzeitigem Vergleich mit der Datenbank 1.047 Genen, da 264 Gene wiederholt in 655 cDNA-Fragmenten auf der Membran enthalten sind (Tab. 5, siehe Anhang: genliste.xls). 187 der 264 Gene (13 % des Arrays) sind zweifach und weitere 77 Gene (5 % des Arrays) mehrfach wiederholt enthalten (siehe Anhang: genliste.xls).

Um weitere cDNA-Fragmente anderer Arbeitsgruppen mit in die Expressionsanalyse aufzunehmen und die Wiederholung von cDNA-Fragmenten bzw. Genen der Membran "2A" zu reduzieren (siehe Pkt. 3.2), wurde eine Membranserie "2B" hergestellt. Diese Membranserie enthielt den zuvor ausgewählten Gensatz (siehe Pkt. 3.2 (a - c)) und zusätzlich wurden 243 cDNA-Fragmente anderer Arbeitsgruppen verwendet, sodass die Membran "2B" insgesamt 1.514 cDNA-Fragmente enthält. Nach derzeitigem Vergleich mit der Datenbank (MIPS) sind 238 Gene in 564 cDNA-Fragmenten wiederholt. 173 der 238 Gene (11 % des Arrays) sind doppelt und 65 Gene (4 %) mehrfach enthalten. Folglich besteht der einfache Gensatz ohne Wiederholungen auf der Membran "2B" aus 1.188 Genen (Tab. 5, siehe Anhang: genliste.xls). Die Membranserie "2B" wurde in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich zur Analyse der Genexpression verwendet.

Somit standen drei Membranserien für die Untersuchungen zur Verfügung. Die Membranserie "1A" wurde für Untersuchungen zur Kreuzhybridisierung und die Membranserie "2A" für Untersuchungen zur cDNA-Array-Methode genutzt. Die Membranserie "2A" wurde auch zur Analyse der Genexpression in Lichtpulseexperimenten eingesetzt, während die Membranserie "2B" für die Analyse der Genexpression von etiolierten Keimlingen bei Weißlichtbestrahlung benutzt wurde.

#### **3.4. Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Technik**

Die cDNA-Array-Technik ermöglicht eine parallele mRNA-Expressionsanalyse vieler verschiedener Gene in einem Experiment (siehe Pkt. 1.5 und 2.5). Um die Genexpression verschiedener Pflanzen oder verschiedener Zustände von Pflanzen miteinander vergleichen zu können, sind mehrere cDNA-Array-Experimente notwendig. Entscheidend für die Vergleichbarkeit und Interpretierbarkeit der Experimente sind reproduzierbare Signalwerte.

Die Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Technik ist sowohl von biologischen als auch technischen Parametern abhängig. Abweichungen können in den unterschiedlichen Teilprozessen der cDNA-Array-Technik (siehe Pkt. 2.5), z. B. bei der Herstellung der Membranen, der Sonden, während der Hybridisierung, in der Analyse (Detektion von Hybridisie-

rungssignalen) und während der Anzucht des biologischen Materiales entstehen. Aufgrund der teilweise komplexen Prozesse wurde versucht, die Experimente in ihrer Gesamtheit auf ihre Reproduzierbarkeit zu überprüfen.

Für die Untersuchung wurden 4 Proben etiolierter Keimlinge des Wildtyps Ler-0 für 5 d auf MS-Medium unter gleichen Bedingungen voneinander unabhängig aufgezogen (siehe Pkt. 2.2.1). Von jeder Probe wurde eine cDNA-Sonde hergestellt und die Sonden nacheinander auf ein und dieselbe Membran der Serie "2A" hybridisiert. Vor jedem weiteren Experiment wurden die hybridisierten cDNA-Moleküle von der Membran entfernt (siehe Pkt. 2.2.5.4). Nach Aufzeichnung und Erfassung der Hybridisierungssignale mit Hilfe des Phosphorimagers und des Programms "ArrayVision" wurden die Signalintensitäten vor der weiteren Analyse normalisiert (siehe Pkt. 2.2.5). Anschließend wurden von diesen Experimenten Hybridisierungssignale und Hintergrundwerte, Doppelspotsignalintensitäten als interne Hybridisierungskontrolle, mögliche Überstrahlungseffekte benachbarter Hybridisierungssignale und die Reproduzierbarkeit analysiert.

### 3.4.1. Unterscheidung von Signalintensitäten und Hintergrundwerten

Die vergleichende Analyse von Signalintensitäten und Hintergrundwerten sollte Aufschluss über die Zuverlässigkeit von Hybridisierungssignalen geben. Zunächst wurde eine Häufigkeitsverteilung für die gemessenen Hybridisierungswerte der Signalintensitäten und der Hintergrundwerte anhand der ersten Mittelwertzentrierung aller Gene (siehe Pkt. 2.2.5.5) der 4 Experimente ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 9 dargestellt.

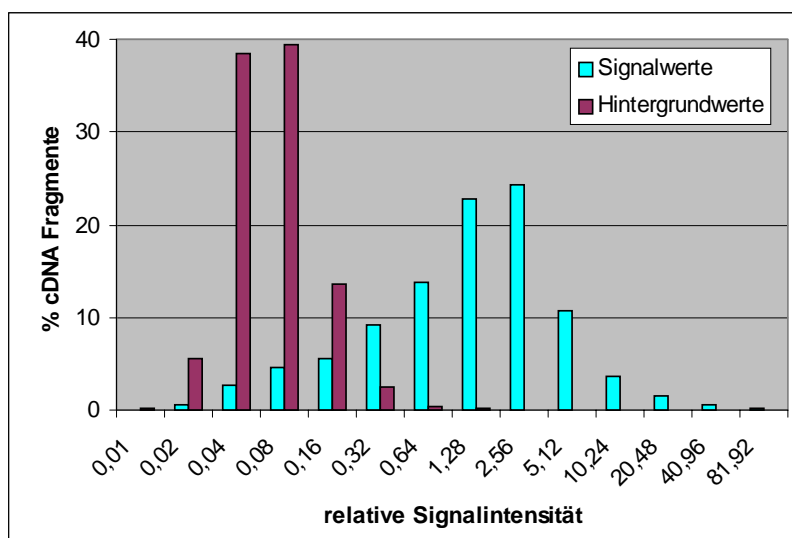


Abb. 9: Häufigkeitsverteilung der relativen Signalintensitäten (blau) und Hintergrundwerte (rot) in 4 Experimenten mit etiolierten Keimlingen (5 d) des Wildtyps Ler-0. Der prozentuale Anteil der jeweiligen cDNA-Fragmente wurde in Abhängigkeit von den relativen Signalintensitäten in logarithmischen Intervallen ( $\log_2$ ) dargestellt. Die angegebenen Signalintensitäten entsprechen der jeweiligen Obergrenze des Intervalls.



Normalisierte Signalwerte wurden im Bereich von 0,01 bis 82 bestimmt, während normalisierte Hintergrundwerte im Bereich von 0,01 bis 0,32 für 99,5 % der cDNA-Fragmente ermittelt wurden (Abb. 9, siehe Anlage: Ler-0\_repro.xls). Das Maximum der Häufigkeitsverteilung für Signalwerte wurde im Intervall von 1,28 bis 2,56 bestimmt, für Hintergrundwerte im Intervall von 0,04 bis 0,08. Folglich waren die Signalwerte durchschnittlich 16- bis 32fach (Maxima der Verteilungsfunktionen) höher als die Hintergrundwerte.

In den 4 Experimenten lagen 4.540 Signalwerte (79 %) über den höchsten Hintergrundwerten von 0,32. Im Messbereich von 0,01 bis 0,32 wurden sowohl Signalwerte als auch Hintergrundwerte ermittelt (Abb. 9). Ein Hybridisierungssignal ist von dem umgebenden Hintergrund kaum zu unterscheiden, wenn beide demselben Intervall zugehören. Im direkten Vergleich zwischen Hybridisierungssignal und zugehörigem Hintergrundwert waren in allen 4 Experimenten für 5.520 Fragmente (96 %) die Signalwerte höher als ihr zugehöriger Hintergrundwert.

### **3.4.2. Doppelpot eine interne Kontrolle**

Von jedem cDNA-Fragment wurden zwei Spots auf die Membran aufgetragen (Doppelpot, siehe Pkt. 2.2.5.2). Bei gleichmäßigem Transfer des cDNA-Fragmentes auf die Membran und bei gleichmäßiger Hybridisierung sollten die beiden zusammengehörigen Spots desselben cDNA-Fragmentes in einem Experiment gleiche Signalwerte aufweisen. Insofern dient der Doppelpot als interne Kontrolle für die Membranherstellung und zur Erhöhung der Datensicherheit der Hybridisierungsergebnisse.

Zur Überprüfung wurde das Verhältnis der Signalintensitäten der Doppelpots (Doppelpotverhältnis) in den 4 Experimenten mit etiolierten Keimlingen (5 d) des Wildtyps Ler-0 als Quotient berechnet. Um Quotienten kleiner 1 zu vermeiden, wurde der niedrigere Signalwert jeweils als Divisor eingesetzt. In Abb. 10 wurden die Doppelpotverhältnisse als Häufigkeitsverteilung prozentual in Abhängigkeit von der Gesamtanzahl der in den 4 Experimenten hybridisierten cDNA-Fragmente dargestellt (siehe Anlage: Ler-0\_repro.xls). Das Intervall 1,0 bis 1,1 entspricht einer maximalen Abweichung der Signalintensitäten der Doppelpots um 10 % voneinander. Diese Abweichung wurde für 43 % (2.458) der cDNA-Fragmente ermittelt. Für 68 % (3.898) der cDNA-Fragmente war das Doppelpotverhältnis kleiner 1,2 und für 90 % (5.196) kleiner 1,5. Ein Doppelpotverhältnis von 1,4 bis 1,5 war noch für 3,9 % (223) der cDNA-Fragmente zu verzeichnen. Lediglich 3,2 % (183) der cDNA-Fragmente

wiesen einen Faktor größer 2 auf (Abb. 10). Die Abweichungen vom theoretisch zu erwartenden Doppelspotverhältnis von 1,0 können u. a. auf den Spotprozess, d.h. auf eine nicht zu kontrollierende Übertragung von unterschiedlichen Fragmentmengen während der cDNA-Array-Herstellung zurückzuführen sein.

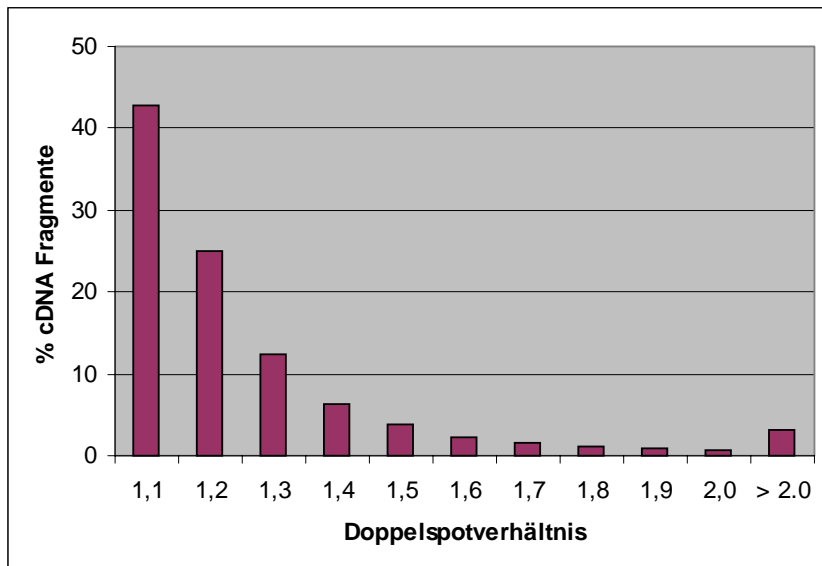


Abb. 10: Prozentuale Häufigkeit der Doppelspotverhältnisse der cDNA-Fragmente (siehe Tab. 3) in den 4 Experimenten mit etiolierten Keimlingen (5 d) des Wildtyps Ler-0. Die angegebenen Doppelspotverhältnisse entsprechen der jeweiligen Obergrenze des Intervalls.

Eine weitere Ursache für die Abweichung könnte in der automatischen Spotdetektion mit dem Programm "ArrayVision" bestehen, indem Hybridisierungssignale ungenau lokalisiert wurden. Um diesen Sachverhalt zu testen, wurde der Vorgang der automatischen Spotdetektion an einer der hybridisierten Membranen 10fach wiederholt. Zur Auswertung wurde die Standardabweichung prozentual in Abhängigkeit vom Signalmittelwert bestimmt (Abb. 11A). Die durchschnittliche Standardabweichung für die 10fache Spotdetektion eines Experimentes ist 11 %. Dem Diagramm (Abb. 11A) ist zu entnehmen, dass niedrige Signalwerte höhere Standardabweichungen aufweisen. Bei Hybridisierungssignalen mit niedrigen Signalwerten entsprechen die Signalintensitäten in etwa den Hintergrundwerten. Um die Vermutung des Auftretens höherer Standardabweichungen bei niedrigen Signalwerten und somit höherer Doppelspotverhältnisse zu untermauern, wurden die Doppelspotverhältnisse oberhalb (hellblaue Balken) bzw. unterhalb (dunkelblaue Balken) von 1,5 in der Häufigkeitsverteilung der Signalintensitäten der 4 Experimente in Abb. 11B unterschieden. Demnach sind oberhalb einer relativen Signalintensität von 0,64 fast keine Doppelspotverhältnisse größer 1,5 zu verzeichnen. Dagegen sind mit abnehmender relativer Signalintensität zunehmend Signalintensitäten mit Doppelspotverhältnissen oberhalb von 1,5 enthalten. Zur Verdeutlichung wurde innerhalb jedes Intervalls der prozentuale Anteil der cDNA-Fragmente

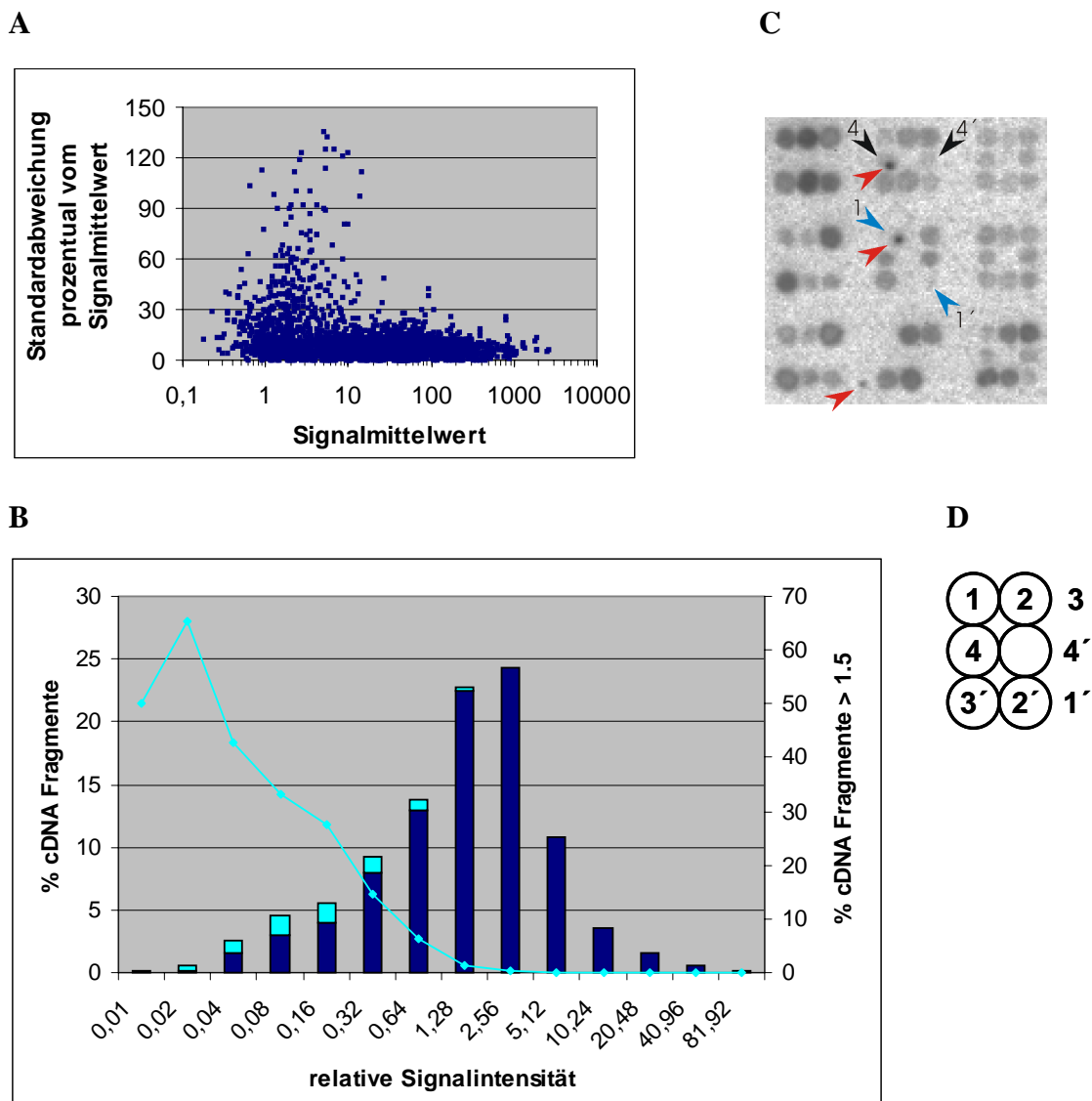


Abb. 11: Analyse zu möglichen Fehlerquellen der cDNA-Array-Technik. A: Standardabweichung prozentual vom Signalmittelwert nach 10facher automatischer Spotdetektion eines cDNA-Array-Experimentes. B: Häufigkeitsverteilung der relativen Signalintensitäten (blaue Balken) in 4 Experimenten mit etiolierten Keimlingen (5 d) des Wildtyps Ler-0. Der prozentuale Anteil (linke Ordinate) der jeweiligen cDNA-Fragmente wurde in Abhängigkeit von den relativen Signalintensitäten in logarithmischen Intervallen ( $\log_2$ ) dargestellt. Hellblaue Balkenanteile entsprechen dem Anteil von Signalintensitäten mit einem Doppelspotverhältnis größer 1,5. Die hellblaue Linie gibt den prozentualen Anteil (rechte Ordinate) der Signalintensitäten mit einem Doppelspotverhältnis größer 1,5 im Intervall wieder. C: Beeinflussung der Signalintensitäten im Doppelspotschema (Doppelspot 1: blaue und Doppelspot 4: schwarze Pfeilmarkierung) durch künstliche Hybridisierungssignale (rote Pfeilmarkierung) in einem Ausschnitt eines hybridisierten cDNA-Arrays. D: Doppelspotschema (analog zu Abb. 5C)

oberhalb der Grenze von 1,5 als Funktion ebenfalls in Abb. 11B dargestellt (rechte Ordinatenachse). Die Funktion zeigt, dass der Anteil von Signalintensitäten mit einem Doppelspotverhältnis größer 1,5 von bis zu 66 % im Intervall von 0,01 bis 0,02 vorwiegend bei niedrigen Signalwerten zu verzeichnen und somit im Bereich der Hintergrundwerte (bis 0,32) ist.

Nicht nur niedrige Signalwerte nahe dem Hintergrund weisen ein hohes Doppelpotverhältnis auf. 74 Signalwerte (1,29 %) größer 0,32 der 4 Experimente haben ebenfalls Doppelpotverhältnisse größer 1,5. Artificielle Hybridisierungssignale (Abb. 11C, rote Pfeilmarkierung), die zufällig in das Raster des Spotschemas (Abb. 11D) passen und einen deutlichen Unterschied in der Signalintensität gegenüber dem eigentlichen Hybridisierungssignal besitzen (Abb. 11C, Bsp. Doppelpot 1: blaue und Doppelpot 4: schwarze Pfeilmarkierung), sind eine Ursache für hohe Doppelpotverhältnisse. Dieser Fakt wurde für 30 der 74 Signalintensitäten größer 0,32 mit einem Doppelpotverhältnis größer 1,5 (Abb. 11B) durch visuelle Überprüfung festgestellt.

Die Analyse zeigt, dass der Doppelpot als interne Kontrolle für Membranherstellung und Hybridisierungsergebnisse benutzt werden kann. Beeinflusst wird das Doppelpotverhältnis durch die automatische Spotdetektion in "ArrayVision" insbesondere bei Signalwerten kleiner 0,32 und von artifiziellen Hybridisierungssignalen.

### 3.4.3. Überstrahlungseffekte

Ein weiteres zu analysierendes Problem stellen mögliche Überstrahlungseffekte durch benachbarte intensive Hybridisierungssignale dar. Für die Untersuchung von Überstrahlungseffekten eignen sich die Messwerte der Mittelspots im 3 x 3 Spotschema (siehe Pkt. 2.2.5.2), weil diese kein cDNA-Fragment enthalten (*blank spots*) und somit ohne Hybridisierungssignal sein müssten. Folglich entsprechen die Messwerte der Mittelspots der Summe der umliegenden überstrahlenden Hybridisierungssignale in Abhängigkeit von ihrem Abstand zum Mittelspot. Der Einfluss der Signalintensitäten der umliegenden symmetrisch angeordneten Spotpunkte wurde als umgekehrt proportional zum quadratischen Abstand ( $\sim r^{-2}$ ) vom Mittelspot betrachtet. Die Abstände wurden dem idealen Spotmuster als einem gleichseitigen rechtwinkligen Dreieck entsprechend mit 1 (Kathete, Abstand zum mittleren Punkt einer Seite) und  $2^{0.5}$  (Hypotenuse, Abstand zu den Eckpunkten) angenommen, außerdem wurde von einer Punktstrahlung ausgegangen. Der Signalwert wurde für jeden Mittelspot anhand der umgebenen Signalintensitäten nach der Formel

$$S_{\text{Mittelspot}} \sim (S_1 + S_{1'} + S_2 + S_{2'}) \times 2^{-1} + S_3 + S_{3'} + S_4 + S_{4'}$$

berechnet. Diese für alle mittleren Punkte in den 4 Experimenten berechneten Signalwerte

wurden in Abhängigkeit von den normalisierten Signalintensitäten der Mittelspots in Abb. 12 aufgetragen.

Ausgehend von einem Mittelspot ohne Überstrahlungseffekt wäre ein gleichbleibender Signalwert in Höhe des durchschnittlichen Hintergrundsignals und somit eine Parallele zur x-Achse zu erwarten. In Abb. 12 wird bei zunehmender relativer Signalintensität eine steigende Signalintensität des zugehörigen Mittelspots gezeigt (diagonale dunkelrote Linie). Folglich zeigen alle Mittelspots messbare Überstrahlungseffekte. Die waagerechte rote Linie entspricht den höchsten normalisierten Hintergrundwerten (0,32; vgl. Abb. 9). Lediglich 5 Signalwerte der Mittelspots (0,1 %) liegen oberhalb dieser Grenze. Demzufolge ist die Überstrahlung selbst bei hohen umliegenden Signalintensitäten gering, wenn Signale mit einem Wert größer 0,32 betrachtet werden.

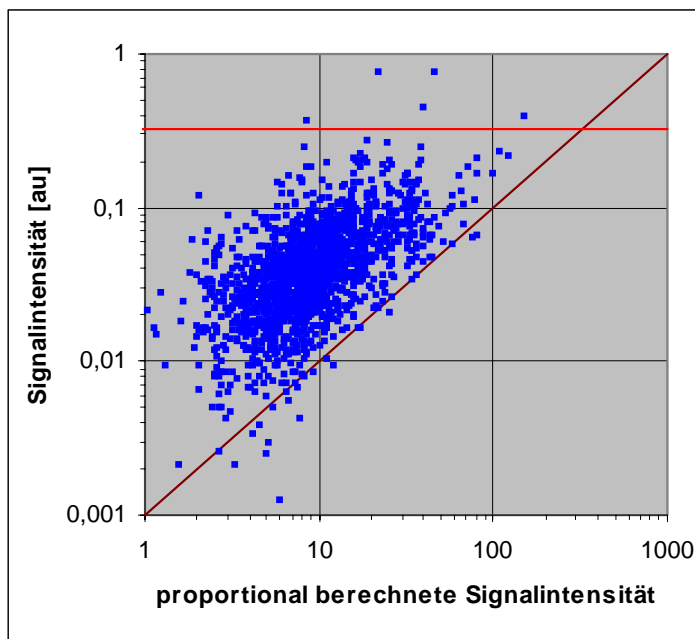


Abb. 12: Berechnete Signalintensitäten in Abhängigkeit von den normalisierten Signalintensitäten der Mittelspots. Die Berechnung der Signalwerte erfolgte aus den die Mittelspots umgebenden Signalintensitäten der 4 cDNA-Array-Experimente mit etiolierten Keimlingen (5 d) des Wildtyps Ler-0.

#### 3.4.4. Reproduzierbarkeit

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurden aus den 4 Experimenten die normalisierten Signalwerte (erste Mittelwertzentrierung aller Gene eines Experimentes) eines cDNA-Fragmentes gegenüber ihren gemeinsamen Mittelwert logarithmisch aufgetragen (Abb. 13A). Die Diagonale kennzeichnet den Mittelwert. Je näher ein Punkt der Diagonalen liegt, desto geringer ist die gemessene Abweichung vom Mittelwert in den 4 Experimenten. Die gelben

Linien in Abb. 13A markieren eine Abweichung der Signalwerte um den Faktor  $\sim 2,24$  ( $= 5^{-0,5}$ ) vom Mittelwert der Experimente. 44 der 5.752 cDNA-Fragmente (0,8 %) zeigten eine höhere Abweichung der Genexpression als  $\sim 2,24$  in den 4 Experimenten. Für 40 der 44 cDNA-Fragmente lag der Signalmittelwert unter den maximalen Hintergrundwerten von 0,32 (Abb. 13A, siehe Anhang: Ler-0\_repro.xls). Die Standardabweichung für die 4 Experimente mit etiolierten Keimlingen auf einer Membran betrug durchschnittlich 26 % (siehe Anhang: Ler-0\_repro.xls).

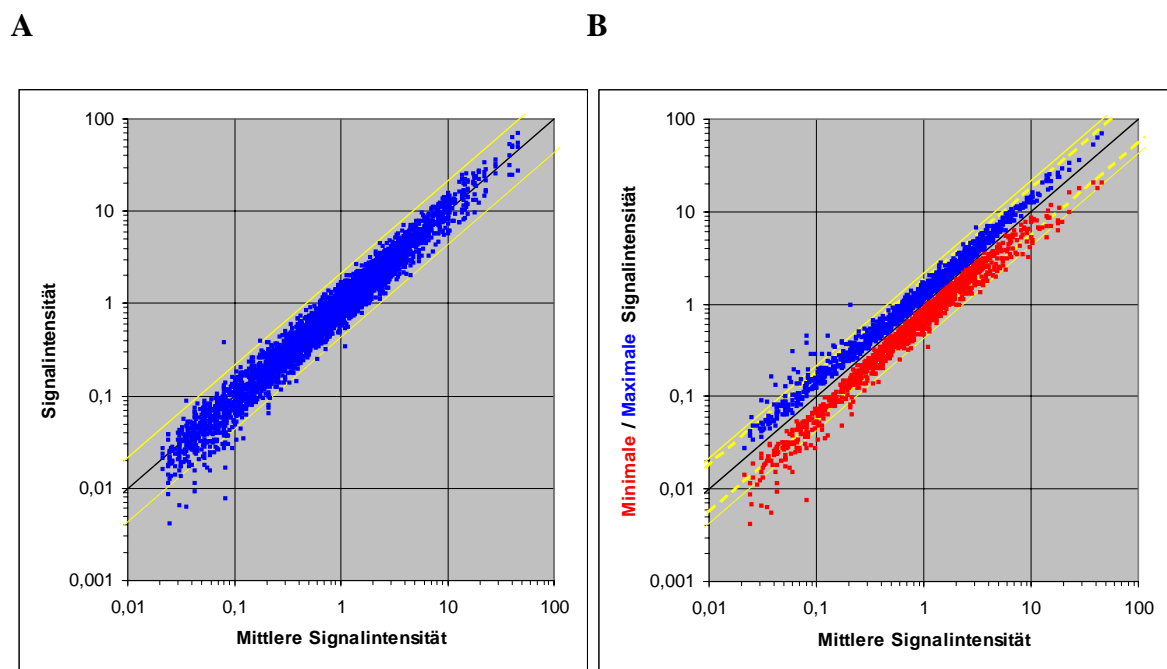


Abb. 13: Diagramme zur Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Technik. A: Signalintensitäten gegenüber ihrem Signalmittelwert (Diagonale) in den 4 unabhängigen cDNA-Array-Experimenten mit etiolierten Keimlingen (5 d) des Wildtyps Ler-0 auf einer Membran. Die gelben Parallelen zur Diagonalen entsprechen der Abweichung vom Signalmittelwert um einen Faktor  $\sim 2,24$  ( $5^{-0,5}$ ). B: Minimale (rot) und maximale Signalwerte (blau) gegenüber ihrem Signalmittelwert (Diagonale) in 8 unabhängigen cDNA-Array-Experimenten mit etiolierten Keimlingen (5 d) des Wildtyps Ler-0. Die gelben Parallelen zur Diagonalen entsprechen der Abweichung vom Signalmittelwert bei einem Faktor  $\sim 2,24$  ( $5^{-0,5}$ , durchgezogene Linie) bzw. einem Faktor 1,8 (unterbrochene Linie).

Die Analyse zur Reproduzierbarkeit der 4 Experimente zeigt, dass die Experimente innerhalb bestimmter Grenzen reproduzierbar sind. Doch werden nicht alle Experimente auf nur einer Membran durchzuführen sein, folglich ist die Reproduzierbarkeit der Experimente noch von der (Herstellungs-) Qualität innerhalb einer Membranserie abhängig. Aus diesem Grund wurde die Reproduzierbarkeit in Analogie zu den ersten 4 Experimenten in einem zweitem Ansatz mit dem Unterschied getestet, dass 4 weitere Sonden unabhängig voneinander gezogener etiolierter Keimlinge (5 d) von Ler-0 auf 4 verschiedenen Membranen

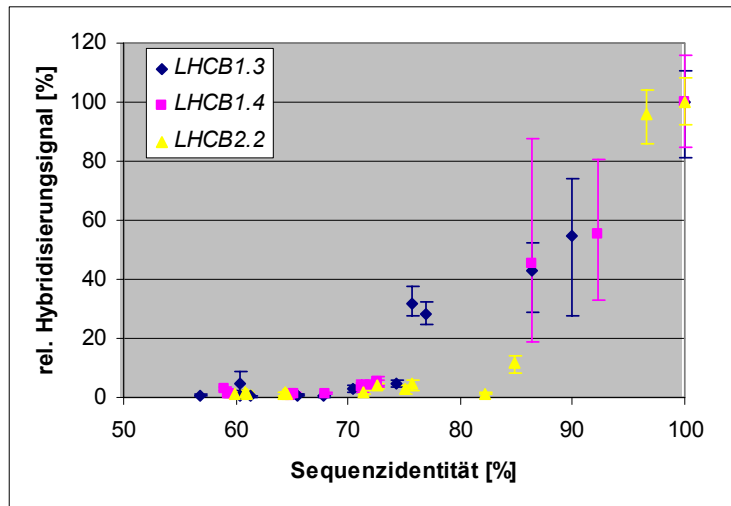
derselben Serie hybridisiert wurden. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der 8 Experimente wurde nach Normalisierung (s. o.) der kleinste und der größte Signalwert eines cDNA-Fragmentes gegenüber dem Mittelwert der Signalintensitäten desselben cDNA-Fragmentes logarithmisch aufgetragen (Abb. 13B). Bei mittleren Signalintensitäten kleiner 0,32 war innerhalb eines durch den Faktor  $\sim 2,24$  eingegrenzten Bereiches (gelbe Parallelen zur Diagonalen) eine höhere Abweichung vom Signalmittelwert für die minimalen und maximalen Signalwerte eines Fragmentes als oberhalb von 0,32 zu verzeichnen. 105 der 11504 liegen außerhalb des eingegrenzten Bereiches, von 85 Signalwerte kleiner 0,32 sind (Abb. 13B). Diese Abweichungen resultieren aus einem höheren relativen Fehler der Messwerte (siehe Pkt. 3.4.2). Folglich sind insbesondere Signalwerte kleiner 0,32 von der Auswertung auszuschließen, weil diese höhere Abweichungen vom Signalmittelwert zeigen (Abb. 13B). Die Standardabweichung der 4 Experimente mit etiolierten Keimlingen auf 4 Membranen der Serie "2A" betrug durchschnittlich 23 % (siehe Anhang: Ler-0\_repro.xls). Aus der relativen Konstanz der Standardabweichung (26 % bzw 23 %) in den beiden experimentellen Reihen ist von der Reproduzierbarkeit der Experimente auszugehen.

Um differenziell exprimierte Gene aus dem Vergleich von Experimenten wählen zu können, ist eine dreifache Standardabweichung bzw. ein Faktor 1,8 vom Mittelwert unzureichend (siehe Abb. 13B). In den 8 Experimenten überschreiten noch 331 cDNA-Fragmente diese Grenze, d.h. 23 % der Fragmente des cDNA-Arrays "2A" wären als differenziell exprimiert anzusehen. Bei einem Faktor  $\sim 2,24$  ( $= 5^{-0,5}$ , Abb. 13B) betrifft dies noch 105 cDNA-Fragmente (7 %), von denen 85 Signalintensitäten kleiner 0,32 (s. o.) aufweisen. Deshalb wurde für die Auswahl von differenziell exprimierten Genen zwischen maximalen und minimalen Signalwert in den betrachteten Experimenten ein Faktor größer 5 ( $\pm 5^{-0,5}$ , Abb. 13B) gewählt.

### 3.4.5. Kreuzhybridisierung zwischen Mitgliedern einer Genfamilie

In Kreuzhybridisierungsexperimenten wurde untersucht, inwieweit Gene aufgrund ihrer Sequenzidentität mit cDNA-Fragmenten derselben Genfamilie hybridisieren können. Für die Untersuchungen wurde die LHC-Genfamilie ausgewählt. Von 21 Mitgliedern der Genfamilie (nach Jansson 1999) standen 14 zur Verfügung und wurden auf die Membranen der Serie "1A" aufgebracht (Tab. 6). Um mögliche Kreuzhybridisierungsreaktionen mit den entsprechenden Sequenzähnlichkeiten in Beziehung setzen zu können, wurden die kodierenden

Benennung	ID	LHCA2 %	LHCA3.1 %	LHCA4 %	LHCB1.3 %	LHCB1.4 %	LHCB1.5 %	LHCB2.1 %	LHCB2.2 %	LHCB2.4 %	LHCB3 %	LHCB4.1 %	LHCB4.2 %	LHCB5 %	LHCB6 %
LHCA2	At3g61470	100,0	61,5	60,3	60,3	65,0	58,8	65,6	64,3	64,4	68,3	64,5	63,7	63,5	63,3
LHCA3.1	At1g61520	61,5	100,0	59,0	67,8	64,9	64,5	65,7	64,6	65,3	64,0	57,4	79,3	66,4	69,7
LHCA4	At3g47470	60,3	59,0	100,0	65,4	67,9	67,0	64,3	64,3	64,3	72,1	62,4	63,9	66,5	62,9
LHCB1.3	At1g29930	60,3	67,8	65,4	100,0	86,4	90,0	77,0	75,7	74,3	70,4	60,4	56,9	61,2	65,4
LHCB1.4	At2g34430	65,0	64,9	67,9	86,4	100,0	92,3	72,6	72,5	71,2	72,0	59,0	59,5	59,2	65,1
LHCB1.5	At2g34420	58,8	64,5	67,0	90,0	92,3	100,0	75,3	75,0	74,6	73,0	57,9	57,4	59,1	56,4
LHCB2.1	At2g05100	65,6	65,7	64,3	77,0	72,6	75,3	100,0	96,5	85,2	71,4	60,9	61,0	59,7	55,8
LHCB2.2	At2g05070	64,3	64,6	64,3	75,7	72,5	75,0	96,5	100,0	84,8	71,4	60,9	61,0	59,9	82,1
LHCB2.4	At3g27690	64,4	65,3	64,3	74,3	71,2	74,6	85,2	84,8	100,0	71,3	61,5	55,7	57,8	79,3
LHCB3	At5g54270	68,3	64,0	72,1	70,4	72,0	73,0	71,4	71,4	71,3	100,0	64,8	63,0	62,2	71,5
LHCB4.1	At5g01530	64,5	57,4	62,4	60,4	59,0	57,9	60,9	60,9	61,5	64,8	100,0	82,1	59,4	73,0
LHCB4.2	At3g08940	63,7	79,3	63,9	56,9	59,5	57,4	61,0	61,0	55,7	63,0	82,1	100,0	59,1	67,1
LHCB5	At4g10340	63,5	66,4	66,5	61,2	59,2	59,1	59,7	59,9	57,8	62,2	59,4	59,1	100,0	69,4
LHCB6	At1g15820	63,3	69,7	62,9	65,4	65,1	56,4	55,8	82,1	79,3	71,5	73,0	67,1	69,4	100,0



Tab. 6: Homologievergleich von Mitgliedern der LHC-Genfamilie. Paarweiser Vergleich der Nukleotidsequenzen der LHC-Gene des DNA-Arrays „1A“ mit dem Programm „Bestfit in HUSAR“. Grau markierte Sequenzidentitäten entsprechen der spiegelbildlichen Darstellung des paarweisen Vergleiches. Die als Sonde ausgewählten Gene wurden mit ihren zugehörigen Sequenzidentitäten gegenüber den Mitgliedern der Genfamilie in Reihen und Spalten blau hinterlegt.

Abb. 14: Relatives Hybridisierungssignal in Abhängigkeit von der Sequenzidentität für die Gene der LHC-Genfamilie. Das Hybridisierungssignal der zum cDNA-Fragment der Membran „1A“ homologen Sonde wurde jeweils zu 100 % und alle weiteren Messwerte gegenüber diesem in Relation gesetzt.



Nukleotidsequenzen der Gene mit dem Programm "Bestfit" in "HUSAR" paarweise miteinander verglichen (Tab. 6). Für die Sondenpräparation wurden mit *LHCB1.3*, *LHCB1.4* und *LHCB2.2* drei Gene ausgewählt, deren Sequenzidentitäten gegenüber anderen Mitgliedern der Genfamilie fast den gesamten nutzbaren Bereich der Sequenzidentitäten von 57 % bis 97 % (Tab. 6) abdecken.

Die Amplifikation der cDNA-Fragmente für die Sondenpräparation erfolgte im präparativen Maßstab mit genspezifischen Oligonukleotiden (siehe Pkt. 2.2.3, 2.2.5.3;  $T_{a,lhcb1.3f/r} = 64^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{a,lhcb1.4f/r} = 66^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{a,lhcb2.2f/r} = 60^{\circ}\text{C}$ ), um eine mögliche Kreuzhybridisierung durch flankierende Plasmidsequenzen zu vermeiden. Jede der 3 Sonden wurde auf jeweils 3 Membranen in 1 ml Church-Puffer bei  $65^{\circ}\text{C}$  hybridisiert, die Membranen zweimal gewaschen (0,2x SSC/0,1 % SDS,  $65^{\circ}\text{C}$ , 15 min), die Signalwerte mit dem Phosphorimager aufgezeichnet und dem Programm "TINA" bestimmt. Für die Auswertung wurde das arithmetische Mittel der jeweiligen Signalstärken von den drei mit einer Sonde hybridisierten Membranen verwendet. Der gemittelte Signalwert für die als Sonde verwendete cDNA wurde zu 100 % und alle weiteren Messwerte dieser Reihe gegenüber diesem in Relation gesetzt.

Die relativen Hybridisierungssignale wurden in Abhängigkeit von der Sequenzidentität wurde in Abb. 14 dargestellt. Erwartungsgemäß ergab eine Sequenzidentität größer 95 % (*LHCB2.2/LHCB2.1*) ein Hybridisierungssignal derselben Intensität. Unterhalb von 75 % Sequenzidentität waren nur Kreuzhybridisierungsereignisse kleiner 5 % innerhalb der *LHC*-Genfamilie zu verzeichnen. Keine eindeutige Korrelation war im Bereich zwischen 75 und 95 % Sequenzidentität festzustellen. So wurden bei z. B. 75 bis 77 % Sequenzidentität ca. 30 % Kreuzhybridisierung (*LHCB1.3*-Sonde/*LHCB2.1* bzw. *LHCB2.2* cDNA-Fragmente), bei 83 bis 85 % Sequenzidentität keine bzw. 12 % Kreuzhybridisierung (*LHCB2.2*-Sonde/*LHCB2.4* bzw. *LHCB6* cDNA-Fragmente) und bei 86 bis 92 % Sequenzidentität eine Kreuzhybridisierung zwischen 43 bis 55 % (*LHCB1.3*-Sonde/*LHCB1.4* bzw. *LHCB1.5* und *LHCB1.4*-Sonde/*LHCB1.3* bzw. *LHCB1.5*) ermittelt. Die im Vergleich höhere Abweichung der Messergebnisse im Bereich von 85 bis 95 % (siehe Abb. 14) gegenüber den übrigen Messergebnissen ist möglicherweise von den experimentellen Bedingungen abhängig.

Die Analyse dieser Daten zeigt, dass Kreuzhybridisierung im Bereich 75 bis 85 % Sequenzidentität möglich und oberhalb von 85 % Sequenzidentität zu erwarten ist. Eine Vorhersage bzw. eine theoretische Bestimmung des Ausmaßes der Kreuzhybridisierung anhand der Sequenzidentität ist nicht möglich.

### 3.4.6. Kriterien zur Auswertung der cDNA-Array-Experimente

Die Analyse der Experimente mit etiolierten Keimlingen (5 d) des Wildtyps Ler-0 zeigte die Reproduzierbarkeit der Experimente innerhalb bestimmter Grenzen, deren Einhaltung die Auswertbarkeit der nachfolgenden cDNA-Array-Experimente gewährleisten.

Die Analyse zeigt für niedrige Signalwerte einen hohen relativen Fehler (siehe Pkt. 3.4.2 und 3.4.4), folglich gewährleisten höhere Signalwerte eine höhere Datensicherheit. Um Signale vom Hintergrund differenzieren zu können und niedrige Signalwerte von der Auswertung auszuschließen, wurde ein Sicherheitsfaktor eingeführt. Da die Signalwerte durchschnittlich 16- bis 32fach höher als ihre zugehörigen Hintergrundwerte und die niedrigsten Signalwerte 10fach niedriger als die höchsten Hintergrundwerte ( $\sim 0,32$ ) sind (siehe Pkt. 3.4.1), wurde ein Faktor 10 als Kriterium für die Unterscheidung von Signalwerten gegenüber Hintergrundwerten festgesetzt. Dieses Kriterium muss in mindestens einem der betrachteten Experimente erfüllt sein, da möglicherweise Gene sehr spezifisch exprimiert werden (**1. Sicherheitskriterium**).

Ein weiteres Kriterium für die Datensicherheit ergab sich aus der Analyse der Doppelspot-signalwerte als interne Kontrolle (siehe Pkt. 3.4.2). Dementsprechend sind Signalwerte mit hohem Doppelspotverhältnis unabhängig von der Signalstärke von der Auswertung auszuschließen. Mit einem oberen Grenzwert von 1,5 für das Doppelspotverhältnis wird ein Kriterium eingeführt, um die Interpretation von fehlerhaften Hybridisierungssignalen in der Analyse der cDNA-Arrays zu vermeiden (**2. Sicherheitskriterium**).

Diese beiden Kriterien dienen zunächst zum Ausschluss möglicher fehlerbehafteter Signalwerte und zur Auswahl eines gesicherten reproduzierbaren Datensatzes. Ein drittes Kriterium zur Selektion von differenziell exprimierten Genen ist ebenfalls aus der Analyse zur Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Experimente (siehe Pkt. 3.4.4) abzuleiten. Demnach muss für die Bestimmung von differenziell exprimierten Genen ein Faktor größer 5 ( $\pm 5^{-0,5}$ , Abb. 13B) zwischen minimalen und maximalen Signalwert in den betrachteten Experimenten bestehen (**differenzielles Kriterium**).

### **3.5. Genexpression während der frühen Photomorphogenese unter Weißlichtbedingungen**

Der Etablierung der Methode im technischen Teil der Arbeit folgte die Analyse der Genexpression während der Photomorphogenese im wissenschaftlichen Teil. Die Keimlinge wurden für die Untersuchung der frühen Photomorphogenese zunächst für 5 Tage unter etiolierenden Bedingungen aufgezogen. Danach wurden die Keimlinge der ausgewählten Pflanzen (siehe Pkt. 3.1) mit Weißlicht bestrahlt, um die Photomorphogenese einzuleiten (siehe Pkt. 2.2.1). Kurze Belichtungszeiten wurden gewählt, um frühe Änderungen der Genexpression zu erfassen, die möglicherweise an der späteren Ausprägung des Phänotyps der Pflanzen beteiligt sind. Die Weißlichtbestrahlung erfolgte über 0,5 h (nur Col-0 und *det1*), 2 h und 4 h (siehe Pkt. 2.2.1). Das Pflanzenmaterial (siehe Pkt. 2.1.1) wurde sofort nach Belichtungsende geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert (siehe Pkt. 2.2.1) und schließlich zur Herstellung von cDNA-Sonden (siehe Pkt. 2.2.5.3) verwendet. Diese Sonden wurden mit cDNA-Arrays der Membranserie "2B" hybridisiert (siehe Pkt. 2.2.5.4). Nach der Bestimmung der Signalintensitäten für alle 1514 cDNA-Fragmente in jedem Hybridisierungsexperiment mit Hilfe des Phosphorimagers und der Programme "BAS-Reader" und "ArrayVision" erfolgte die Normalisierung der Signalintensitäten (siehe Pkt. 2.2.5.5).

#### **3.5.1. Gesamtvergleich der Weißlichtexperimente**

Um einen Überblick über die Genexpression während der frühen Phase der Photomorphogenese zu erlangen, wurden die normalisierten Signalintensitäten der Weißlichtexperimente (s. o.) einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen. In einer Hauptkomponentenanalyse entstehen Gruppen, in denen Variablen (z. B. Experimente) entsprechend ihren korrelativen Beziehungen klassifiziert werden. Mit dieser Hilfe kann entschieden werden, welche der Experimente gemeinsame bzw. unterschiedliche Informationen erfassen. Hierfür wird die maximale Varianz multivariabler Daten (z. B. Expressionsdaten) in einer minimalen Zahl von orthogonalen Hauptkomponenten (-achsen, -dimensionen) konzentriert. Die höchste Varianz wird auf der ersten Achse dargestellt. Jede weitere Achse repräsentiert abnehmende Varianzen (Bortz 1999).

In Abb. 15 sind die ersten zwei Achsen der Hauptkomponentenanalyse für die normalisier-

ten Signalwerte der Weißlichtexperimente von Wildtypen (Col-0, Ler-0, Ws-2), Phytochrommutanten (*phyA*, *phyB*, *phyAB*), Cryptochrommutanten (*cry1*, *cry2*), der PHYB-überexprimierenden Linie und der Mutante *det1* dargestellt. Die im zweidimensionalen Diagramm dargestellte Komponente 1 repräsentiert 33 % und die Komponente 2 17 % der Varianz, so dass insgesamt 50 % der Varianz der Daten abgebildet sind. Jedes Symbol im Diagramm entspricht einem cDNA-Array-Experiment. Die Lage der Symbole resultiert aus den Signalwerten der nach jedem Experiment analysierten 1.514 cDNA-Fragmente.

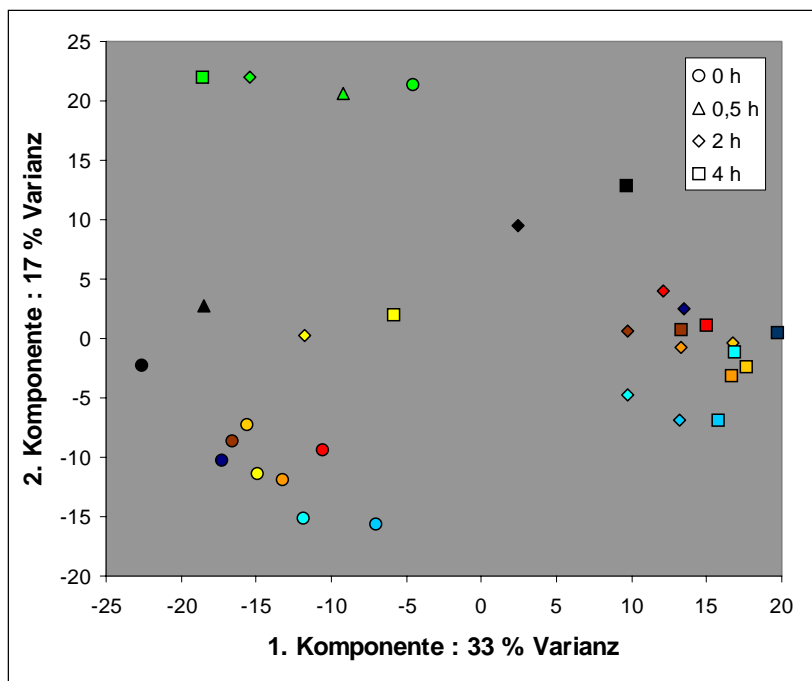


Abb. 15: Hauptkomponentenanalyse zur Genexpression von etiolierten Keimlingen (5 d) der Wildtypen Col-0 (schwarz), Ler-0 (dunkelblau), Ws-2 (= *phyD*, dunkelrot), der Rotlichtrezeptormutanten *phyA* (rot), *phyB* (*hy3*, dunkelgelb), *phyAB* (orange), der Blaulichtrezeptormutanten *cry1* (*hy4*, graublau), *cry2* (*fha-1*, hellblau), der transgenen PHYB-überexprimierenden Linie (35S::PHYB, hellgelb) und der Mutante *det1* (grün) bei Bestrahlung mit Weißlicht für 0 h (etioliert, Kreis), 0,5 h (Dreieck, nur Col-0 und *det1*), 2 h (Rhombus) und 4 h (Quadrat).

Entsprechend der Lage der Symbole in der Hauptkomponentenanalyse können die Experimente in vier Gruppen zusammengefasst werden. Eine Gruppe (im folgenden Gruppe 1) umfasst die Experimente mit etiolierten Keimlingen mit Ausnahme der Mutante *det1* (Kreise in Abb. 15). Zu einer weiteren Gruppe (im folgenden Gruppe 2) zählen die Experimente mit belichteten Keimlingen (nach 2 h bzw. 4 h, Rhomben bzw. Vierecke in Abb. 15) der drei Wildtypen Ler-0, Col-0 und Ws-2 (Abb. 15, dunkelblaue, schwarze und dunkelrote Symbole), der Rotlichtrezeptormutanten *phyA*, *phyB* und *phyAB* (Abb. 15, rote, dunkelgelbe und orange Symbole) sowie der Blaulichtrezeptormutanten *cry1* und *cry2* (Abb. 15, hellblaue und graublau Symbole). Die Experimente mit Col-0 sind ebenfalls zu den Gruppen 1 und 2 zu zählen, das zeigt die Analyse der ersten drei Komponenten in "J-Express" (3 Hauptachsen bzw. Dimensionen, siehe Diskussion) bzw. auch die weitere Auswertung. Die Experimente

unter Verwendung der Mutante *det1* (Abb. 15, grüne Symbole) bilden eine dritte Gruppe (im folgenden Gruppe 3), während die Experimente mit belichteten Keimlingen der PHYB-überexprimierenden Linie (Abb. 15, gelbe Symbole) zu einer vierten Gruppe (im folgenden Gruppe 4) zu zählen sind.

Die Experimente zur Charakterisierung der Methode (siehe Pkt. 3.4) zeigten, dass zur Verwendung von cDNA-Array-Daten Kriterien für Reproduzier- und Interpretierbarkeit der Experimente notwendig sind. Unter Verwendung der beiden aufgestellten Sicherheitskriterien (siehe Pkt. 3.4.6) wurden die Expressionsdaten der Experimente auf 304 cDNA-Fragmente (20 % des cDNA-Arrays) reduziert und erneut eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt (Abb. 16). Die Komponente 1 repräsentiert 47 % und die Komponente 2 19 % der Varianz, so dass in Abb. 16 insgesamt 66 % der gesamten Varianz dargestellt sind. Trotz der Reduktion der Expressionsdaten um 80 % sind im Vergleich der Hauptkomponentenanalysen (Abb. 15 und 16) lediglich kleinere Veränderungen der Distanzen zwischen den einzelnen Experimenten festzustellen. Die zuvor beschriebenen vier Gruppen von Experimenten (s. o.) sind nach der Reduktion des in der Hauptkomponentenanalyse verwendeten Datensatzes fast unverändert. Aus den in Abb. 15 und 16 dargestellten Ergebnissen der Hauptkomponentenanalyse kann geschlussfolgert werden, dass die etiolierten Keimlinge mit Ausnahme der Mutante *det1* eine ähnliche Genexpression aufweisen (Gruppe 1). Das entspricht auch dem Vergleich der Phänotypen (siehe Abb. 6 und 7).

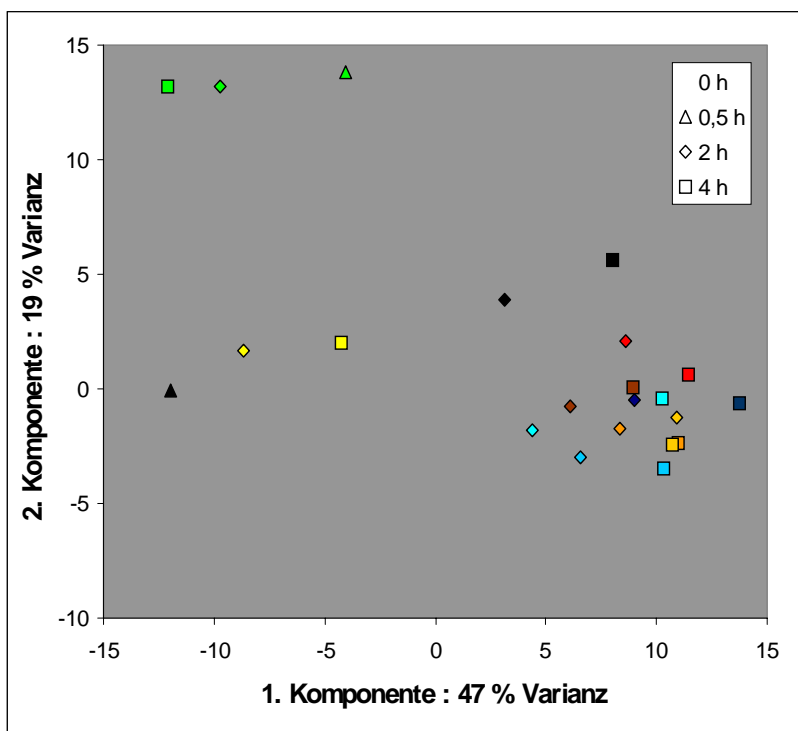


Abb. 16: Hauptkomponentenanalyse des auf 304 cDNA-Fragmente reduzierten Datensatzes. In den Experimenten zur Genexpression wurden Keimlinge der Wildtypen Col-0 (schwarz), Ler-0 (dunkelblau), Ws-2 (= *phyD*, dunkelrot), der Rotlichtrezeptormutanten *phyA* (rot), *phyB* (*hy3*, dunkelgelb), *phyAB* (orange), der Blaulichtrezeptormutanten *cry1* (*hy4*, graublau), *cry2* (*pha-1*, hellblau), der transgenen PHYB-überexprimierenden Linie (35S::PHYB, hellgelb) und der Mutante *det1* (grün) eingesetzt und mit Weißlicht für 0 h (etioliert, Kreis), 0,5 h (Dreieck, nur Col-0 und *det1*), 2 h (Rhombus) und 4 h (Quadrat) bestrahlt.

In einer zweiten Gruppe (Gruppe 2) in der Hauptkomponentenanalyse (Abb. 15 und 16) sind die Belichtungsexperimente der Wildtypen, Phyto- und Cryptochrommutanten repräsentiert. D.h. bei Bestrahlung mit Weißlicht ist die Genexpression in Photorezeptormutanten und Wildtypen ähnlich. Folglich sind die in den Mutanten mutierten Rot- bzw. Blaulichtrezeptoren nicht maßgeblich an der Genexpression unter den verwendeten Weißlichtbedingungen beteiligt, denn aus dem Fehlen der jeweiligen Photorezeptoren folgt keine wesentliche Veränderung der Genexpression. Dieses Ergebnis ist überraschend, weil eigentlich Phyto- und Cryptochrome als maßgeblich für die Lichtwahrnehmung in Pflanzen gelten (siehe Pkt. 1). Aus der Hauptkomponentenanalyse kann außerdem geschlussfolgert werden, dass eine Veränderung der Genexpression bei Belichtung hauptsächlich in den ersten zwei Stunden erfolgt (Abb. 16).

Aufgrund des von Wildtypen und Photorezeptormutanten abweichenden Phänotyps etiolierter Keimlinge der Mutante *det1* (vgl. Abb. 6) konnte eine veränderte Genexpression (Abb. 16, grüner Kreis) erwartet werden. Überraschenderweise erfolgte bei Weißlichtbestrahlung keine Angleichung der Genexpression an die in gleicher Weise belichteten Keimlinge von Wildtypen und Photorezeptormutanten. Offensichtlich durchlaufen die etiolierten Keimlinge von *det1* bei Belichtung eine andere Entwicklung als die der Wildtypen und Photorezeptormutanten. Entsprechend bilden die Belichtungsexperimente mit der Mutante *det1* in der Hauptkomponentenanalyse eine separate Gruppe (Abb. 16, grüne Symbole; Gruppe 3).

Ebenfalls abweichend von Wildtypen und Photorezeptormutanten ist die Genexpression in belichteten Keimlingen der PHYB-überexprimierenden Linie (Abb. 16, hellgelbe Symbole). Da die Genexpression auch von der in der Mutante *det1* abweicht, sind diese Experimente zu einer vierten Gruppe (Gruppe 4) zu zählen. Im Gegensatz zur Mutante *det1* besitzen etiolierte Keimlinge der PHYB-überexprimierenden Linie eine den Wildtypen und Photorezeptormutanten ähnliche Genexpression. Erst die Weißlichtbestrahlung veränderte das Expressionsverhalten der Gene in der transgenen Linie gegenüber den in Wildtypen und Photorezeptormutanten. Demzufolge beeinflusst das überexprimierte *PHYB* die Genexpression bei Belichtung. Diese Schlussfolgerung entspricht den Ergebnissen anderer Autoren. Deren Ergebnissen zufolge (zur Übersicht siehe Fankhauser 2001, vgl. Pkt. 1) besitzen Phytochrome erst in der  $P_{FR}$ -Form ihre aktive Funktion.

Die Hauptkomponentenanalyse zeigt, dass trotz der Reduktion des Datensatzes die wesentlichen Informationen erhalten bleiben. Eine Veränderung der Genexpression bei Belichtung erfolgt hauptsächlich innerhalb der ersten zwei Stunden. Die Genexpression in Wildtypen und Photorezeptormutanten ist überraschend ähnlich. Eine von Wildtypen und Photorezeptor-

mutanten abweichende Genexpression ist für etiolierte und belichtete Keimlinge der Mutante *det1* und für belichtete Keimlinge der PHYB-überexprimierenden Linie festzustellen.

### **3.5.2. Auswahl von Genen mit Relevanz für Ereignisse der frühen Photomorphogenese**

Mittels Hauptkomponentenanalyse wurden die Weißlichtexperimente auf ihren Informationsgehalt überprüft (Pkt. 3.5.1). Für eine detailliertere Analyse der Weißlichtexperimente sind zunächst diejenigen Gene zu bestimmen, die in der Hauptkomponentenanalyse maßgeblich an der Klassifizierung beteiligt waren. Den größten Einfluss auf die Klassifizierung sollten Gene mit der höchsten Veränderung der Expression im Vergleich der cDNA-Array-Experimente haben. Zunächst wurden Gene nach ihrer differentiellen Expression während der Belichtungsphase separat in jedem Wildtyp und jeder Mutante (siehe Pkt. 3.5.2.1) und anschließend im Vergleich der Experimente von Mutanten gegenüber allen drei Wildtypen (siehe Pkt. 3.5.2.2) ausgewählt. Die Auswahl erfolgte aus dem Datensatz der 304 cDNA-Fragmente, da nur diese den Sicherheitskriterien (siehe Pkt. 3.4.6) entsprechen.

#### **3.5.2.1. Differenziell exprimierte Gene in Abhängigkeit von der Belichtungszeit**

Aus dem reduzierten Datensatz (304 cDNA-Fragmente) wurden unter Anwendung des differentiellen Kriteriums (siehe Pkt. 3.4.6) zunächst die in Abhängigkeit von der Belichtungszeit (0 h bis 4 h) differenziell exprimierten Gene jedes Wildtyp und jeder Mutante bestimmt und mit dem Quotient der Signalwerte zwischen den cDNA-Array-Experimenten in Tab. 7 aufgelistet. Ein "Plus" als Vorzeichen vor dem Quotienten entspricht zunehmenden Signalintensitäten bei Belichtung, ein "Minus" abnehmenden Signalintensitäten. Zusätzlich enthält Tab. 7 Informationen zur Anzahl der cDNA-Fragmente pro differenziell exprimierten Gen und zur putativen Funktion der Gene. Bis auf ein Gen (At4g32340) wurden alle cDNA-Fragmente durch Sequenzierung und Datenbankvergleich überprüft.

Die Zusammenstellung der bei Belichtung differenziell exprimierten Gene zeigt, dass die Gene, ihre Anzahl und der Wert der Quotienten in den einzelnen Pflanzen variieren (Tab. 7). Von den insgesamt 60 ausgewählten Genen (72 cDNA-Fragmenten) sind im Wildtyp Col-0 34 Gene (41 cDNA-Fragmente), im Wildtyp Ler-0 30 Gene (40 cDNA-Fragmente) und im

Tab. 7: Gene, die während der Weißlichtbestrahlung (0 h bis 4 h) in Wildtypen oder Mutanten differenziell exprimiert werden. Dargestellt sind die Anzahl cDNA Fragmente pro differenziell exprimiertem Gen, die Funktionszuordnung der Genprodukte laut "WUblastn2" und die höchsten Quotienten zwischen den Signalwerten der cDNA-Array-Experimente. Ein "Plus" als Vorzeichen vor den Quotienten entspricht zunehmenden Signalintensitäten bei Belichtung, ein "Minus" abnehmenden Signalintensitäten.

60 Summe differenziell exprimierte Gene 34 30 24 19 13 19 18 21 13 8

72		Summe differenziell exprimierte cDNA-Fragmente											
Anzahl cDNA-Fragmente	Gen ID	Abk.	Funktion	Col-0	Ler-0	Ws-2	phyA	phyAB	phyB	cry1	cry2	det1	35S::PHYB
2	At4g35770		Seneszenz assoziiertes Protein	-12.8	-8.9	-49.1	-8.7		-11.8	-15.6	-13.6		
1	At1g11260		Glukosetransporter	-11.5	-6.8	-10.0	-6.4	-5.3	-9.3	-5.5			
1	At1g79040	PSBR	PS II Untereinheit XVII	-8.7					-5.5	-6.0			
1	At1g09570		Phytochrom A	-7.2	-5.6			-6.4					-5.6
1	At4g23890		unbekanntes Protein	-6.3		-7.2							
1	At3g58450		unbekanntes Protein	-6.1			-5.1	-8.2	-8.0				
2	At5g15230		Gibberellin-reguliertes Protein 4	-6.0	-5.3		-5.5	-9.1	-6.2				
1	At5g44440		Berberinbrückenzym ähnliches Protein	-5.7	-6.0		-5.3		-5.3				
1	At1g04250		putative Auxin indiziertes Protein	-5.2									
1	At4g36900		TINY - ähnliches Protein	-5.2							-5.0		
1	At5g04140		Ferredoxin abhängige Glutamatsynthase	+5.1		+7.0	+5.3		+6.3				
1	At1g20340	PETE1	Cytochrom b/f Komplex Untereinheit V(1)	+5.1									
1	At3g09440		Hitzeschockprotein (HSC70-3)	+5.1								+11.6	+7.0
1	At1g20340		unbekanntes Protein	+5.2									
2	At3g47470	LHCA4	Chlorophyll a/b-binde Protein	+5.3	+5.9	+7.1				+5.3	+5.1		
1	At2g46820		unbekanntes Protein	+5.6							+5.5		
1	At5g38410		Rubisco kleine Untereinheit 3b	+5.7									
1	At4g25050		Acytransportprotein ähnlich	+6.2	+6.3				+6.4	+5.8	+7.2		
1	At1g50250		putative plastidäre FtsH Protease	+6.6							+5.6		
1	At2g40080		unbekanntes Protein	+6.8		+10.0							+7.8
1	At1g62180		Adenosin-5'-phosphosulfatreduktase	+6.9	+7.4							+57.0	+5.7
1	At3g54890	LHCA1	Chlorophyll a/b-binde Protein	+6.9	+7.1	+5.4				+10.0	+6.0		
2	At1g15820	LHCB6	Chlorophyll a/b-binde Protein	+7.3	+6.2	+6.4							
1	At2g39730		Rubisco-Aktivase	+7.9									
1	At3g02730		Thioredoxin F1	+8.8	+7.5	+6.2	+5.4			+5.3	+6.7		
2	At1g30380	PSAK	PS I Untereinheit X	+9.2	+9.1	+7.5	+6.1			+6.5	+8.9		
1	At1g52230	PSAH2	PS I Untereinheit VIII(2)	+10.2	+8.3	+7.0	+5.3	+10.9	+5.4	+5.6			
1	At5g13630		Cobalaminbiosynthese Protein	+10.3	+9.8	+7.7	+6.3			+5.5	+8.0		
1	At3g27690	LHCB2.4	Chlorophyll a/b-binde Protein	+10.5	+26.1	+12.7	+6.8	+7.5	+12.9	+11.7	+19.5		
2	At1g44575	PSBS	PS II Untereinheit XVIII	+13.0	+7.0	+5.2			+5.1		+5.2		
1	At3g61470	LHCA2	Chlorophyll a/b-binde Protein	+13.1	+24.0	+23.0	+13.1	+6.6	+12.0	+16.4	+15.8		
2	At5g54270	LHCB3	Chlorophyll a/b-binde Protein	+14.5	+8.1	+9.6	+7.7	+5.5	+6.2	+6.9	+8.5		
1	At2g05100	LHCB2.1	Chlorophyll a/b-binde Protein	+20.7	+16.0	+12.7	+11.2	+10.7	+15.0	+14.0	+10.7		
1	At4g22590		ähnlich Trehalose-6-phosphatphosphatase	+23.5	+24.6	+16.6	+17.2	+13.5	+20.5	+17.8	+12.2		
1	At3g01190		putative Peroxidase		-6.2								
1	rps7-01		30S ribosomales Protein Untereinheit S7		-5.2								
1	At1g74690		unbekanntes Protein		+5.1	+6.6					+7.0		
1	At4g28750	PSAE1	PS I Untereinheit V(1)		+5.5								
1	At1g31330	PSAF	PS I Untereinheit VI		+5.6								
1	At2g30570	PSBW	PS II Untereinheit XXII		+5.8								
1	At4g21280	PSBQ1	PS II Untereinheit XVI(1)		+6.9								
2	At1g29930	LHCB1.3	Chlorophyll a/b-binde Protein		+9.1	+6.1	+5.6				+5.3	-5.3	
4	At2g34420	LHCB1.5	Chlorophyll a/b-binde Protein		+10.5	+8.4	+7.0				+8.5	-6.1	
1	At2g34430	LHCB1.4	Chlorophyll a/b-binde Protein		+10.9	+11.8	+6.2	+7.0	+6.3	+5.2	+8.5		
1	At2g40000		putatives Nematodenresistenzprotein			-6.3			-5.1				
1	At2g15620		Ferredoxinnitritreduktase			+6.1					+5.1		
1	At4g27440		Protochlorophyllidoxidoreduktase				-6.0	-8.3	-6.4	-7.4			
1	At4g32340		unbekanntes Protein					-5.3					
1	At5g25890		Indolylsigsäure induziertes Protein 28						+5.6				
1	At4g09650	ATPD	ATP-Synthase ähnliches Protein							+5.1			
2	At2g26500	PETM	Cytochrom b/f Komplex Untereinheit XII									-5.5	
1	At1g05340		unbekanntes Protein									+8.7	+6.4
1	At3g49120		Peroxidase									+8.3	
1	At2g44790		Phytocyanin									+6.3	
1	At2g21130		unbekanntes Protein									+5.8	
1	At4g20860		Berberinbrückenzym ähnliches Protein									+5.5	+5.5
1	At1g55920		Serinacetyltransferase									+5.3	
1	At5g06760		LEA ähnliches Protein									+28.5	+6.7
1	At2g35300		LEA ähnliches Protein									+10.0	
1	At5g04340		Zinkfingertranskriptionsfaktor										+16.3

64

64A



Wildtyp Ws-2 24 Gene (32 cDNA-Fragmente) in den cDNA-Array-Experimenten differenziell exprimiert (siehe Tab. 7). Während in den Phytochrommutanten *phyA* bzw. *phyB* je 19 (23 cDNA-Fragmente) und in den Cryptochrommutanten *cry1* 18 (21 cDNA-Fragmente) bzw. *cry2* 21 Gene (28 cDNA-Fragmente) differenziell exprimiert werden, sind in der Phytochromdoppelmutante *phyAB* nur 13 differenziell exprimierte Gene (15 cDNA-Fragmente) zu verzeichnen. Ebenfalls 13 Gene (16 cDNA-Fragmente) werden in der Mutante *det1* in den cDNA-Array-Experimenten differenziell exprimiert, in der PHYB-überexprimierenden Linie hingegen nur 8 Gene (siehe Tab. 7).

13 der 60 Gene zeigen in den Wildtypen abnehmende Expression bei Belichtung (Tab. 7). Den Experimenten von Bruce *et al.* (1989) entsprechend befindet sich in dieser Gruppe PHYA. Zu dieser Gruppe gehören auch eine Reihe von Genen, für die eine abnehmende Expression bei Belichtung bisher nicht beschrieben wurde. Aufgrund ihrer funktionellen Zuweisung sind diese Gene mit unterschiedlichen Stoffwechselwegen zu assoziieren (siehe Tab. 7). Für zwei der Gene erfolgte noch keine Funktionsbeschreibung. Der weitaus größere Teil der in den Wildtypen differenziell exprimierten Gene (33 Gene) zeigt bei Belichtung zunehmende Expression (Tab. 7). Zu ihnen zählen Rubisco Aktivase, *RBCS-3b* und 5 Gene der *LHC*-Genfamilie (At2g05070, At2g34420, At2g34430, At3g54890, At3g61470). Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangten auch Tobin und Silverthorne (1985) sowie Orozco und Ogren (1993, für Rubisco Aktivase). Weitere kernkodierte Gene der *LHC*-Genfamilie, der PS I- (Abk. mit *PSA* beginnend), PS II- (Abk. mit *PSB* beginnend) und des Cytochrom-b/f-Komplexes (Abk. mit *PET* beginnend) zeigen ebenfalls zunehmende Expression bei Belichtung. Unter den Genen mit zunehmender Expression bei Bestrahlung mit Weißlicht sind auch 4 Gene ohne Funktionszuordnung (Tab. 7).

Die differenziell exprimierten Gene der Photorezeptormutanten (*phyA*, *phyB*, *phyAB*, *cry1*, *cry2*) sind mit wenigen Ausnahmen (At4g09650, At4g27440, At4g32340, At5g25890) auch in den Wildtypen differenziell exprimiert (siehe Tab. 7). Insbesondere die *LHC*-Gene als Teil der Antennenkomplexe des Photosyntheseapparates weisen nicht nur in den Wildtypen sondern auch in den Photorezeptormutanten eine zunehmende Expression bei Belichtung auf. Auffällig dagegen ist, dass in der Mutante *det1* meist andere Gene differenziell exprimiert werden als in den Wildtypen, ebenso in der PHYB-überexprimierenden Linie (siehe Tab. 7). Das entspricht den Ergebnissen der Hauptkomponentenanalyse (siehe Pkt. 3.5.1).

Erstaunlicherweise zeigen einige differenziell exprimierten Gene (siehe Pkt. 3.4.5) in den Wildtypen zunehmende und in der Mutante *det1* abnehmende Expression, so z. B. zwei *LHC*-Gene (At1g29930, At2g34420). Neben diesen Genen sind in der Mutante *det1* auch eine

Reihe von Genen zu verzeichnen, die weder in Wildtypen noch Photorezeptormutanten differenziell exprimiert werden. Letzteres trifft auch auf 4 in 35S::PHYB differenziell exprimierte Gene zu (siehe Tab. 7).

### 3.5.2.2. Differenziell exprimierte Gene der Mutanten

Die Hauptkomponentenanalyse (siehe Pkt. 3.5.1) zeigt nicht nur eine veränderte Genexpression in Wildtypen und Mutanten in Abhängigkeit von der Belichtungszeit sondern auch eine veränderte Genexpression der Mutanten gegenüber den Wildtypen. Diese veränderte Genexpression wurde insbesondere für die Experimente mit Keimlingen der Mutante *det1* und den belichteten Keimlingen der transgenen PHYB-überexprimierenden Linie durch die Lage der Symbole in der Hauptkomponentenanalyse (Abb. 15 und 16) deutlich. Allerdings können auch in den Photorezeptormutanten gegenüber den Wildtypen differenziell exprimierte Gene existieren, denn die entsprechenden Experimente liegen in der Hauptkomponentenanalyse nicht übereinander. Entsprechend sind für die Analyse alle diejenigen Gene aus dem reduzierten Datensatz (304 cDNA-Fragmente) relevant, die im Vergleich zwischen Mutanten und Wildtypen das differenzielle Kriterium (siehe Pkt. 3.4.6) erfüllen. Da die Mutationen in unterschiedlichen Wildtypen erzeugt wurden (siehe Pkt. 2.1.1), ist das differenzielle Kriterium gegenüber allen drei Wildtypen zu betrachten. Die ausgewählten Gene wurden durch Sequenzierung und Datenbankvergleich überprüft und sind nach Höhe ihrer differenziellen Expression in *det1* bzw. den anderen Mutanten gegenüber den einzelnen Wildtypen in Tab. 8 dargestellt.

In der Mutante *det1* sind mit 43 der 58 Gene (54 der 71 cDNA-Fragmente) die meisten Gene differenziell gegenüber den Wildtypen exprimiert (siehe Tab. 8). Die anderen Mutanten weisen im Vergleich zu den Wildtypen 16 bis 23 differenziell exprimierte Gene auf (siehe Tab. 8).

In Tab. 8 sind Gene aufgelistet, die sowohl in der Mutante *det1* als auch in den anderen untersuchten Mutanten differenziell gegenüber den Wildtypen exprimiert sind. Zu diesen Genen zählen ein seneszenz-assoziiertes Protein (At4g35770), Thioredoxin F1 (At3g02730), Trehalose-6-phosphatphosphatase (At4g22590), ein Protein der Cobalaminbiosynthese (At5g13630) und 4 Gene des Photosyntheseapparates (At1g30380, At2g05100, At3g61470, At5g54270; siehe Tab. 8).

Im Gegensatz zu diesen 8 Genen sind eine Reihe von Genen in nur einer der untersuchten

Tab. 8: Gene, die im Vergleich der Mutanten gegenüber allen drei Wildtypen (Col-0, Ler-0, Ws-2) differenziell exprimiert sind. Dargestellt sind die Anzahl cDNA-Fragmente pro differenziell exprimiertem Gen, die Funktionszuordnung der Genprodukte laut "WUBlastn2" und die Quotienten zwischen den Signalwerten der cDNA-Array-Experimente.

58	Summe differenziell exprimierte Gene			43	22	18	17	16	21	24
71	Summe differenziell exprimierte cDNA-Fragmente			54	26	24	21	19	25	32
Anzahl cDNA-Fragmente	Gen ID	Abk.	Funktion	det1	35S::PHYB	phyA	phyAB	phyB	cry1	cry2
1	At1g62180		Adenosin-5'-phosphosulfatreduktase	77.2/24.2/25.8						
2	At5g15230		Gibberellin-reguliertes Protein 4	35.4/21.0/10.9						
2	At1g15820	LHCB6	Chlorophyll a/b-binde Protein	33.7/51.1/33.4	7.0/10.6/6.9		9.9/5.6/8.8		9.4/5.3/8.4	
2	At5g54270	LHCB3	Chlorophyll a/b-binde Protein	26.6/29.9/22.9	6.7/7.5/5.7	11.3/6.1/8.9	14.2/7.7/11.2	11.4/6.1/8.9	12.2/6.6/9.6	11.9/6.4/9.4
1	At3g58450		unbekanntes Protein	20.0/13.1/8.1	15.5/10.1/6.2					13.2/8.6/5.3
1	At3g09440		Hitzeschockprotein (HSC70-3)	19.1/18.3/12.5	8.6/8.2/5.6					
1	At3g61470	LHCA2	Chlorophyll a/b-binde Protein	16.5/13.5/8.7	16.1/13.2/8.5	6.9/15.4/22.8	8.0/17.8/26.4	8.0/17.8/26.5	10.6/23.6/35.0	6.6/14.8/22.0
1	At4g20860		Berberinbrückenenzym ähnliches Protein	14.1/38.7/21.8						
2	At1g44575	PSBS	PS II Untereinheit XVIII	13.7/13.1/16.2	14.4/13.7/17.0	6.7/6.4/7.9		6.8/6.4/8.0	7.3/6.9/8.6	8.3/7.9/9.7
1	At3g16410		putatives Lektin	13.2/9.4/19.6						
2	At4g35770		Seneszenz assoziiertes Protein	13.0/13.6/84.8	10.6/11.1/69.2	8.2/8.6/53.5	10.3/10.8/67.2	6.6/6.9/43.0	5.3/5.5/34.4	6.9/7.2/44.7
1	At5g06760		LEA ähnliches Protein	12.7/8.8/7.5						
1	At4g02770	PSAD1	PS I Untereinheit IV(1)	12.6/13.2/8.3						
1	At5g04340		Zinkfingertranskriptionsfaktor	12.5/29.4/22.4	8.3/19.5/14.9					
1	At3g01190		putative Peroxidase	12.2/9.3/6.4						
1	At2g05100	LHCB2.1	Chlorophyll a/b-binde Protein	12.2/10.5/6.4	9.7/8.3/5.1	9.8/8.9/11.5	17.4/15.7/20.3	13.3/12.0/15.5	11.4/10.3/13.3	13.5/12.2/15.8
1	At1g04250		putative Auxin indiziertes Protein	11.6/11.4/6.8						
1	At4g27440		Protochlorophyllidoxidoreduktase	11.5/41.5/33.2			12.1/5.2/5.2	12.4/5.3/5.3	12.6/5.4/5.4	
1	At5g13630		Cobalaminbiosynthese Protein	10.9/9.5/6.4	12.9/11.1/7.5	6.7/7.4/8.6	6.5/7.2/8.4	5.5/6.1/7.0	15.6/13.5/9.1	5.3/5.8/6.8
2	At3g47470	LHCA4	Chlorophyll a/b-binde Protein	10.4/7.6/5.7	9.2/6.7/5.0	9.7/7.1/5.3			9.7/7.1/5.3	11.4/8.4/6.3
1	At3g02730		Thioredoxin F1	9.3/8.3/8.6	13.3/12.6/10.1	7.3/6.6/6.8	8.7/7.8/8.0	6.3/5.7/5.8	6.0/5.4/5.6	6.9/6.1/6.4
2	At3g16420		putatives Lektin	7.8/9.5/11.9						
1	At4g23890		unbekanntes Protein	7.7/8.6/14.8					10.3/5.8/6.0	
1	At5g64570		β-Xylosidase	7.5/5.7/5.0						
1	At1g03130	PSAD2	PS I Untereinheit IV(2)	7.1/8.3/6.2						
2	At4g35250		unbekanntes Protein	7.1/5.7/5.2						
2	At4g10340	LHCB5	Chlorophyll a/b-binde Protein	6.9/8.3/7.4						
1	At1g05340		unbekanntes Protein	6.9/23.5/27.0	5.1/17.4/20.0					
1	At2g34430	LHCB1.4	Chlorophyll a/b-binde Protein	6.9/10.5/5.7		7.1/10.8/5.8				9.3/14.2/7.7
2	At1g30380	PSAK	PS I Untereinheit X	6.8/7.7/6.5	12.7/14.4/12.3	6.3/5.5/5.3	10.4/9.1/8.8	7.5/6.6/6.4	9.5/8.3/8.0	7.4/6.5/6.3
1	At1g11260		Glukosetransporter	6.8/11.0/19.8	6.1/9.8/17.6			30.3/11.1/9.1		17.4/6.4/5.2
1	At1g52230	PSAH2	PS I Untereinheit X(2)	6.7/9.9/10.0	5.2/7.6/7.7	5.9/8.7/8.7	19.1/10.5/8.8	11.9/6.5/5.5	11.5/6.3/5.3	
1	At4g21280	PSBQ1	PS II Untereinheit XVI(1)	6.7/12.8/9.0			8.0/6.7/5.5			
1	At4g18480		Protein CH42	6.6/9.7/6.8						
1	At2g44790		Phycocyanin	6.6/10.5/5.7					5.1/6.1/7.4	
1	At3g26650		Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase A	6.5/8.1/13.6						
1	At3g49120		Peroxidase	6.5/12.3/10.9						
1	At1g55920		Serinacetyltransferase	6.3/8.8/15.3						
3	At2g34420	LHCB1.5	Chlorophyll a/b-binde Protein	5.9/12.4/5.6		6.5/13.7/6.2				6.6/13.8/6.2
1	At4g27000		DNA-binde Protein	5.6/9.0/9.8						
1	At3g45970		unbekanntes Protein	5.6/5.6/6.5						
1	At4g22590		Trehalose-6-phosphatphosphatase	5.2/6.0/6.8	12.4/11.2/6.6	13.4/15.5/17.7	19.2/22.2/25.4	15.7/18.1/20.7	14.4/16.7/19.0	15.2/17.5/20.1
2	At3g17390		S-adenosylmethioninsynthetase ähnlich	5.0/7.4/6.3						
1	At1g09570		Phytochrom A		9.5/11.6/11.1	9.9/6.3/5.6	11.6/7.4/6.6			12.3/7.8/6.9
1	At2g15620		Ferredoxinnitritreduktase		7.9/10.6/11.4					6.3/8.4/9.1
1	At4g25050		Acytransportprotein ähnlich		7.1/9.2/6.4		6.9/5.4/5.5	6.2/8.1/5.6	6.5/8.4/5.8	8.4/11.0/7.6
1	At2g46820		unbekanntes Protein		6.1/7.5/5.5					8.5/10.5/7.6
1	At4g09650	ATPD	ATP-Synthase ähnliches Protein		5.8/5.7/5.3				7.1/7.1/6.6	
1	At5g04140		Ferredoxin abhängige Glutamatsynthase			13.5/5.5/7.1		14.3/5.8/7.5		
1	At3g27690	LHCB2.4	Chlorophyll a/b-binde Protein			11.6/10.5/5.8	27.3/24.8/13.6	17.6/16.0/8.8	18.8/17.1/9.4	23.2/21.1/11.6
1	At5g44440		Berberinbrückenenzym ähnliches Protein			9.9/7.6/22.2	7.4/5.7/16.7	8.1/6.2/18.3		7.9/6.0/17.7
2	At1g29930	LHCB1.3	Chlorophyll a/b-binde Protein			6.0/9.7/6.1				5.7/9.3/5.8
1	At4g28750	PSAE1	PS I Untereinheit V(1)				7.1/5.8/6.0			
1	At3g54890	LHCA1	Chlorophyll a/b-binde Protein						14.8/11.9/7.7	12.2/9.8/6.3
1	At5g25890		Indollessigsäure induziertes Protein 28						8.9/9.8/6.2	
1	At2g39730		Rubisco-Aktivase						7.1/6.9/5.3	
1	At1g50250		putative plastidäre FtsH Protease							13.2/9.1/5.7
1	At1g74690		unbekanntes Protein							10.1/9.6/7.1

Mutanten differenziell exprimiert. 19 der ausgewählten Gene (siehe Tab. 8) sind nur in der Mutante *det1* und lediglich weitere 5 Gene nur in den Mutanten *phyAB* (At4g28750), *cry1* (At2g39730, At5g25890) und *cry2* (At1g50250, At1g74690) differenziell exprimiert. Das entspricht der Hauptkomponentenanalyse (Abb. 15 und 16), die zeigt, dass die Genexpression in der Mutante *det1* deutlich von der in allen anderen Pflanzen abweicht. Erstaunlicherweise ist keines der Gene ausschließlich in der PHYB-überexprimierenden Linie differenziell exprimiert, obwohl die Hauptkomponentenanalyse für die Experimente mit belichteten Keimlingen dieser Linie ebenfalls eine abweichende Genexpression ausweist. Eine Ursache wäre möglicherweise eine Vielzahl geringerer Expressionsunterschiede.

### **3.5.2.3. Reduzierung des Datensatzes auf die Hauptkomponentenanalyse bestimmende Gene**

In den zwei vorhergehenden Abschnitten wurden Gene mit den höchsten Veränderungen in der Expression einerseits bei Belichtung der Pflanzen (siehe Pkt. 3.5.2.1) und andererseits im Vergleich zwischen Mutanten und Wildtypen (siehe Pkt. 3.5.2.2) ausgewählt, da die Hauptkomponentenanalyse hauptsächlich von diesen beeinflusst werden sollte. Entsprechend müßten die ausgewählten differenziell exprimierten Gene die Lage der Experimente in der Hauptkomponentenanalyse (siehe Pkt. 3.5.1) widerspiegeln.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die differenziell exprimierten Gene der Tab. 7 und 8 vereinigt. Mit diesem Datensatz differenziell exprimierter Gene der Weißlichtexperimente, bestehend aus 71 Genen bzw. 88 cDNA-Fragmenten (siehe Anhang: Auswahl\_Weißlicht.xls), wurde erneut eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt.

Die beiden dargestellten Komponenten geben insgesamt 77 % der Varianz des gewählten Datensatzes wieder. Obwohl der Datensatz differenziell exprimierter Gene nur noch 6 % der ursprünglichen Fragmente des cDNA-Arrays enthält, sind nur kleinere Veränderungen im Vergleich zu den in Abb. 15 und 16 dargestellten Hauptkomponentenanalysen festzustellen (vgl. Abb. 15 und 16 mit 17). Die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalysen sind einander ähnlich. Folglich bleiben trotz der Reduktion des betrachteten Datensatzes um 94 % die relevanten Informationen (siehe Pkt. 3.5.1) erhalten. D.h. die ausgewählten 71 Gene zeigen die wesentlichen Unterschiede in der Genexpression.

Nachträglich wurden die Weißlichtexperimente mit Keimlingen der Phytochromchromophormutanten *hy1* und *hy2* durchgeführt. Die Einbeziehung dieser Datensätze in die Analyse bestätigen die für die Phytochromrezeptormutanten ermittelten Ergebnisse und schließen aufgrund des Phytochromchromophordefektes der Mutanten *hy1* und *hy2* alle Phytochrome (A -E) in die Analyse mit ein (siehe Anhang: Pkt. 6.1).

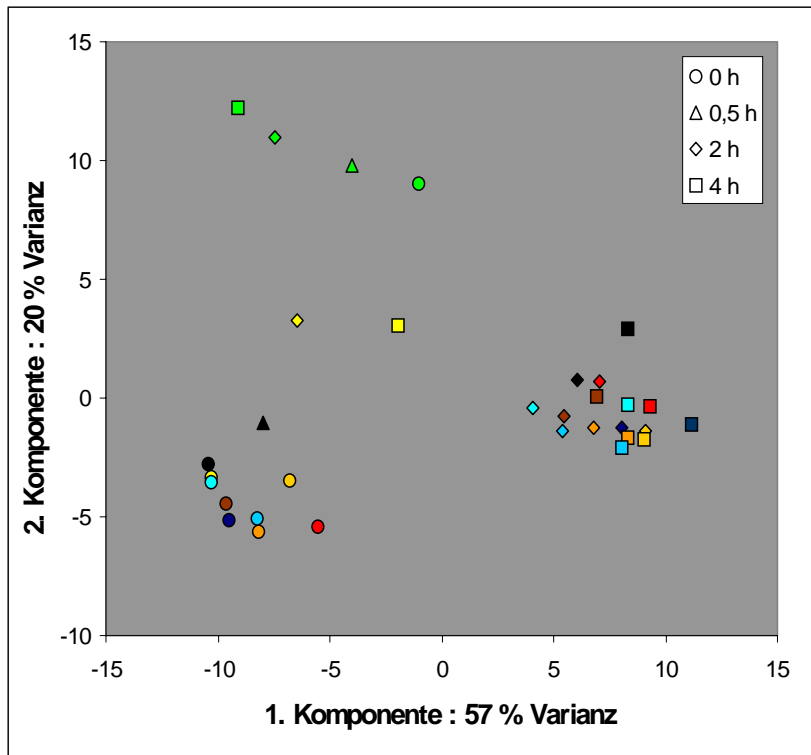


Abb. 17: Hauptkomponentenanalyse des auf 88 cDNA-Fragmente reduzierten Datensatzes. In den Experimenten zur Genexpression wurden Keimlinge der Wildtypen Col-0 (schwarz), Ler-0 (dunkelblau), Ws-2 (= *phyD*, dunkelrot), der Rotlichtrezeptormutanten *phyA* (rot), *phyB* (hy3, dunkelgelb), *phyAB* (orange), der Blaulichtrezeptormutanten *cry1* (hy4, graublau), *cry2* (*fha-1*, hellblau), der transgenen *PHYB*-überexprimierenden Linie (35S::*PHYB*, hellgelb) und der Mutante *det1* (grün) eingesetzt und mit Weißlicht für 0 h (etioliert, Kreis), 0,5 h (Dreieck, nur Col-0 und *det1*), 2 h (Rhombus) und 4 h (Quadrat) bestrahlt.

### 3.5.3. Gruppierung der differenziell exprimierten Gene

Nach der Reduktion des Datensatzes auf 71 differenziell exprimierte Gene (88 cDNA-Fragmente) wurde versucht, Gene mit ähnlichem Expressionsverhalten in Gruppen zusammenzufassen, um die Interpretation der Daten weiter zu vereinfachen. Zur Gruppierung der Gene wurde das statistische Verfahren "K-Mean Clustering" im Programm "J-Express" verwendet. Für die Gruppierung der Expressionsdaten wurde die Anzahl der zu bildenden Gruppen und eine Zufallszahl vorgegeben. Die weiteren Parameter (Initialisierungsmethode und Distanzmessung) wurden entsprechend der Standardeinstellung verwendet. Um zu einem möglichst optimalen Ergebnis bezüglich der Gruppierung von Genen mit ähnlichem Expressionsverhalten zu gelangen, wurde die Anzahl zu bildender Gruppen variiert bzw. die Zufallszahl verändert. Zur Einschätzung des Gruppierungsergebnisses wurde die Expression

der gruppierten Gene mit einem zweiten statistischen Verfahren “Closest Neighbours” in “J-Express” auf ihre Gruppierung bzw. die Abweichungen der zeitlichen Expression der Gene voneinander überprüft. Als eine optimale Lösung ergab sich die Einteilung der differenziell exprimierten Gene in 10 Gruppen. Die zeitabhängige Expression der Gene in diesen 10 Gruppen ist in Abb. 18 unterteilt nach Wildtypen Col-0, Ler-0 und Ws-2, Rotlichtrezeptormutanten *phyA*, *phyB* und *phyAB*, Blaulichtrezeptormutanten *cry1* und *cry2*, Mutante *det1*, sowie PHYB-überexprimierender Linie dargestellt. Tab. 9 enthält die differenziell exprimierten Gene gruppenweise mit ihrer jeweiligen Funktionszuordnung sowie der Identität der Nukleotidsequenz (in %) im Vergleich zur Datenbank.

Bezogen auf die Wildtypen weisen 2 Gruppen (1, 2) abnehmende, 4 Gruppen (3 - 6) annähernd konstante und 4 Gruppen (7 - 10) zunehmende Expression der ausgewählten Gene (siehe Pkt. 3.5.2.3) bei Bestrahlung mit Weißlicht auf (Abb. 18). Die Photorezeptormutanten, zu denen Phytochrom- und Cryptochrommutanten zählen, zeigen in allen Gruppen ein sehr ähnliche Genexpression im Vergleich zu den Wildtypen. Das entspricht einem Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse. Dieses ergab für Experimente mit etiolierten und belichteten Keimlingen der Wildtypen und Photorezeptormutanten jeweils eine gemeinsame Gruppe (vgl. Abb. 17). Der Vergleich der Gruppen in Abb. 18 zeigt auch, dass diese sich hauptsächlich durch die Expression der Gene in *det1* und teilweise in 35S::PHYB unterscheiden. Das wiederum ist auch Aussage der Hauptkomponentenanalyse. Die Experimente mit Keimlingen der Mutante *det1* und mit belichteten Keimlingen der PHYB-überexprimierenden Linie sind in der Hauptkomponentenanalyse (vgl. Abb. 17) Gruppen zugeordnet, die von Wildtypen und Photorezeptormutanten abweichen. Im folgenden wird dieses abweichende Expressionsverhalten der Gene in den einzelnen Gruppen analysiert.

Im Gegensatz zur sinkenden Expression der Gene der Gruppen 1 und 2 (Abb. 18) in den Wildtypen bei Belichtung ist in *det1* deren Expression annähernd konstant, allerdings auf unterschiedlichen Expressionsniveaus. In der PHYB-überexprimierenden Linie weisen die Gene der Gruppe 1 eine den Wildtypen und Photorezeptormutanten ähnliche Expression auf, während die Gene der Gruppe 2 eine geringere Abnahme der Expression bei Belichtung im Vergleich zu den Wildtypen zeigen (siehe Abb. 18).

Annähernd gleichbleibende Expressionswerte zeigen die Gene der Gruppe 3 (Abb. 18) in den Wildtypen. Ein ähnliches Expressionsverhalten wurde für diese Gene auch in der PHYB-überexprimierenden Linie nachgewiesen. In *det1* ist die Expression dieser Gene relativ konstant, allerdings um den Faktor 4 niedriger als in Wildtypen, Photorezeptormutanten und PHYB-überexprimierender Linie.

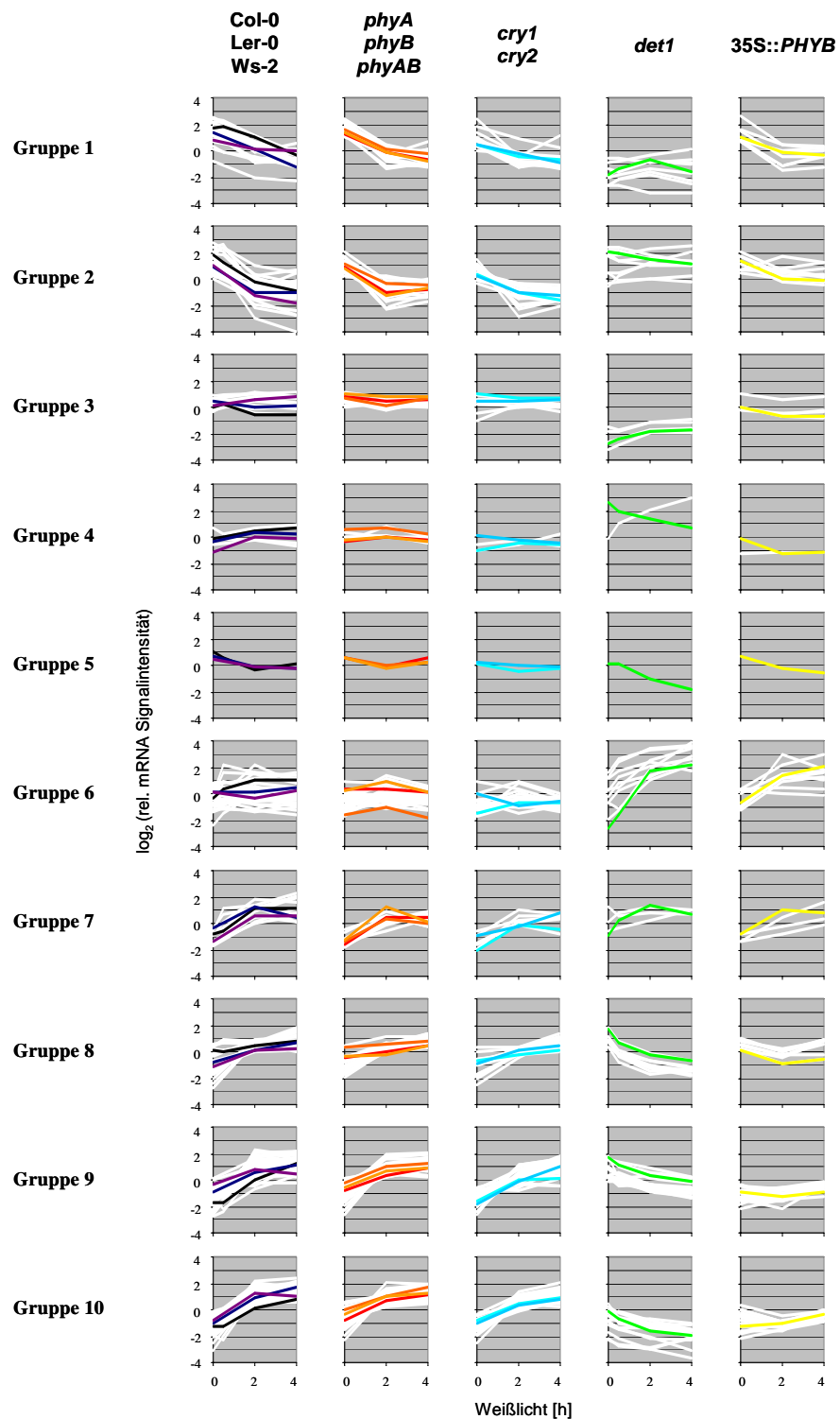


Abb. 18: Gruppenweise Darstellung der Expression der 71 differenziell exprimierten Gene (88 cDNA-Fragmente) für die Keimlinge (5 d) der Wildtypen Col-0, Ler-0 und Ws-2; der Rotlichtrezeptormutanten *phyA*, *phyB* und *phyAB*; der Blaulichtrezeptormutanten *cry1* und *cry2*; der Mutante *det1* sowie der PHYB-überexprimierende Linie bei Bestrahlung mit Weißlicht. Die Signalintensitäten wurden logarithmisch ( $\log_2$ ) über die Zeit abgebildet. Für jede Gruppe wurde der typische zeitliche Verlauf der Expression durch die farbige Markierung eines Genes dargestellt. Die Farbwahl für Wildtypen und Mutanten entspricht der in Abb. 17.

Tab. 9: Zuordnung der differenziell exprimierten Gene zu den Gruppen 1 bis 10, sowie Funktionszuordnung der Genprodukte laut "WUBlastn2" und Identität der Nukleotidsequenz (in %) im Vergleich zur Datenbank (MIPS). Die mit "✓" gekennzeichneten cDNA-Fragmente wurden durch Sequenzierung und Datenbankvergleich überprüft.

Gruppe	Gen	Abk.	Funktion	Identität	
1	At1g04250		putativ Auxin induziertes Protein	91 %	✓
1	At1g09570	<i>PHYA</i>	Phytochrom A	95 %	✓
1	At3g01190		putative Peroxidase	96 %	✓
1	At3g58450		putatives Protein	99 %	✓
1	At4g27440	<i>PORB</i>	Protochlorophylidoxidoreduktase	94 %	✓
1	At4g36900		TINY-ähnliches Protein	82 %	✓
1	At5g15230		Gibberellin-reguliertes Protein 4	100 %	✓
1	At5g44440		Berberinbrückenenzym-ähnliches Protein	91 %	✓
2	At1g11260		Glukosetransporter	97 %	✓
2	At2g40000		putatives Nematodenresistenzprotein	99 %	✓
2	At2g44790		Phytocyanin	98 %	✓
2	At3g45970		unbekanntes Protein	100 %	✓
2	At4g23890		unbekanntes Protein	99 %	✓
2	At4g32340		unbekanntes Protein	99 %	✓
2	At4g35770		Seneszenz-assoziertes Protein sen1	99 %	✓
2	At5g25265		unbekanntes Protein	96 %	✓
2	rps7-01		30S ribosomales Protein S7 (plastidär)	61 %	✓
3	At3g16410		putatives Lektin	97 %	✓
3	At3g16420		putatives Lektin	96 %	✓
3	At3g17390		putative S-Adenosylmethioninsynthetase	94 %	✓
4	At3g26650		Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase A	99 %	✓
4	At3g49120		Peroxidase	99 %	✓
5	At5g64570		β-Xylosidase	99 %	✓
6	At1g05340		unbekanntes Protein	100 %	✓
6	At1g55920		Serin-acetyltransferase	99 %	✓
6	At1g62180		putative Adenosin-5'-phosphosulfatreduktase	98 %	✓
6	At2g21130		Cyclophilin	72 %	✓
6	At2g35300		ähnlich zu LEA-Proteinen	99 %	✓
6	At3g09440		Hitzeschockprotein (At-hsc70-3)	100 %	✓
6	At4g20860		Berberinbrückenenzym-ähnliches Protein	100 %	✓
6	At5g04340		putativer Zinkfingertranskriptionsfaktor	99 %	✓
6	At5g06760		ähnlich zu LEA -Protein	99 %	✓
6	At5g57685		unbekanntes Protein	96 %	✓



Fortsetzung Tab. 9:

Gruppe	Gen	Abk.	mgl. Funktion	Identität	
7	At1g50250		putative chloroplastidäre FtsH-Protease	100 %	✓
7	At2g40080		unbekanntes protein	91 %	✓
7	At5g04140		Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase	78 %	✓
7	At5g25890		Indolyllessigsäure induziertes Protein 28	100 %	✓
8	At1g29930*	<i>LHCB1.3</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	98 %	✓
8	At2g26500*	<i>PETM</i>	Cytochrom b/f Komplex Untereinheit XII	100 %	✓
8	At2g34420	<i>LHCB1.5</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	100 %	✓
8	At2g34430	<i>LHCB1.4</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	95 %	✓
8	At4g10340	<i>LHCB5</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	100 %	✓
9	At1g20340*	<i>PETE1</i>	Cytochrom b/f Komplex Untereinheit V(1)	100 %	✓
9	At1g30380	<i>PSAK</i>	Photosystem I Untereinheit X	86 %	✓
9	At2g05100	<i>LHCB2.1</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	93 %	✓
9	At2g15620		Ferredoxin-Nitrit Reduktase	98 %	✓
9	At2g30570	<i>PSBW</i>	Photosystem II Untereinheit XXII	99 %	✓
9	At2g39730		Rubisco-Aktivase	95 %	✓
9	At2g46820		unbekanntes Protein	96 %	✓
9	At3g02730		Thioredoxin	99 %	✓
9	At3g27690	<i>LHCB2.4</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	96 %	✓
9	At3g54890	<i>LHCA1</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	100 %	✓
9	At4g22590		ähnlich Trehalose-6-phosphatphosphatase	92 %	✓
9	At4g25050		Acyl-Carrier-ähnliches Protein	100 %	✓
9	At4g28750	<i>PSAE1</i>	Photosystem I Untereinheit V	99 %	✓
9	At4g35250		unbekanntes Protein	99 %	✓
9	At5g38410	<i>RBCS3b</i>	Ribulosebiphosphat-Carboxylase kl. Untereinheit 3b	97 %	✓
10	At1g03130	<i>PSAD2</i>	Photosystem I Untereinheit IV(2)	99 %	✓
10	At1g15820	<i>LHCB6</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	99 %	✓
10	At1g31330	<i>PSAF</i>	Photosystem I Untereinheit VI	99 %	✓
10	At1g44575	<i>PSBS</i>	Photosystem II Untereinheit XVIII	100 %	✓
10	At1g52230	<i>PSAH2</i>	Photosystem I Untereinheit VIII(2)	100 %	✓
10	At1g74690		unbekanntes Protein	60 %	✓
10	At3g17390		putative S-Adenosylmethioninsynthetase	91 %	
10	At3g47470	<i>LHCA4</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	96 %	✓
10	At3g61470	<i>LHCA2</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	95 %	✓
10	At4g02770	<i>PSAD1</i>	Photosystem I Untereinheit IV(1)	99 %	✓
10	At4g09650	<i>ATPD</i>	ATP-Synthase-Komplex Untereinheit $\delta$	100 %	✓
10	At4g10340	<i>LHCB5</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	98 %	✓
10	At4g18480		Protein ch-42-Vorläufer, Chloroplast	98 %	✓
10	At4g21280	<i>PSBQ1</i>	Photosystem II Untereinheit XVI(1)	96 %	✓
10	At5g13630		Cobalamin-Biosynthese-Protein	98 %	✓
10	At5g54270	<i>LHCB3</i>	Chlorophyll-a/b-bindendes Protein	97 %	✓

Die Gene der Gruppe 4 zeigen ebenfalls nur geringe Veränderungen im Expressionsverhalten in Wildtypen, Photorezeptormutanten und transgener Linie. Allerdings sind die beiden Gene in der Mutante *det1* deutlich unterschiedlich exprimiert. In Gruppe 5 ist nur ein Gen enthalten, d.h. keines der anderen ausgewählten Gene zeigt eine zu diesem Gen ähnliche Expression.

In Gruppe 6 (Abb. 18) ist das Expressionsverhalten der Gene in den Wildtypen annähernd konstant. Im Gegensatz dazu steigen bei Belichtung die Expressionswerte in der Mutante *det1* und der transgenen PHYB-überexprimierenden Linie an. Ebenfalls zunehmend bei Belichtung sind die Expressionswerte für die Gene der Gruppe 7 (Abb. 18), jedoch nicht nur in *det1* und 35S::PHYB sondern auch in den Wildtypen und Photorezeptormutanten.

Die relative mRNA-Abundanz der Gene der Gruppen 8 bis 10 (Abb. 18) ist zunehmend in Wildtypen und den Photorezeptormutanten. Im Gegensatz hierzu sind bei Belichtung die Expressionswerte in der Mutante *det1* abnehmend. In der PHYB-überexprimierenden Linie wurde eine annähernd konstante bzw. im Vergleich zu den Wildtypen nur wenig zunehmende Expression für diese Gene ermittelt.

Eine Einordnung der Gruppen in einen biologischen Zusammenhang ist schwierig. In einer Reihe von Gruppen sind den Genen unterschiedlichste Funktionen (Tab. 9) zugeordnet, so dass die Genprodukte verschiedenen Stoffwechselwegen zugeordnet werden müssen. Ein weiteres Problem für die biologische Analyse der Gruppen sind die durch die verwendeten Gene nur unvollständig repräsentierten Stoffwechselwege. Auffällig ist die Häufung von Genen des Photosyntheseapparates in den Gruppen 8 bis 10 (Tab. 9). Für diese Gene ist eine sehr ähnliche Expression bei Belichtung in den Wildtypen und Mutanten gezeigt (Abb. 18), was auf eine mögliche Ko-Regulation dieser Gene schließen lässt.

Der gruppenweise Vergleich der Genexpression in Wildtypen und Mutanten zeigt, dass analog zur Hauptkomponentenanalyse (Abb. 17) zwischen Wildtypen und Photorezeptormutanten nur geringe Unterschiede festzustellen sind. Folglich haben die Mutationen in den Photorezeptorgen kaum Einfluss auf die Expression der analysierten Gene (Abb. 18, siehe Pkt. 4.8 und 4.10). Gleiches gilt für die Gene der Gruppe 1, 3 bis 5 und 7 in der PHYB-überexprimierenden Linie, während die Gene der Gruppe 2, 6, 8 bis 10 eine veränderte Genexpression aufweisen. Weil das überexprimierte *PHYB* die einzige bekannte genetische Veränderung der transgenen Linie gegenüber den Wildtypen darstellt (Wagner *et al.* 1991), ist die veränderte Expression dieser Gene als PHYB-spezifisch einzustufen. Allerdings zeigen die Gene der Gruppen 2, 6, 8 bis 10 auch in der Mutante *det1* eine gegenüber den Wildtypen veränderte Genexpression. Entsprechend ist das Expressionsprofil dieser Gene sowohl

PHYB- auch als DET1-spezifisch. Die Genexpression in den Gruppen 2 und 7 bis 10 ist in der Mutante *det1* und der PHYB-überexprimierenden Linie jeweils unterschiedlich bei Belichtung. Im Gegensatz zur transgenen Linie sind in *det1* auch die Gene der Gruppen 1 und 3 bis 6 durch eine veränderte Genexpression im Vergleich zu Wildtypen und Photorezeptormutanten gekennzeichnet. Folglich ist das Expressionsverhalten dieser Gene ebenfalls als DET1-spezifisch einzustufen. Somit sind alle ausgewählten differenziell exprimierten Gene von der Mutation des DET1-Genes betroffen. Inwieweit die Beeinflussung der Genexpression direkt oder indirekt durch DET1 erfolgte, kann durch diese Experimente nicht beantwortet werden.

Nicht nur mit Beginn der Belichtung sondern auch während der Belichtungsphase ist eine Veränderung der Genexpression in den Pflanzen unabhängig von den jeweiligen Mutationen festzustellen. Der Anstieg der relativen mRNA-Expression unterscheidet sich häufig deutlich zwischen den Zeitintervallen 0 h bis 2 h und 2 h bis 4 h (siehe Abb. 18: Gruppen 1, 2 und 6 bis 10). Möglicherweise existieren in den untersuchten Zeitintervallen mindestens zwei Mechanismen zur Steuerung der Genexpression bei Belichtung.


Mit der Gruppierung der ausgewählten differenziell exprimierten Gene wurde eine ausgeprägte Ko-Expression von Genen bei Belichtung festgestellt. Die vergleichende Analyse der Genexpression der Gruppen zwischen Wildtypen und Photorezeptormutanten zeigte kaum Unterschiede. Im Gegensatz hierzu unterlagen die ausgewählten, differenziell exprimierten Gene bei Bestrahlung mit Weißlicht in der Mutante *det1* im Vergleich zu Wildtypen und Photorezeptormutanten einer generellen Veränderung der Genexpression. In der PHYB-überexprimierenden Linie traf dies nur auf die Gene der Gruppen 2, 6, 8 bis 10 (Abb. 18) zu. Aus der Steuerung der Expression derselben Gene durch DET1 und PHYB sowie der Veränderung der Genexpression während der Belichtungsphase kann geschlussfolgert werden, dass mindestens zwei Mechanismen für die Steuerung der ausgewählten, differentiell exprimierten Gene verantwortlich sind.

#### **3.5.4. Vergleich von Array- und Northern-Blot-Experimenten**

Zur Überprüfung der Ergebnisse der cDNA-Array-Experimente und der cDNA-Array-Technik als Methode wurde die klassische Northern-Blot-Methode angewendet, da diese seit Jahren erprobt und die methodische Umkehrung zur Array-Technik ist. Die Durchführung des

Experimentes erfolgte nach Sreenivasulu *et al.* (2002) mit totalRNA von 0 h und 4 h belichteten Keimlingen der Wildtypen Ler-0 und Col-0, der Phytochrommutanten (*phyA*, *phyB*, *phyAB*), der Mutante *det1* und der *PHYB*-überexprimierenden Linie. Als radioaktiv mit  $^{33}\text{P}$  markierte Sonden wurden das *LHCA3*-Gen bzw. ein rDNA-Fragment eingesetzt. Nach Hybridisierung der Sonden, Aufzeichnung und Bestimmung der Signalwerte wurden die *LHCA3*-Werte anhand der rRNS-Werte normalisiert (Tab. 10). Hierfür wurde der höchste Wert des Northern-Blot-Experimentes (*phyAB*, 4h) zu 100 % und alle anderen Messwerte gegenüber diesem in Relation gesetzt. Dasselbe erfolgte für die normalisierten Hybridisierungswerte des *LHCA3*-Genes der cDNA-Array-Weißlichtexperimente. Um die Ergebnisse von Northern-Blot- und cDNA-Array-Experimenten miteinander vergleichen zu können, wurden die Quotienten der relativen mRNA-Expression für Wildtypen und Mutanten zwischen belichteten (4 h) und etiolierten (0 h) Keimlingen berechnet. Bei Quotienten kleiner 1 sind die Expressionswerte abnehmend bei Belichtung.

Tab. 10: Vergleich der Ergebnisse von Northern-Blot- und cDNA-Array-Experimenten anhand von Hybridisierungsergebnissen des *LHCA3* Genes. Links die zugehörigen Northern-Blot-Hybridisierungen mit dem *LHCA3*- und rDNA-Fragment. Die Zuordnung der Proben entspricht den Zeilen in der Tabelle. Pfeile zeigen die Richtung der Expression bei Belichtung (zunehmende Expression - schwarze Pfeile, abnehmende Expression - rote Pfeile).

rDNA	<i>LHCA3</i>	<i>LHCA3</i> in Experiment	Weißlicht [h]	Quotient Northern- Blot	Northern-Blot [ $\%$ max. Signal]	cDNA-Array [ $\%$ max. Signal]	Quotient cDNA- Array		
	<i>LHCA3</i>	35S:: <i>PHYB</i>	4 h	0,59	↓	41,7	44,9	↓	
		35S:: <i>PHYB</i>	0 h		71,2	64,0	0,70		
		<i>phyAB</i>	4 h	3,02	↑	100,0	100,0	↑	1,65
		<i>phyAB</i>	0 h		33,1	60,7			
		<i>phyB</i>	4 h	4,02	↑	87,6	87,3	↑	3,38
		<i>phyB</i>	0 h		21,8	25,9			
		<i>phyA</i>	4 h	6,74	↑	69,6	85,4	↑	8,58
		<i>phyA</i>	0 h		10,3	10,0			
		<i>det1</i>	4 h	0,14	↓	7,5	0,0	↓	0,00
		<i>det1</i>	0 h		53,1	54,7			
		Ler-0	4 h	2,80	↑	51,8	108,1	↑	7,23
		Ler-0	0 h		18,5	15,0			
		Col-0	4 h	1,48	↑	23,9	90,0	↑	6,03
		Col-0	0 h		16,2	14,9			

Die Quotienten zeigen im Vergleich der Methoden jeweils diesselbe Richtung der Expression (Pfeile in Tab. 10) des *LHCA3* Genes in Wildtypen und Mutanten bei Belichtung. Dabei sind die relativen mRNA-Expressionswerte für Wildtypen und Photorezeptormutanten zunehmend, für die Mutante *det1* und die transgene Linie abnehmend. Somit bestätigte das Northern-Blot-Experiment die mittels cDNA-Array erzielten Ergebnisse und das unterschiedliche Expressionsverhalten der Gene in den Wildtypen, den Phytochrommutanten, der Mutante *det1* und der PHYB-überexprimierende Linie (Tab. 10).

### 3.5.5. Untersuchung von ko-exprimierten Genen auf gemeinsame Promotorelemente

Ähnliche Expressionsprofile waren die Voraussetzung für die Bildung von Gruppen ko-exprimierter Gene (siehe Abb. 18). Eine mögliche Ursache für die Ko-Expression der Gene könnte eine gemeinsame Regulation der Transkription sein, vermittelt durch Transkriptionsfaktoren, die an gemeinsame Promotorelemente binden.

Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden zunächst 500 bp oberhalb des Startkodons aus der genomischen Sequenz von Arabidopsis (MIPS) für alle ausgewählten differenziell exprimierten Gene (siehe Pkt. 3.5.3) extrahiert und diese gruppenweise mit dem Programm "Meme" nach gemeinsamen Promotorelementen durchsucht. Für diese Suche wurde die zu erwartende Länge der Bindestelle vorgegeben. Zur Bestimmung dieses Wertes wurde von einer Größe der Transkriptionsfaktoren von 500 aa ausgegangen. Bei einer durchschnittlichen molaren Masse von  $100 \text{ g mol}^{-1} \text{ aa}^{-1}$  und einer Dichte der Proteine von etwa  $1,3 \text{ g cm}^{-3}$  besitzt ein globuläres Protein einen Durchmesser von ca. 5 nm. Folglich können bei einem Basenabstand von 0,34 nm innerhalb der DNA-Doppelhelix etwa 15 bp bedeckt werden. Dementsprechend wurde die Länge der gesuchten Promotorelemente auf maximal 15 bp festgelegt. Um die Spezifität der Bindestelle zu wahren und nicht jede beliebige Sequenzfolge aufgrund ihres statistischen Vorkommens zu favorisieren, wurden nur Promotorelemente einer Mindestlänge von 5 bp berücksichtigt. Die Anzahl der zu findenden Promotorelemente wurde auf maximal 10 pro Promotorsequenz begrenzt. Für alle übrigen Parameter (erwartete Verteilung, Anzahl der Motive, DNA-Strang und Palindrome) wurden Standardeinstellungen benutzt. Zur Bewertung der gefundenen Sequenz wurde ein von "Meme" berechneter Erwartungswert verwendet. Aufgrund der niedrigen Genzahl wurden die Promotoren der Gene der

Tab. 11: Zusammenfassung der Promotorelementsuche mittels "Meme". Die Promotorelemente sind den Gruppen der Weißlichtexperimente (siehe Abb. 18) zugeordnet. Jedes Motiv ist durch die Anzahl der Gene (Promotoren) mit diesem Motiv, der Sequenz mit dem niedrigsten Erwartungswert innerhalb der Gruppe und dem Erwartungswert des Motivs für die gesamte Gruppe beschrieben.

<b>Gruppe</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
Gruppenmitglieder	9	10	3	10
Motivmitglieder	7	8	3	9
Motiv 1	AATCCTCCGCA	TCTTCTCTCCTCCGC	CTCGTGGATCAG	TCTTCCTTCTTTTC
Erwartungswert	5800	27	340	3,1
Motivmitglieder		8	3	7
Motiv 2		TTTGTGTCTGTATGT	GGACCACCGCG	ACACGTGTCGACCT
Erwartungswert		1500	1200	79
Motivmitglieder				10
Motiv 3				AACACACACACTTTC
Erwartungswert				330
Motivmitglieder				4
Motiv 4				CAAACCTAGCCGC
Erwartungswert				8000
<b>Gruppe</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
Gruppenmitglieder	4	5	15	16
Motivmitglieder	4	5	15	13
Motiv 1	CTCACGCGCGTG	CCACAACCAAT	GCCACGTGGCC	CCACGTGTCGATTCC
Erwartungswert	500	1200	$8,4 \times 10^{-4}$	$7,2 \times 10^{-6}$
Motivmitglieder		5	15	16
Motiv 2		CGCCACAC	TGTCTCTCTCTTTC	AGCCAAATCAGA
Erwartungswert		1900	0,16	3,7
Motivmitglieder		5	10	14
Motiv 3		TCAATACCAAACGAT	ACTGCCACGAG	GGAGGAGA
Erwartungswert		7800	770	140
Motivmitglieder			14	16
Motiv 4			CCACAAAA	AGAGAAAAAAACAGA
Erwartungswert			3200	0,26
Motivmitglieder				8
Motiv 5				TCTAAATCTCCTCTC
Erwartungswert				98

Gruppen 4 und 5 (Abb. 18, Tab. 9) nicht auf gemeinsame Promotorelemente untersucht.

Die Ergebnisse der Promotorelementsuche für die Gene der Gruppen 1 bis 3 und 6 bis 10 sind in Tab. 11 zusammengefasst (siehe Anhang: Motive\_Gruppen.xls). Jedes mit “Meme” gefundene Motiv wurde durch die Anzahl der Gene mit diesem Motiv, der Sequenz mit dem niedrigsten Erwartungswert innerhalb der Gruppe und dem Erwartungswert des Motivs für die gesamte Gruppe charakterisiert. Tab. 11 zeigt, dass pro Gruppe bis zu 5 Motive für gemeinsame Promotorelemente durch “Meme” gefunden wurden. Die Erwartungswerte der meisten Motive sind relativ hoch und somit von geringer Relevanz. Lediglich für jeweils die ersten Motive in den Gruppen 9 und 10 sind die Erwartungswerte (Gruppe 9:  $8,4 \times 10^4$  bzw. Gruppe 10:  $7,2 \times 10^6$ ) wesentlich geringer als 1.

Mit dem niedrigsten Erwartungswert wurde für 13 der 16 Gene (81 %) in Gruppe 10 ein Promotorelement gefunden, dass von der mit CCACGTGG definierten G-Box nur um ein Nukleotid abweicht (Tab. 11). Über die G-Box erfolgt die Beeinflussung der Transkription einer Reihe von Genen und die Regulation verschiedener Stoffwechselwege als Antwort auf unterschiedliche (Umwelt-) Faktoren u. a. Licht (zur Übersicht siehe Siberil *et al.* 2001). Die vollständige G-Box wurde ebenfalls als mögliches Promotorelement der 15 Gene der Gruppe 9 (Motiv 1, Tab.8) identifiziert. Ein weiteres G-Box-ähnliches Element wurde in 7 Promotoren von insgesamt 10 Genen der Gruppe 6 (Motiv 2, Tab. 11) gefunden. Aufgrund der geringen Sequenzidentität zwischen den Elementen einzelner Promotoren (siehe Anhang: Motive\_Gruppen.xls) und dem daraus resultierenden hohen Erwartungswert wird diese Gruppe im folgenden nicht näher analysiert. Die Gruppen 9 und 10 enthalten vornehmlich kernkodierte Gene für Proteine des Photosyntheseapparates. In Gruppe 8 sind ebenfalls kernkodierte Gene für Proteine des Photosyntheseapparates (Tab. 9) enthalten. Für diese Gene wurde keine G-Box als Promotorelement gefunden (Tab. 11), obwohl die Gene der Gruppe 8 im Vergleich zu den Genen der Gruppe 9 und 10 ein ähnliches Expressionsverhalten zeigen (vgl. Abb. 18).

Mit dem niedrigsten Erwartungswert (1200) für die Gene der Gruppe 8 wurde die CAAT-Box (Motiv 1, Tab. 11) identifiziert. Für den CBF-Komplex (“CAAT-box binding factor”), der an die mit (C)CAAT definierte Sequenz bindet, wurde ebenfalls eine lichtabhängige Steuerung der Transkription von *ATPC* gezeigt (Kusnetsov *et al.* 1999). Die CAAT-Box wurde auch für die Gene der Gruppe 10 (Motiv 2, Tab. 11) in der Promotorelementsuche gefunden, nicht aber für die Gene der Gruppe 9. Allerdings sind die Erwartungswerte für die CAAT-Boxen relativ hoch (1200 bzw. 3,7; siehe Tab. 11) und die Position der CAAT-Bindestelle in den Promotoren der Gene von Gruppe 8 und 10 sehr uneinheitlich (siehe Anhang:

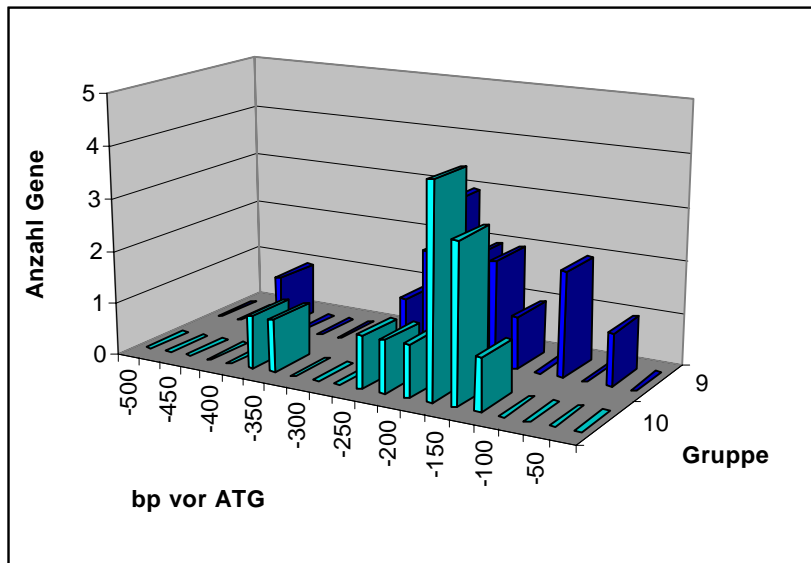


Abb. 19: Häufigkeitsverteilung der Position der G-Box im Promotor der Gene der Gruppen 9 und 10 dargestellt in Intervallen zu 25 bp. Die Zahlenwerte der Abszisse entsprechen der jeweiligen Untergrenze des Intervalls.

Tab. 12: Ergebnis der Promotorelementsuche mit dem Programm "Meme". Farblich markierte Nukleotide entsprechen den Nukleotiden einer G-Box. Die Konsensus-Sequenz wurde für die Gruppen 9 und 10 doppelt, die vollständige G-Box innerhalb der Gruppen einfach unterstrichen.

Gruppe	Gen-ID	Abk.	Strang	Position	Sequenz
9	At5g38410	<i>RBCS3b</i>	+	- 211	<u>GCCACGTGGCC</u>
9	At4g35250		-	- 75	<u>GCCACGTCAGC</u>
9	At2g46820		+	- 192	<u>GCCACGTCAGC</u>
9	At3g54890	<i>LHCA1</i>	+	- 174	<u>GACACGTGGCC</u>
9	At3g27690	<i>LHCB2.4</i>	-	- 129	<u>GACACGTCAGC</u>
9	At2g30570	<i>PSBW</i>	+	- 217	<u>GACACGTGGAG</u>
9	At1g30380	<i>PSAK</i>	+	- 167	<u>GACACGTCAGC</u>
9	At1g20340	<i>PETE1</i>	+	- 203	<u>GCCATGTCACG</u>
9	At4g28750	<i>PSAE1</i>	-	- 160	<u>GCCACGTGTAC</u>
9	At2g39730	Rubiscoaktivase	+	- 245	<u>TCCACGTGGAC</u>
9	At4g25050		-	- 239	<u>GCCAGTGACA</u>
9	At4g22590		+	- 407	<u>GACATGTCAAG</u>
9	At2g05100	<i>LHCB2.1</i>	-	- 227	<u>GCCATCTGGCA</u>
9	At2g15620		-	- 37	<u>GAGACGTGCGG</u>
9	At3g02730		+	- 86	<u>GAGACCTCACA</u> <u>GCCACGTGACC</u>
10	At4g09650	<i>ATPD</i>	+	- 221	<u>CCACGTGTCGATTCC</u>
10	At1g52230	<i>PSAH2</i>	+	- 165	<u>CCACGTGGCATTTC</u>
10	At4g21280	<i>PSBQ1</i>	-	- 150	<u>CCACGTGTCATTTTT</u>
10	At5g13630		+	- 198	<u>CCACGTGTCCTTCCC</u>
10	At1g15820	<i>LHCB6</i>	+	- 322	<u>CCACGTGTCATTTTA</u>
10	At3g17390		+	- 166	<u>CCAAGTGTGATTTT</u>
10	At1g44575	<i>PSBS</i>	-	- 123	<u>CCAATTGTCCTTTCC</u>
10	At3g47470	<i>LHCA4</i>	+	- 112	<u>CCAAGTCTTATTTCT</u>
10	At4g02770	<i>PSAD1</i>	+	- 349	<u>CCAAGTTTCAATCTT</u>
10	At3g61470	<i>LHCA2</i>	-	- 174	<u>GCACGTGGCAACTTC</u>
10	At1g03130	<i>PSAD2</i>	-	- 151	<u>CCAAGATTTCGATTCT</u>
10	At5g54270	<i>LHCB3</i>	+	- 124	<u>CCACCTCTCTTCTCA</u>
10	At1g31330	<i>PSAF</i>	+	- 130	<u>CCACTTCTCTTATCT</u> <u>CCACGTGTCATTTCT</u>



Motive\_Groupen.xls), sodass im folgenden nur die G-Box näher analysiert wurde.

Die Häufigkeit der G-Box ist in bestimmten Intervallen vor dem Startkodon der Gene für beide Gruppen signifikant erhöht (Abb. 19). Während die Häufigkeitsverteilung für die G-Box als Promotorelement der Gene der Gruppe 9 ein Maximum bei -225 bis -175 bp besitzt, ist für das G-Box-ähnliche Promotorelement der Gruppe 10 ein Maximum bei -175 bis -150 bp (-100 bp) zu verzeichnen.

In Tab. 12 sind die Gene der Gruppen 9 und 10 mit ihrem durch “Meme” gefundenen Promotorelement aufgelistet. Die vollständige G-Box ist nur vor den Genen *RBCS3b* (Gruppe 9: At5g38410), Rubiscoaktivase (Gruppe 9: At2g39730) und *PSAH2* (Gruppe 10: At1g52230) enthalten. *PSAH2* besitzt sogar eine zweite vollständige G-Box (Pos. -110). Auch Rubiscoaktivase enthält außer der G-Box bei -245 bp noch ein G-Box ähnliches Promotorelement. Ebenso besitzt *PSBQ1* neben der G-Box ähnlichen Sequenz (Tab. 12) noch eine G-Box bei -171 vor dem Startkodon (siehe Pkt. 3.5.6).

Der Vergleich der durch “Meme” ausgewählten möglichen Promotorelemente zeigt, dass die G-Box selten vollständig enthalten ist. Die G-Box (CCACGTGG) ist Teil der mit CANNTG definierten E-Box, die in nichtpflanzlichen Systemen als Promotorelement für bHLH Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichsten zellulären Prozessen dient (Atchley und Fitch 1997). Doch auch die E-Box ist nicht allen Sequenzen der Tab. 12 gemeinsam.

### **3.5.6. Expressionsprofil von Genen mit G-Box und G-Box-ähnlichen Promotorelementen**

Die Analyse ko-exprimierter Gene auf gemeinsame Promotorelemente ergab mit der G-Box bzw. G-Box-ähnlichen Sequenzen ein mögliches Promotorelement für die Gene der Gruppen 9 und 10 (Abb. 18, Tab. 9). Literaturdaten deuten auf einen möglichen Zusammenhang von Photorezeptoren und G-Box-Promotorelement, indem die Photorezeptoren an Transkriptionsfaktoren bzw. deren Inhibitoren binden und somit die Bindung an die G-Box sowie die Transkription von Genen beeinflussen (Oyama *et al.* 1997, Chattopadhyay *et al.* 1998, Ang *et al.* 1998, Ni *et al.* 1998, 1999, Martinez-Garcia *et al.* 2000, Zhu *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001; vgl. Pkt. 1 und 4). Diesem Sachverhalt entsprechend wurden alle Gene mit G-Box im Promotorbereich untersucht, ob ihr Expressionsverhalten mit dem der Gene der Gruppen 9 und 10 (Abb. 18, Tab. 9) übereinstimmt und somit die G-Box das wesentliche bestimmende Promotorelement für das gefundene Expressionsverhalten ist.

Hierfür wurden jeweils 500 bp vor dem Startkodon für alle Gene von Arabidopsis (MIPS) aus der genomischen Sequenz extrahiert und zunächst nach dem palindromischen G-Box-Element durchsucht. Das vollständige G-Box-Element wurde in Promotoren von 250 Genen gefunden, von denen noch 47 % ohne beschriebene Funktion sind (siehe Anhang: G-Box.xls). Die Membranserie "2B" enthielt 21 der 250 Gene in 37 cDNA-Fragmenten. 33 der 37 Fragmente waren durch Sequenzierung und Datenbankvergleich verifiziert. Nicht überprüfte cDNA-Fragmente wurden von der folgenden Auswertung ausgeschlossen. Um die Datensicherheit gewährleisten zu können, wurden die beiden Sicherheitskriterien (siehe Pkt. 3.4.6) angewendet. Dagegen wurde das Kriterium für differenzielle Expression (siehe Pkt. 3.4.6) eines Genes vernachlässigt, um die Daten nicht einseitig zu analysieren. Folglich wurden alle Gene des cDNA-Arrays mit diesem Promotorelement unabhängig von ihrer Expression in die Auswertung einbezogen.

Diese Kriterien erfüllten 12 der 21 Gene (21 der 37 cDNA-Fragmente; siehe Anhang: G\_Box.xls). In Tab. 13 ist die G-Box-Position und die G-Box umgebende Sequenz der Promotoren der Gene dargestellt. Vier der Promotoren (*PSAH2*, *PSBQ1*, *RBCS3b* und *At2g39730*) waren bereits in Gruppe 9 bzw. 10 (Tab. 12) enthalten. Weitere vier mit G-Box konnten Genen von Proteinen des Photosyntheseapparates (*PSAG*, *PSAH1*, *PSBP*, *LHCA3*) zugeordnet werden (Tab. 13). Diese vier zählten aufgrund des differenziellen Kriteriums (siehe Pkt. 3.4.6) nicht zu den ausgewählten differenziell exprimierten 71 Genen (88 cDNA-Fragmenten). Neben den beiden Genen *RBCS3b* und Rubiscoaktivase besitzt mit *RBCS1* ein weiteres Gen, dessen Produkt an der Carboxylierungsreaktion des Calvin-Zyklus beteiligt

Tab. 13: Gene des cDNA-Arrays, die eine vollständige G-Box-Sequenz im Promotor enthalten. Angegeben ist die Position der G-Box bezüglich des Startkodons (+1) und die umgebende Sequenz.

Gen-ID	Abk.	Position	5'	G-Box	3'
At1g52230	<i>PSAH2</i>	- 165	ATAAT	CCACGTGG	CATTT
At4g21280	<i>PSBQ1</i>	- 171	TCTTG	CCACGTGG	CTTTA
At5g38410	<i>RBCS3b</i>	- 211	TTCTG	CCACGTGG	CCTTA
At2g39730	Rubiscoaktivase	- 245	ATATT	CCACGTGG	ACCAA
At1g06680	<i>PSBP</i>	- 193	ATCTG	CCACGTGG	CACAA
At1g55670	<i>PSAG</i>	- 486	GCATT	CCACGTGG	CTTTG
At3g16140	<i>PSAH1</i>	- 155	AGATT	CCACGTGG	CATTT
At1g61520	<i>LHCA3</i>	- 184	TATTG	CCACGTGG	ACAGA
At1g67090	<i>RBCS1</i>	- 253	ATCTT	CCACGTGG	CATTA
At1g22360		- 143	AGTTC	CCACGTGG	GAAAA
At1g80460		- 296	GAGAG	CCACGTGG	GAGAT
At4g23650		- 99	ACACG	CCACGTGG	TCATC

ist, ein G-Box Promotorelement. *RBCS1* war ebenfalls aufgrund des differentiellen Kriteriums (siehe Pkt. 3.4.6) von der Auswertung ausgeschlossen. Zwei der drei in Tab. 13 nicht näher benannten Gene kodieren wahrscheinlich für Kinasen (At1g80460, At4g23650), dem dritten (At1g22360) konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden. Die Expression der Gene mit G-Box (CCACGTGG, Tab. 13) wurde in Abb. 20 dargestellt. Das Expressionsverhalten der Gene mit vollständiger G-box im Promotorbereich entspricht im wesentlichen (At1g22360, At1g80460) weichen von diesem Expressionsverhalten ab. Folglich könnte die vollständige G-Box ein Promotorelement sein, über das eine Steuerung der Transkription bei

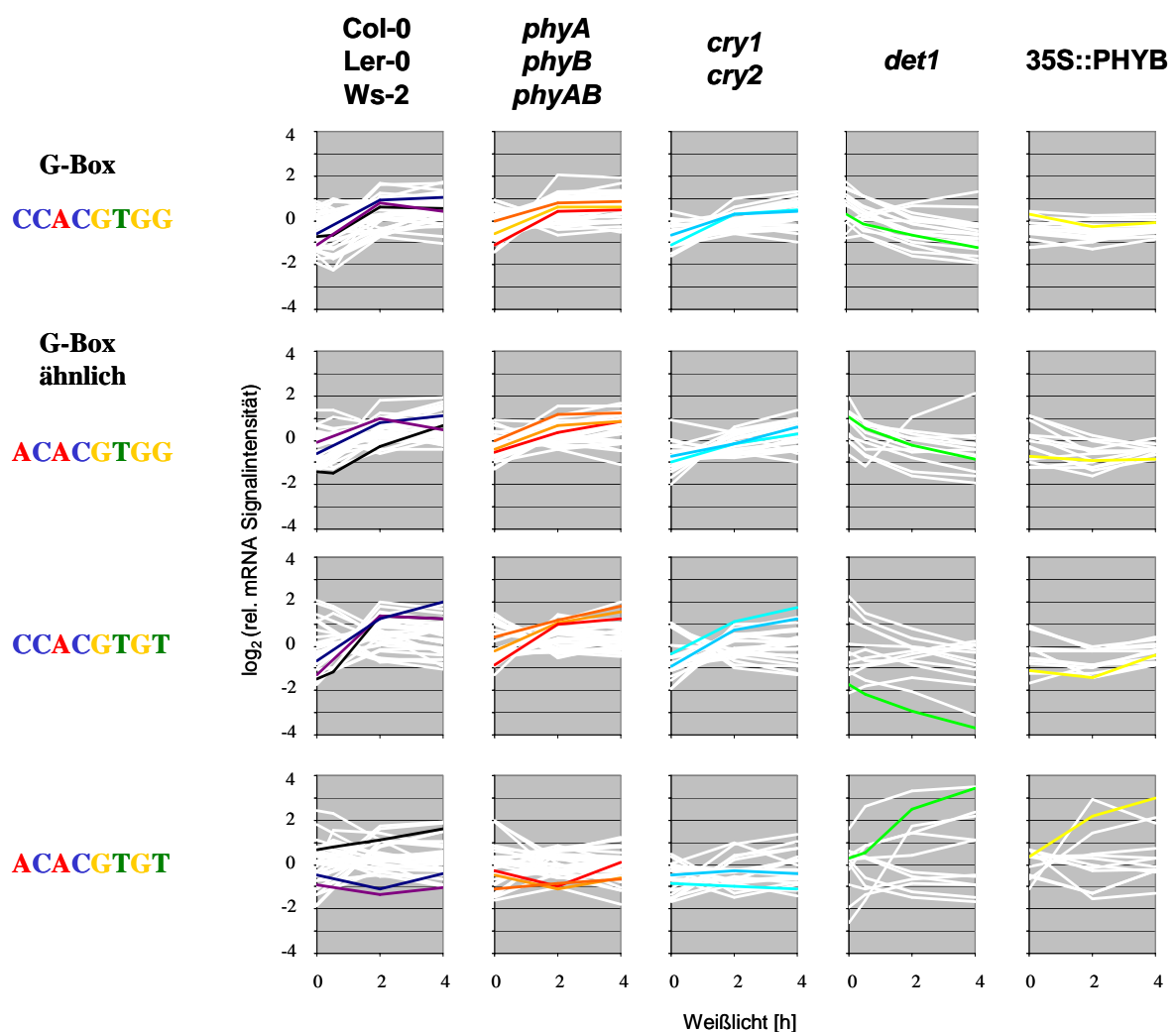


Abb. 20: Expression der Gene mit vollständiger G-Box (CCACGTGG) bzw. G-Box-ähnlichen Promotorelementen in den Weißlichtexperimenten der Wildtypen Ler-0, Col-0 und Ws-2, der Rotlichtrezeptormutanten *phyA*, *phyB* und *phyAB*, der Blaulichtrezeptormutanten *cry1* und *cry2*, der Mutante *det1* sowie der PHYB-überexprimierenden Linie (35S::PHYB). Die Signalintensitäten wurden logarithmisch ( $\log_2$ ) über die Zeit abgebildet. Die farbige Markierung entspricht dem Expressionsprofil eines Genes in den unterschiedlichen Pflanzen (Farbige Markierung in "CCACGTGG" ist das Expressionsprofil des *LHCA3* Genes (vgl. "Northern-Blot"-Experiment in Pkt. 3.5.4)). Zur weiteren Erklärung der Farben siehe Abb. 17.

Bestrahlung mit Weißlicht erfolgt.

In Gruppe 9 und 10 (Abb. 18) sind hauptsächlich G-Box-ähnliche Promotorelemente enthalten. Am häufigsten ist CCACGTGT bzw. die komplementäre Umkehrung des Gegenstrangs ACACGTGG als mögliches Promotorelement vertreten. Ein weiteres G-Box-ähnliches Promotorelement war für die Gene der Gruppe 6 (Motiv 2, Tab. 11) mit ACACGTGT identifiziert worden. Um die Expression der Gene mit diesen möglichen Promotorelementen ebenfalls zu überprüfen, wurden die drei ausgewählten G-Box ähnlichen Promotorelemente (Tab. 12, siehe Anhang: G\_Box.xls) in Analogie zur vollständigen G-Box bezüglich der Expression der betreffenden Gene analysiert.

Durch Sequenzierung überprüft und den Sicherheitskriterien (siehe Pkt. 3.4.6) entsprechend waren 13 Gene (14 cDNA-Fragmente) mit dem Promotorelement ACACGTGG, 8 Gene (13 cDNA-Fragmente) mit CCACGTGT und 9 Gene (12 cDNA-Fragmente) mit ACACGTGT auf dem cDNA-Array "2B" in den Weißlichtexperimenten vertreten (siehe Anhang: G\_Box.xls). Ihre Expression in Arabidopsiskeimlingen der untersuchten Wildtypen und Mutanten bei Bestrahlung mit Weißlicht wurde ebenfalls in Abb. 20 dargestellt. Den Diagrammen ist zu entnehmen, dass bei Belichtung zwar eine Reihe von Genen ein Expressionsverhalten aufweist, das dem der differenziell exprimierten Gene der Gruppe 9 und 10 (Abb. 18) ähnelt, aber einige Gene dieses Expressionsverhalten nicht zeigen. Abweichende Genexpression ist für At1g04250 und At4g36900 mit dem Promotorelement CCACGTGT sowie für At2g35300 mit einem Promotorelement ACACGTGG zu verzeichnen (siehe Anhang: G\_Box.xls). Trotz der wenigen abweichenden Gene kann festgestellt werden, dass Gene mit den G-Box-ähnlichen Promotorelementen CCACGTGT und ACACGTGG ein Expressionsverhalten aufweisen, das dem der Gene mit vollständigem G-Box Promotorelement ähnlich ist. Somit könnten diese beiden Promotorelemente analog zur G-Box mögliche Steuerelemente für eine lichtabhängige Transkription von Genen sein. Die Analyse zeigt auch, dass weitere Steuerelemente existieren, denn sonst müßten alle Gene mit demselben Promotorelement dieselbe Expression aufweisen.

Mit dem Promotorelement ACACGTGT zeigen 7 der 9 Gene (Abb. 20) abweichendes Expressionsverhalten (siehe Anhang: G\_Box.xls). Von den Genen mit diesem Promotorelement weisen mit *PSAE2* und *LHCA4* lediglich die zwei Gene des Photosyntheseapparates ein zu den Gruppen 9 und 10 ähnliches Expressionsprofil auf. Folglich ist das Promotorelement ACACGTGT nicht zu den G-Box-ähnlichen Promotorelementen zu zählen, zumal das Element für die Gene der Gruppe 6 (Motiv 2, Tab. 11) gefunden wurde und diese eine andere Expression zeigen als die Gene der Gruppen 9 und 10 (Abb. 18).

### 3.6. Experimente unter spezifischen Lichtbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurde bisher die Genexpression bei Bestrahlung mit Weißlicht während der frühen Photomorphogenese analysiert. Im folgenden soll die Genexpression unter spezifischen Lichtbedingungen vorgestellt werden, da für die Transkriptionsfaktoren PIF3 und HY5 eine Bindung an die G-Box und an Photorezeptoren unter speziellen Lichtbedingungen nachgewiesen wurde (Oyama *et al.* 1997, Chattopadhyay *et al.* 1998, Ang *et al.* 1998, Ni *et al.* 1998, 1999, Martinez-Garcia *et al.* 2000, Zhu *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001; vgl. Pkt. 1 und 4). Den Daten entsprechend müßte die Expression von Genen mit G-Box-Promotorelement in Rot- und Blaulicht induziert und im klassischen Revertierungsexperiment (Rot- gefolgt von Dunkelrotlicht, siehe Pkt. 1) unterdrückt werden können. Folglich sollte die G-Box oder ein ähnliches Promotorelement für die Gene zu finden sein, die von spezifischen Lichtbedingungen reguliert werden

Der Wildtyp Ler-0 wurde für die Experimente ausgewählt, da die Mutationen der Photorezeptoren in diesem Wildtyp erzeugt wurden (siehe Pkt. 2.1.1). Für die Untersuchungen erfolgte die Aufzucht von 5 Tage alten etiolierten Keimlingen in Petrischalen auf MS-Medium. Nach ihrer wahlweisen Bestrahlung mit rotem (pR, 5 min), mit rotem gefolgt von dunkelrotem (pR/pFR, je 5 min) oder mit blauem Licht (pB, 5 min) wurden die Keimlinge für 0,5 h bzw. 2 h in der Dunkelheit kultiviert und anschließend geerntet. Mit dem Material wurden <sup>33</sup>P-markierte cDNA-Sonden synthetisiert und diese auf den cDNA-Arrays der Membranserie "2A" hybridisiert. Die Auswertung erfolgte wie für die zuvor beschriebenen Weißlichtexperimente (siehe Pkt. 3.5).

#### 3.6.1. Unter spezifischen Lichtbedingungen ko-exprimierte Gene

Analog zu den Weißlichtexperimenten (siehe Pkt. 3.5) wurden die auf der Membran enthaltenen Gene bezüglich ihrer Ko-Expression in den Lichtpulsexperimenten analysiert. Zur Gewährleistung der in der Auswertung verwendeten Daten wurden die Sicherheitskriterien (siehe Pkt. 3.4.6) angewendet und das Kriterium für differenzielle Expression (siehe Pkt. 3.4.6) vernachlässigt. Diesen Kriterien entsprachen 175 Gene (213 cDNA-Fragmente), deren normalisierte Expressionsdaten (zweite Mittelwertzentrierung der Gene, siehe Pkt. 2.2.5.5) zur Vereinfachung der Analyse mit dem statistischen Verfahren "K-Mean Clustering" im Programm "J-Express" (Zufallszahl 123738682) gruppiert wurden (siehe Pkt.

3.5.3). Der Vorgabe entsprechend wurden 5 Gruppen gebildet. Die Mitglieder der einzelnen Gruppen wurden aufgrund der Anzahl der betrachteten Gene im Anhang aufgeführt (siehe Anhang: Lichtpuls.xls). Die zeitabhängige Expression der Gene ist in Abb. 21 für die einzelnen Belichtungsexperimente (pR, pR/pFR, pB) dargestellt.

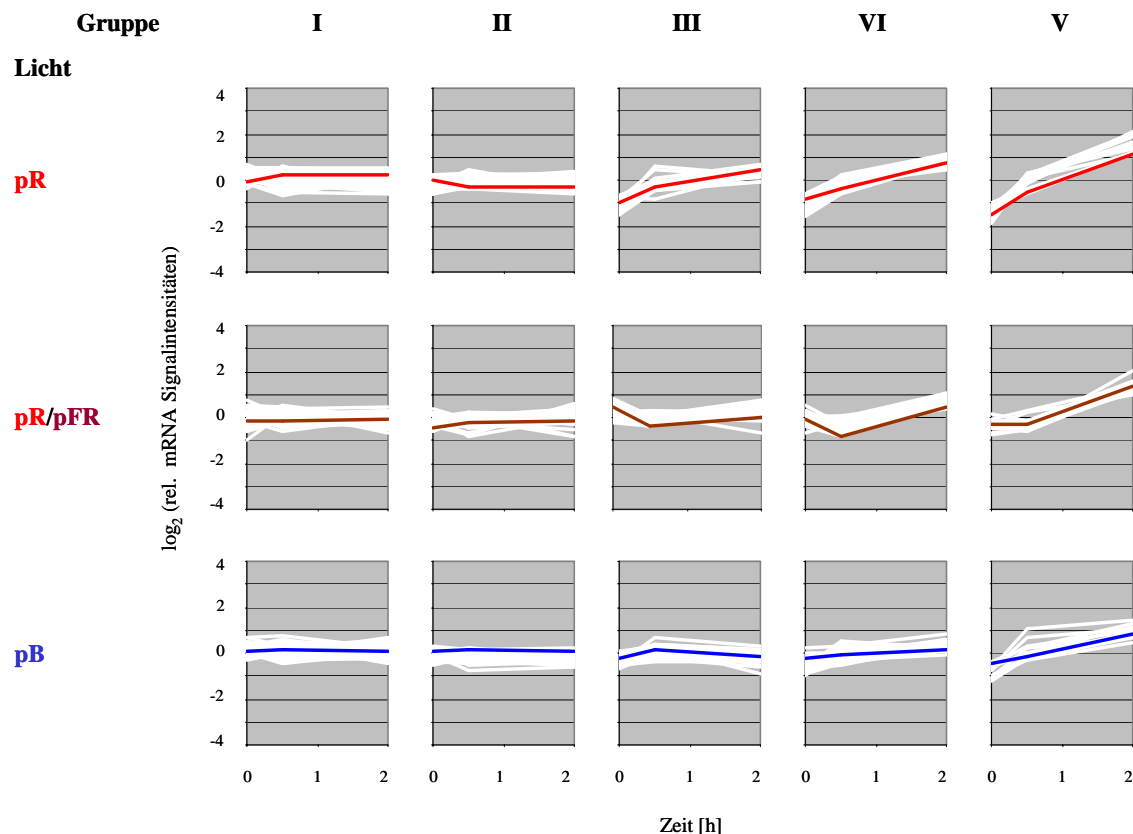


Abb. 21: Gruppen ko-exprimierter Gene bei Bestrahlung von etiolierten Keimlingen des Wildtyps Ler-0 mit 5 min Rotlicht (pR), mit 5 min Rotlicht gefolgt von 5 min Dunkelrotlicht (pR/pFR) bzw. mit 5 min Blaulicht (pB). Die Signalintensitäten wurden logarithmisch ( $\log_2$ ) über die Zeit abgebildet. Für jede Gruppe wurde der typische zeitliche Verlauf der Expression durch die farbige Markierung eines Genes dargestellt.

Die Diagramme (Abb. 21) zeigen, dass die 175 Gene bei Bestrahlung mit einem Rot- oder Blaulichtpuls ähnlich exprimiert werden. Beide Lichtbedingungen wirkten stimulierend auf die Expression von Genen. Kurzzeitiges blaues Licht induzierte die Expression der Gene weniger als kurzzeitiges rotes. Im klassischen Revertierungsexperiment (pR/pFR) ist zunächst eine Verzögerung der Expression im Zeitintervall von 0 bis 0,5 h festzustellen (siehe Abb. 21). Diese Reversion des expressions-initiiierenden Rotlichtpulses durch den nachfolgenden Dunkelrotlichtpuls entspricht den Erwartungen. Die anschließende Induktion der Genexpression im Zeitintervall von 0,5 bis 2 h (siehe Abb. 21) ist möglicherweise auf einen unzureichenden Dunkelrotlichtpuls zurückzuführen. Folglich beeinflusste Dunkelrotlicht die

Rotlichtinduktion, ohne dieselbe zu verhindern (siehe Pkt. 4.10).

Interessanterweise ist in den Lichtpulsexperimenten mit dem Wildtyp Ler-0 für keines der Gene abnehmende Expression ermittelt worden (Abb. 21), während unter Weißlichtbedingungen eine Reihe von Genen (Gruppen 1 und 2) dieses Expressionsprofil zeigen (vgl. Abb. 18 und 21).

Das Expressionsverhalten der Gene in den Gruppen I und II (siehe Abb. 21) war unabhängig von den verwendeten Lichtbedingungen relativ konstant. Folglich sind die kurzzeitigen Belichtungen ohne Einfluss auf die Expression dieser Gene.

In den Gruppen III bis V (siehe Abb. 21) ist unter den jeweiligen Lichtbedingungen eine ähnliche Genexpression zu verzeichnen. Die Expression der Gene in diesen Gruppen unterscheidet sich nur quantitativ. Die Gene der Gruppe V sind bei Belichtung am höchsten, die Gene der Gruppe III am niedrigsten exprimiert. In Gruppe III ist eine Einordnung der Gruppen in einen biologischen Zusammenhang schwierig, da den Genprodukten unterschiedlichste Funktionen (siehe Anhang: Lichtpuls.xls) zugeordnet sind. 5 der 26 Gene (8 der 36 cDNA-Fragmente) dieser Gruppe kodieren für Proteine des Photosyntheseapparates und 3 Gene (7 cDNA-Fragmente) für Proteine der Carboxylierungsreaktion (*RBCS1*, *-2b* und *-3b*). In Gruppe IV sind 28 Gene (34 cDNA-Fragmente) enthalten, von denen 19 Gene (24 cDNA-Fragmente) für Proteine des Photosyntheseapparates kodieren. Von den 9 Genen (12 cDNA-Fragmente) der Gruppe V sind 8 Gene (11 cDNA-Fragmente) für Proteine des Photosyntheseapparates kodierend. 7 dieser 8 Proteine sind Bestandteil der Antennenkomplexe (*LHCA* und *-B*; siehe Anhang: Lichtpuls.xls).

Für die Gene der Gruppen III bis V wurde zunehmende Expression bei Bestrahlung mit Rot- bzw. Blaulicht festgestellt (s. o.). In den Weißlichtexperimenten war für die Gene des Photosyntheseapparates (Gruppen 8 bis 10, Abb. 18 und Tab. 9) u. a. die Expression bei Belichtung ebenfalls zunehmend. Bis auf zwei Gene (*At2g46820*: unbekannte Funktion; *At3g02730*: Thioredoxin) ist die Expression der Gene der Gruppen 8 bis 10 in den Weißlichtexperimenten im Vergleich zur Genexpression in Rot- und Blaulichtexperimente ähnlich. (Die Expressionswerte von 10 Genen entsprechen in den Rotlichtexperimenten nicht den Sicherheitskriterien.) D.h. rotes bzw. blaues Licht ist ausreichend für die Initiation der Expression dieser Gene. Mit der Gruppierung der Gene wurde eine ausgeprägte Ko-Expression von Genen auch in den Belichtungsexperimenten mit Licht spezifischer Wellenlängen festgestellt.

### 3.6.2. Untersuchung von ko-exprimierten Genen bei spezifischen Lichtbedingungen auf mögliche Promotorelemente

Auf der Grundlage ihrer ähnlichen Expression zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Bestrahlungsexperimente konnten die Gene, die die Sicherheitskriterien (siehe Pkt. 3.4.6) erfüllen, gruppiert werden. In Analogie zur Auswertung der Weißlichtexperimente (siehe Pkt. 3.5.5) wurden die Gene der Gruppen I bis V auf gemeinsame Promotorelemente untersucht. In der Literatur wurden bei Verwendung spezifischer Lichtbedingungen Interaktionen zwischen Photorezeptoren und Transkriptionsfaktoren beschrieben, die eine Steuerung der Transkription über die G-Box ermöglichen (Oyama *et al.* 1997, Chattopadhyay *et al.* 1998, Ang *et al.* 1998, Ni *et al.* 1998, 1999, Martinez-Garcia *et al.* 2000, Zhu *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001; siehe Pkt. 1. und 4). G-Box bzw. G-box-ähnliche Promotorelemente als mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wurden auch in der Analyse der Weißlichtexperimente in ko-exprimierten Genen identifiziert (siehe Pkt. 3.5.5 und 3.5.6). Folglich sollten G-Box bzw. G-Box-ähnliche Promotorelemente in der Analyse zu finden sein.

Die Ergebnisse der gruppenweisen Suche nach möglichen Promotorelementen sind in Tab. 14 dargestellt. Gezeigt wird die Sequenz des niedrigsten Erwartungswertes für die Motive 1 bis 5 jeder Gruppe, die Anzahl der Gene, die das entsprechende Motiv aufweisen und der Erwartungswert des Motivs für die gesamte Gruppe. Zur Bewertung der gefundenen Sequenz wurde ein von "Meme" berechneter Erwartungswert verwendet. Dieser sollte für das gefundene Element möglichst niedrig sein. G-Box bzw. G-Box-ähnliche Sequenzen wurden als mögliche Promotorelemente für einen Teil der Gene der Gruppen III und IV (jeweils Motiv 1, Tab. 14) gefunden. Auch für die Gene der Gruppe V (Motiv 3, Tab. 14) ist ein G-Box-ähnliches Promotorelement allerdings mit einem hohen Erwartungswert identifiziert worden. Allen drei Gruppen ist zunehmende Expression der Gene bei Bestrahlung mit Rot- bzw. Blaulicht gemeinsam, die sich nur quantitativ unterscheiden (siehe Abb. 21). G-Box-ähnliche Promotorelemente wurden allerdings auch für Gene der Gruppen I und II (Motiv 3 bzw. Motiv 4, Tab. 14) ermittelt. Die Expression der Gene dieser Gruppen ist in allen drei Lichtpulsexperimenten als relativ konstant einzuschätzen und widerspricht somit Erwartungen einer zunehmenden Expression dieser Gene bei Belichtung. Folglich ist die G-Box möglicherweise nicht das grundlegende Element bzw. nicht das einzige für die Steuerung der Genexpression. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die Anzahl der Gene mit einem G-Box-ähnlichem Promotorelement gestützt, denn in keiner Gruppe wurde das Promotorelement für alle Mitglieder gefunden.



Tab. 14: Ergebnisse der Promotorelementsuche in ko-exprimierten Genen (Gruppe I bis V) der Lichtpuls-experimente. Jedes Motiv ist charakterisiert durch die Anzahl der Gene, die dieses Motiv im Promotor enthalten, die Sequenz mit dem niedrigsten Erwartungswert innerhalb der Gruppe und dem Erwartungswert des Motivs für die gesamte Gruppe.

Gruppe	I	II	III	IV	V
Gene pro Gruppe	78	63	26	28	9
Gene pro Motiv	<b>78</b>	<b>58</b>	<b>16</b>	<b>23</b>	9
Motiv 1	TCTCTCTCTCTCTCT	CTCTCTCTCTCTCTC	CTGCCACGTGGCC	GCCACGTG	GCAAAAACAAAAA
Erwartungswert	<b>9,7x 10<sup>-46</sup></b>	<b>8,5x 10<sup>-34</sup></b>	<b>7,2x 10<sup>-14</sup></b>	<b>2,5x 10<sup>-14</sup></b>	9,4
Gene pro Motiv	78	63	25	28	9
Motiv 2	TTTGGTTTTTTT	AAACAAAAACAAAAC	GGAGAAGAAGAAG	AGAAGAAGAGG	ACTTCCACCAACAC
Erwartungswert	1,6x 10 <sup>-8</sup>	3,1x 10 <sup>-8</sup>	2,1x 10 <sup>-8</sup>	9,9x 10 <sup>-7</sup>	52
Gene pro Motiv	<b>23</b>	21	12	15	<b>8</b>
Motiv 3	CACGTGGC	TCGTCTTCTCCGCCT	GTCTCAACACCTCTC	TGGCTTGTTGG	TTAATGACACGTG
Erwartungswert	<b>0,0076</b>	0,0099	0,66	15	<b>2100</b>
Gene pro Motiv	32	<b>16</b>	14	14	
Motiv 4	GAGAAGGAAGAAGAT	GTACACGTGGC	TCCAAAAGCCCAAAC	GATGTGGGAGCCAGA	
Erwartungswert	6,1	<b>0,12</b>	42	4700	
Gene pro Motiv		14	26	9	
Motiv 5		GATTCCTCTTCTTC	GAAGAGAAGAG	ATCACATTATCCAGA	
Erwartungswert		1200	1,7	720	

Die niedrigsten Erwartungswerte in der Promotorelementsuche durch "Meme" wurden in der Gruppen I und II für das jeweils erste Motiv (Tab. 14) erzielt. Im Vergleich sind diese beiden Promotorelemente einander ähnlich und vor fast allen Genen in der jeweiligen Gruppe (siehe Anhang: Lichtpuls.xls) enthalten. Die Motive wurden in keiner der anderen Gruppen identifiziert (vgl. Tab. 14). Demzufolge wäre auch eine Unterdrückung der Transkription über diese Promotorelemente denkbar, da für die Gene in beiden Gruppen keine Veränderung der Expression bestimmt wurde.

### 3.7. Expressions- und Promotorelementanalyse der für Proteine des Photosyntheseapparates kodierenden Gene

Die Auswertung der Weißlichtexperimente sowie der Experimente mit spezifischen Lichtbedingungen zeigten für Gene von Proteinen des Photosyntheseapparates jeweils eine

ausgeprägte Ko-Expression. Da die Gene trotz ähnlicher Genexpression nach der Analyse unterschiedlichen Gruppen angehörten, wurden die Gene von Proteinen des Photosyntheseapparates zusammengefasst und ihre Expression bei Weißlichtbestrahlung für Wildtypen und Mutanten in Abb. 22 separat dargestellt. Insgesamt sind auf der Membran "2B" 47 Gene (93 cDNA-Fragmente) für Proteine des Photosyntheseapparates enthalten. 41 Gene (62 cDNA-Fragmente) entsprechen den Sicherheitskriterien (siehe Pkt. 3.4.6). Eines dieser cDNA-Fragmente wurde noch nicht durch Sequenzierung und Datenbankvergleich überprüft und deshalb von der Analyse ausgeschlossen.

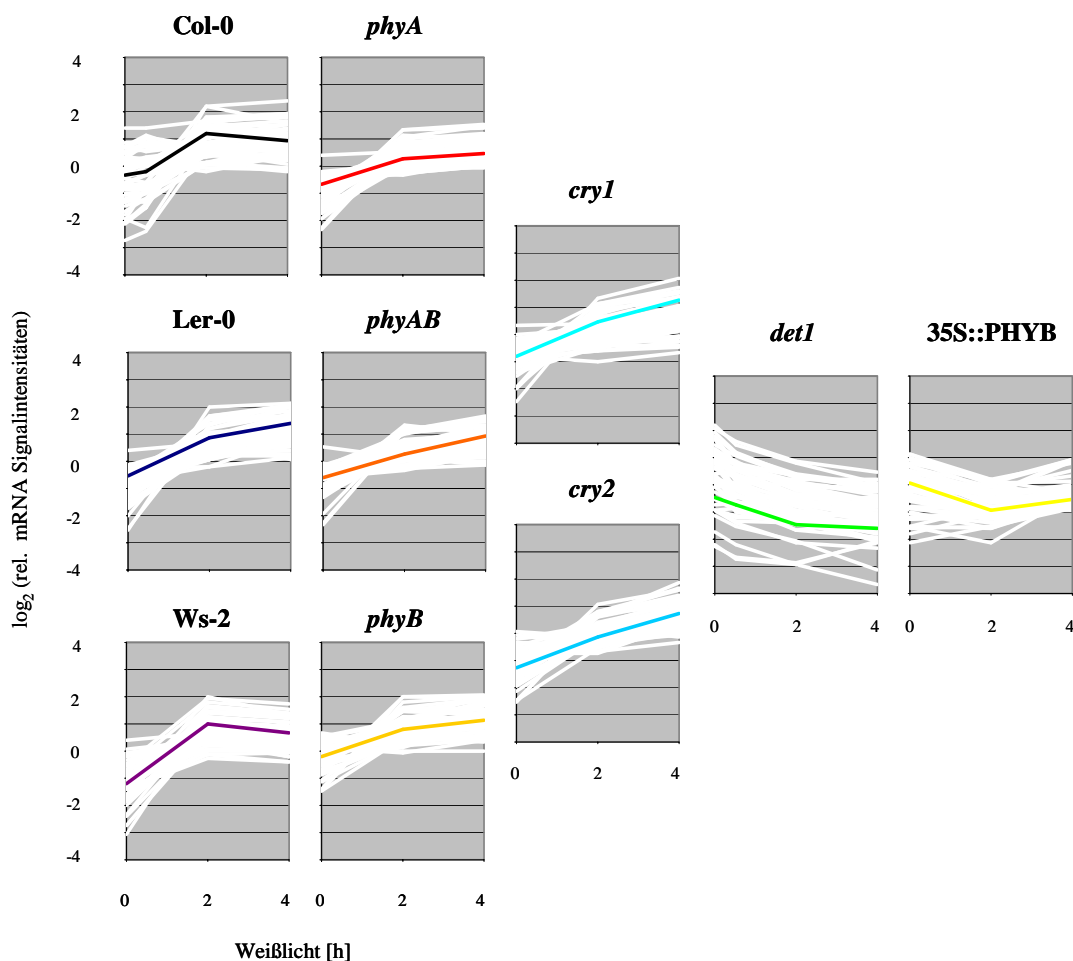


Abb. 22: Darstellung der Expression von 40 Genen (61 cDNA-Fragmenten), die für Proteine des Photosyntheseapparates kodieren, für Keimlinge (5 d) der Wildtypen Col-0, Ler-0 und Ws-2; der Rotlichtrezeptormutanten *phyA*, *phyB* und *phyAB*; der Blaulichtrezeptormutanten *cry1* und *cry2*; der Mutante *det1* sowie der PHYB-überexprimierende Linie bei Bestrahlung mit Weißlicht. Die Signalintensitäten wurden logarithmisch ( $\log_2$ ) über die Zeit abgebildet. Für jede Gruppe wurde der typische zeitliche Verlauf der Expression durch die farbige Markierung eines Genes in den einzelnen Pflanzen dargestellt. Die Farbwahl für Wildtypen und Mutanten entspricht der in Abb. 15.

Die Diagramme zeigen wiederum die ähnliche Expression der Gene in Wildtypen, Phytochrom- und Cryptochrommutanten und davon abweichend die fehlende Induktion der Genexpression in der Mutante *det1* sowie die relativ konstante Expression der Gene in der PHYB-überexprimierenden Linie. Lediglich im Wildtyp Col-0 ist für einige Gene eine Veränderung der Genexpression festzustellen. Diese Veränderung betrifft hauptsächlich die Expression der Gene in etiolierten Keimlingen, möglicherweise werden diese Gene in Dunkelheit im Wildtyp Col-0 unzureichend unterdrückt. Die aus diesen Genen resultierenden Proteine gehören verschiedenen Komplexen des Photosyntheseapparates an.

Auch 5 der 6 Gene (*PSBO2*, *PSBQ2*, *PSBT1*, *PSBY*, *PETH1*), deren Doppelspotverhältnis in den Weißlichtexperimenten nicht das zweite Sicherheitskriterium (siehe Pkt. 3.4.6) erfüllen, zeigen im Vergl

ähnliches Expressionsverhalten in Wildtypen und Mutanten (siehe Anhang: Auswahl\_Weißlicht.xls). Lediglich *PETH3* weicht von diesem Expressionsverhalten ab. Da für dieses Gen auch das erste Sicherheitskriterium in der Analyse nicht erfüllt wird, sind die Signalwerte nahe den Hintergrundwerten und somit möglicherweise höher fehlerbehaftet (siehe Pkt. 3.4.2).

In Analogie zu den vorangegangenen Analysen wurden die Promotoren aller ko-exprimierten Gene von Proteinen des Photosyntheseapparates (46 Gene; Abb. 22 und siehe Anhang: Auswahl\_Weißlicht.xls) mit Ausnahme von *PETH3* nach möglichen Promotorelementen durchsucht. Das Ergebnis der Promotorelementanalyse wurde in Tab. 15 mit der Sequenz des niedrigsten Erwartungswertes eines Motivs, der Anzahl der Gene, die das entsprechende Motiv aufweisen und dem Erwartungswert des Motivs für die gesamte Gruppe zusammengefasst.

Tab. 15: Ergebnisse der Promotorelementsuche in ko-exprimierten Genen, die für Proteine des Photosyntheseapparates kodieren. Jedes Motiv ist charakterisiert durch die Anzahl der Gene, die das Motiv im Promotor enthalten, die Sequenz mit dem niedrigsten Erwartungswert innerhalb der Gruppe und dem Erwartungswert des Motivs für die gesamte Gruppe.

Motiv	Gene pro Motiv	Sequenz	Erwartungswert	Bezeichnung
1	40	GCCACGTGGCA	$3,6 \times 10^{-30}$	G-Box
2	46	AGAAAGAGAGAAAGA	$1,5 \times 10^{-20}$	PR-Motiv 1
3	37	AAATCAACCAATCAC	$4,8 \times 10^{-12}$	CAAT-Box
4	14	GCCACGTCATC	0.049	G-Box-ähnlich
5	12	TCTCTCTTCTC	360	PR-Motiv 2
6	12	ACCACAG CCACTACC	35	CAAT-Box-ähnlich

Mit dem niedrigsten Erwartungswert wurde die G-Box (CCACGTGG) als gemeinsames Promotorelement für 40 der 46 Gene identifiziert (Tab. 15, Motiv 1). Auch die CAAT-Box wurde mit einem niedrigem Erwartungswert in 37 von 46 durchsuchten Promotoren gefunden (Tab. 15, Motiv 3). Außerdem ist noch eine purinreiche Sequenz (PR-Motiv 1; Tab. 15; Motiv 2) in allen Promotoren dieser Gene enthalten.

Die Positionen der identifizierten Motive vor dem Startkodon der Gene wurden als Häufigkeitsverteilung in Abb. 23 dargestellt. Das Diagramm veranschaulicht nicht nur die Positionen der möglichen Motive sondern auch Reihenfolge der Motive im Promotor und mögliche Überschneidungen bzw. Ergänzungen der Motive bezüglich ihrer Position.

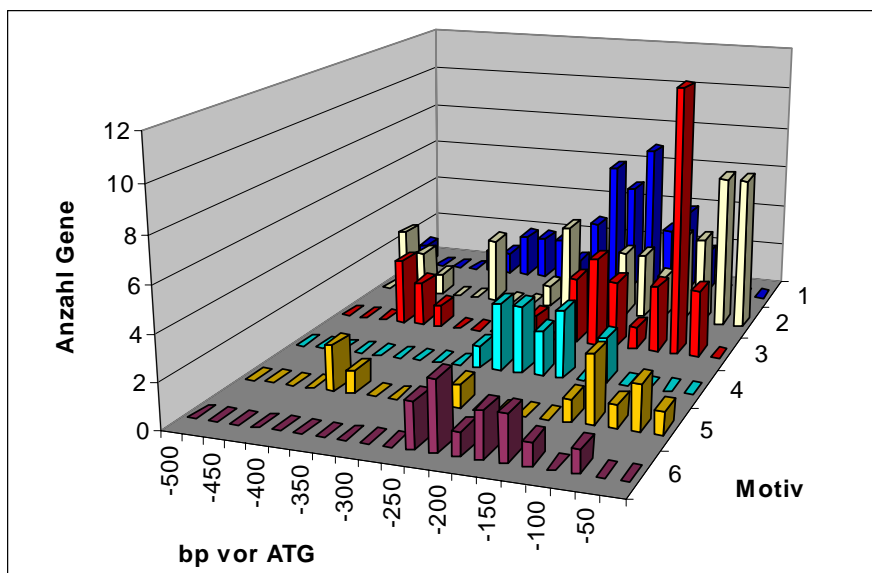


Abb. 23: Häufigkeitsverteilungen für die Motive aus Tab. 15 in Promotoren der für Proteine des Photosyntheseapparates kodierenden Gene, dargestellt in Intervallen zu 25 bp. Die Zahlenwerte der Abszisse entsprechen der jeweiligen Untergrenze des Intervalls.

Dem Diagramm (Abb. 23) ist zu entnehmen, dass die G-Box (Motiv 1) vornehmlich im Bereich von -225 bis -150 (-100) bp vor dem Startkodon enthalten ist. Das PR-Motiv 1 (Abb. 23, Motiv 2) ist unmittelbar vor dem ATG im Intervall von -50 bis -1 bp häufiger präsent, während die CAAT-Box (Abb. 23, Motiv 3) signifikant häufiger im Bereich von -75 bis -50 bp im Promotor vorkommt. Die Motive 4 und 6 (siehe Tab. 15) sind in demselben Abschnitt des Promotors wie die G-Box vor dem Startkodon bei -250 bis -150 bp (Motiv 4) bzw. bei -250 bis -125 bp (Motiv 6) lokalisiert. Die Anzahl der Promotoren von Genen für Proteine des Photosyntheseapparates, die diese identifizierten Motive enthalten, ist jedoch gering und die Erwartungswerte für das Motiv niedrig (vgl. Tab. 15). Das gilt ebenso für das Motiv 5 (vgl. Tab. 15), das vornehmlich im Intervall von -100 bis -1 bp vor dem Startkodon enthalten ist und somit sich mit dem Intervall von Motiv 2 überschneidet (siehe Abb. 23).

Im Vergleich der Sequenzen beider Motive ist festzustellen, das Motiv 5 möglicherweise komplementär zum Motiv 2 sein könnte. Auch Motiv 1 und 4 bzw. Motiv 3 und 6 sind

einander jeweils ähnlich, aber gleichen einander nicht. Eine Konsensus-Sequenz als allgemeine Definition der einander ähnlichen Motive ist auf dem gegenwärtigen Stand der Experimente und deren Analyse nicht abzuleiten (siehe Anhang: Motive\_Gruppen.xls). Möglicherweise ist das Vorhandensein der Motive 1 bis 3 bzw. ihrer ähnlichen Motive (4 bis 6) und ihre Reihenfolge mit G-Box, CAAT-Box und PR-Motiv vor dem Startkodon spezifisch für die Promotoren der für Proteine des Photosyntheseapparates kodierenden Gene und notwendig für die Regulation des komplexen Prozesses.

#### 4. Diskussion

Bisherige Untersuchungen zur Photomorphogenese zeigten, dass Pflanzen rotes, blaues und UV-Licht sowie Dauer, Intensität und Richtung der Lichteinstrahlung wahrnehmen können (Kendrick und Kronenberg 1994). Physiologische, photobiologische und molekulare Studien führten zur Isolierung photomorphogenetischer Mutanten (Koornneef *et al.* 1980, Chory *et al.* 1989, Deng *et al.* 1991), sowie von Photorezeptoren und Photorezeptorgenen. Eingeteilt nach ihrer Wirkung im roten und blauen Licht wurden 5 Phytochrome und 2 Cryptochrome sowie 2 Phototropine in *Arabidopsis* identifiziert (Sharrock und Quail 1989, Clack *et al.* 1994, Ahmad und Cashmore 1993, Guo *et al.* 1998, Liscum und Briggs 1995, Jarillo *et al.* 1998). Die Photorezeptoren stehen am Anfang von Signalübertragungsketten für die Lichtdetektion. An deren Ende wurden lichtabhängig regulierte Gene wie *RBCS*, *LHC (CAB)*, *PSBA*, und *CHS* gefunden (Abb. 3, Tobin und Silverthorne 1985, Chory *et al.* 1989, Batschauer *et al.* 1991). Die einzelnen Komponenten der Signalübertragung, die Signalverarbeitung und -weitergabe sind nur begrenzt bekannt. Erst durch systematische Suche nach Mutanten (Hoecker *et al.* 1998, Soh *et al.* 1998, Hudson *et al.* 1999, Bolle *et al.* 2000, Buche *et al.* 2000, Fairchild *et al.* 2000, Fankhauser und Chory 2000, Hsieh *et al.* 2000) und Anwendung neuer Methoden konnten in den letzten Jahren weiteren Genen mögliche Funktionen in der Lichtsignalkette zugeordnet werden (siehe Pkt. 1). So nutzten Kuno *et al.* (2000) *Fluorescent Differential Display* und Tepperman *et al.* (2001) *Micro-Arrays* zur Expressionsanalyse, um speziell *PHYA*-regulierte Gene zu identifizieren. Ma *et al.* (2001) untersuchten die Genexpression von 6 Tage in Licht oder in Dunkelheit gewachsenen Keimlingen der Photorezeptormutanten ebenfalls mittels *Micro-Array* Technik.

Zum Studium der komplexen Genregulation in etiolierten Keimlingen wurde in der vorliegenden Arbeit unter Nutzung von *Macro-Arrays* eine ähnliche Strategie gewählt. Im Unterschied zu Ma *et al.* (2001) erfolgte die Anzucht etiolierter Keimlinge (5 d) mit einer anschließenden Belichtung, um frühe Ereignisse während der Photomorphogenese analysieren zu können. Eine weitere Differenz zur Veröffentlichung von Ma *et al.* (2001) besteht in der Verwendung von *MS-Medium* ohne Zusatz von Saccharose, weil die Expression einiger Gene z. B. *LHC (CAB)* und *RBCS* durch Saccharose beeinflusst wird (Dijkwel *et al.* 1997, Jang *et al.* 1997).

Die Etablierung der multiparallelen Expressionsanalyse als Experimentalsystem beinhaltet die Teilprozesse Herstellung von *cDNA-Arrays* und *cDNA-Sonden* sowie deren Hybridisierung und die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse. Zunächst soll auf die Auswahl der *cDNA-Klone* für die Erstellung der *cDNA-Arrays* eingegangen werden. Anschließend

sollen sowohl biologische und technische Parameter der cDNA-Array-Methode als auch die Ergebnisse der Belichtungsexperimente diskutiert werden.

#### **4.1. Auswahl von nicht plastidären cDNA-Fragmenten**

Mit den cDNA-Kollektionen des Arabidopsis-Ressourcenzentrums in Ohio (siehe Pkt. 3.2) standen ca. 37.000 Klone für die Herstellung der cDNA-Arrays zur Verfügung. Als Klone für das cDNA-Array wurden kernkodierte potenziell plastidäre Proteine aufgrund ihrer wahrscheinlich lichtabhängigen Regulation ausgewählt. Basis für die Auswahl von plastidären Proteinen war eine Transitpeptidvorhersage mit dem Programm "ChloroP" (Emanuelsson *et al.* 1999) zur Unterscheidung zwischen plastidären und anderen Proteinen. 96 % (91 Sequenzen) des 715 Sequenzen umfassenden Testsets wurden als kernkodierte Gene plastidärer Proteine identifiziert (Emanuelsson *et al.* 1999, Testset 2). Insgesamt wurden durch "ChloroP" im Testset 157 Sequenzen mit plastidärem Transitpeptid bestimmt, d.h. nur 58 % der Sequenzen mit Transitpeptid waren plastidär lokalisiert. Folglich sind nicht nur cDNA-Fragmente plastidärer Proteine auf der Basis von "ChloroP" für die Herstellung von cDNA-Arrays ausgewählt worden. Auf der Grundlage des heute vollständig sequenzierten Arabidopsisgenoms ("The Arabidopsis Genome Initiative" 2000) befinden sich nach der Vorhersage mit dem Programm "TargetP" (Nachfolgeprogramm von "ChloroP") 493 Gene plastidärer Proteine (712 cDNA-Fragmente) und 98 Gene mitochondrialer Proteine (121 cDNA-Fragmente) auf der Membran "2B".

Zusätzlich waren nichtplastidäre Proteine auf dem cDNA-Array enthalten, da 15 % der direkt vom Ressourcenzentrum bezogenen Klone und 23 % der Klone der redundanzreduzierten Kollektion des Ressourcenzentrums bei ihrer Überprüfung durch Sequenzierung und Datenbankvergleich nicht das erwartete cDNA-Fragment enthielten (siehe Pkt. 3.2). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch andere Nutzer der Kopie der redundanzreduzierten cDNA-Kollektion (B. Weisshaar, T. Altmann persönliche Mitteilung). Aufgrund der hohen Fehlerraten wurden alle bis auf eines der in der Argumentation verwendeten cDNA-Fragmente durch Sequenzierung und Datenbankvergleich kontrolliert, um den mit diesen Daten dargestellten Sachverhalt zu gewährleisten.

Neben der fehlerhaften Zuordnung der Klone und der daraus resultierenden Abweichung in der Auswahl der cDNA-Fragmente unterliegen die Datenbanken (MIPS, NCBI) ebenfalls einer fortwährenden Veränderung. Zum Zeitpunkt der Auswahl der Fragmente war das Genom von Arabidopsis noch nicht vollständig sequenziert. Die Zuordnung der cDNA-

Fragmente bzw. Gene erfolgte in einzelnen Gruppen homologer Sequenzen. Dementsprechend konnten Gene auch in Abhängigkeit des klonierten cDNA-Fragmentes in unterschiedlichen Gruppen repräsentiert sein. Weitere Gründe für eine fehlerhafte Zuordnung lagen in der häufig nur einseitigen unvollständigen Sequenzierung (5´ oder 3´) der cDNA-Fragmente, einer nicht erkannten Exon/Intron-Struktur der kodierenden DNA oder in fehlerhaften Sequenzen von nahe miteinander verwandten Mitgliedern einer Genfamilie. Erst die fast vollständige Sequenzierung des Genoms von Arabidopsis ("The Arabidopsis Genome Initiative" 2000) erbrachte fehlende Sequenzinformation und ermöglichte dadurch eine genauere Zuordnung der cDNA-Fragmente zu den Genen.

Diese Gründe und auch die teilweise überlappenden manuellen Sammlungen von cDNA-Fragmenten verschiedener Arbeitsgruppen führten dazu, dass cDNA-Fragmente mehrfach auf dem cDNA-Array vorhanden sind. Die Anzahl nichtredundanter Klone reduziert sich damit auf 1190 cDNA-Fragmente auf der Membran "2B" bzw. auf 1051 cDNA-Fragmente auf der Membran "2A" (vgl. Tab. 3).

#### 4.2. Kreuzhybridisierung

Neben der fehlerhaften Zuordnung von cDNA-Fragmenten könnten Mitglieder von Genfamilien aufgrund ihrer Sequenzidentität die eindeutige Zuordnung von Hybridisierungssignalen erschweren. Aus diesem Grund wurden Kreuzhybridisierungsexperimente unter Verwendung der cDNA-Arrays zur Analyse der gegenseitigen Beeinflussung von Hybridisierungsergebnissen durchgeführt. Mit drei ausgewählten Mitgliedern der *LHC*-Genfamilie wurde bei Kreuzhybridisierungsversuchen festgestellt, dass bei Hybridisierungspartnern mit über 85 % Sequenzidentität zueinander eine Kreuzreaktion zu erwarten ist und im Bereich von 75 % bis 85 % Übereinstimmung der Gensequenz eine Kreuzreaktion nicht ausgeschlossen werden kann (Abb. 14). Unterhalb von 75 % Sequenzidentität waren kaum Kreuzhybridisierungsereignisse zu verzeichnen (Abb. 14). Zu letzterem Ergebnis gelangte auch Schena (1996) bei einer Sequenzidentität von 70 % zwischen den Genen *HAT4* und *HAT22* (*histone acetyltransferase*). Girke *et al.* (2000) zeigten mit regelmäßig unterbrochenen synthetischen Fragmenten bei konstantem GC-Gehalt, dass bei 80 % Identität keine Kreuzhybridisierung mehr zu verzeichnen war, während übereinstimmend mit den hier vorgestellten Daten bei 90 % Sequenzidentität noch die Hälfte des Hybridisierungssignales (bezogen auf 100 % Sequenzidentität) gemessen wurde. Der Schlussfolgerung von Girke *et al.* (2000), dass das Ausmaß von Kreuzhybridisierungen anhand der Sequenzidentitäten abschätzbar wäre, kann



nicht zugestimmt werden. Aus den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten war keine eindeutige Korrelation zwischen Identität und Ausmaß der Kreuzhybridisierung abzuleiten. Vielmehr ist bei Kreuzhybridisierungen von Mitgliedern von Genfamilien auf eine hohe Abhängigkeit von der Sequenz zu schließen.

Aus den Kreuzhybridisierungsexperimenten kann geschlussfolgert werden, dass die Gene *LHCB1.3*, *-1.4* und *-1.5* miteinander (kreuz-) hybridisieren können (siehe Tab. 6). Das gilt ebenso für die Gene *LHCB2.1*, *-2.2* und *-2.4* sowie *LHCB4.1* und *-4.2*. Letztere beiden Gene können aufgrund der Sequenzidentität von 79 % auch mit *LHCA3* kreuzhybridisieren (siehe Tab. 6). Außer von *LHC*-Genen treten weitere Gene als Isoformen im Arabidopsisgenom auf. Insgesamt sind 130 Gene in 59 Genfamilien mit einer Sequenzidentität größer 75 % auf dem cDNA-Array "2B" enthalten (Vergleich der Gensequenzen mit "WUblastn2" gegeneinander; siehe Anhang: genliste.xls). Für die Mehrzahl der Gene besteht eine Identität im Bereich von 75 bis 85 %, so dass eine Kreuzhybridisierung möglich ist (vgl. Abb. 14). Nur wenige Gene haben eine Sequenzidentität von mehr als 85 % zu anderen Genen des cDNA-Arrays. Zu diesen Genen zählen *LHC* (vgl. Tab. 6), Histon H3, Isopentenylpyrophosphatdimethylallylpyrophosphatisomerasen, vakuoläre ATP-Synthasen, Polyubiquitine, *RBCS*, *PSAD* und *PSAH* sowie vier Proteinfamilien unbekannter Funktion (siehe Anhang: genliste.xls). Von diesen Genen mit mehr als 85 % Sequenzidentität sind in der Analyse nur *RBCS*, *PSAD* und *PSAH* enthalten. Folglich ist die Zuordnung der Expression dieser Gene im Ergebnisteil (wahrscheinlich) nicht eindeutig möglich.

#### **4.3. Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Technik**

Die Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Technik wurden in 2 experimentellen Ansätzen untersucht. Je vier Hybridisierungen mit Sonden von 5 Tage alten etiolierten Keimlingen des Wildtyps Ler-0 wurden zum einen nacheinander auf einer Membran und zum anderen gleichzeitig auf vier unterschiedlichen Membranen derselben Serie durchgeführt. Die Hybridisierungssignale der 8 Experimente wiesen eine durchschnittliche Standardabweichung von 26 % auf (siehe Pkt. 3.4.4). Allerdings wurde in den 4 Experimenten auf unterschiedlichen Membranen mit 23 % eine etwas geringere durchschnittliche Standardabweichung für die Signalintensitäten ermittelt als für die 4 Experimente, die nacheinander auf derselben Membran erfolgten (26 %, siehe Anhang: Ler-0\_repro.xls). Der einzige Unterschied zwischen den beiden experimentellen Ansätzen besteht in der Wiederverwendung der Membran für nachfolgende Experimente und dem damit verbundenen Prozess des Entfernens der gebundenen,

radioaktiv markierten cDNA-Moleküle. Folglich erzeugt dieser Prozess nur eine geringe Erhöhung der Standardabweichung und führt zu keiner wesentlichen Veränderung der Hybridisierungssignale.

Um die Ursache für die Standardabweichung genauer zu überprüfen, wurden die abgeleiteten Sicherheitskriterien (siehe Pkt. 3.4.6) angewendet. 1009 cDNA-Fragmente erfüllen die beiden Sicherheitskriterien in den 8 Experimenten. Die Standardabweichung sank auf 20 %, d.h. 6 % Standardabweichung entfallen auf niedrige Signalwerte bzw. Signalwerte mit hohem Doppelspotverhältnis (siehe Pkt. 3.4.2). 11 % Standardabweichung sind möglichen Detektionsfehlern anzurechnen (siehe Pkt. 3.4.2). Ein Teil der Standardabweichung resultiert wahrscheinlich aus der biologischen Variabilität der Keimlinge in der Anzucht und ist nicht genau zu quantifizieren. Die restliche Standardabweichung der Signalwerte ist auf Membranherstellung, Sondenpräparation und Hybridisierung zurückzuführen.

Eine weitere Kontrolle zur Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Daten erfolgte durch ein klassisches Northern-Blot-Experiment. Die Northern-Blot-Methode entspricht der Umkehrung der cDNA-Array-Methode. Im Unterschied zu dieser lässt die Northern-Blot-Methode selbst bei Wiederverwendung der Membran nur die Untersuchung der Genexpression einiger weniger Gene zu. Mittels Northern-Blot konnte die Expression des *LHCA3* Genes in den Wildtypen Col-0 und Ler-0, den Phytochrommutanten *phyA*, *phyB* und *phyAB*, der Mutante *det1* und der transgenen Linie bestätigt werden (Tab. 10). Bereits eine Reihe anderer Autoren zeigten (Schena *et al.* 1995, DeRisi *et al.* 1997, Ruan *et al.* 1998, Sreenivasulu *et al.* 2002, Potokina *et al.* 2002), dass die beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern. In der vorliegenden Arbeit diente der Vergleich der Sicherung der Ergebnisse bei der Bestrahlung verschiedener etiolierter Keimlinge mit Weißlicht (siehe Pkt. 3.5 und 6.1). Diese Ergebnisse könnten durch Kreuzhybridisierung möglicherweise beeinflusst werden, da zwischen *LHCA3* und *LHCB4.2* eine Nukleotidentität von 79 % (siehe Pkt. 3.4.5 und Tab. 6) besteht. Der Vergleich von Northern-Blot- und cDNA-Array-Experimenten sollte durch eine Kreuzhybridisierung nicht beeinträchtigt sein, da eine mögliche Kreuzreaktion in beiden experimentellen Methoden gleichermaßen das Ergebnis beeinflussen müsste.

Auch Literaturdaten bestätigen das mit den cDNA-Arrays ermittelte Expressionsprofil einiger Gene. Abnehmende Expression bei Belichtung in den Wildtypen war bisher nur für wenige Gene wie z. B. *PHYA*, *PORA* und *PORB* (Bruce *et al.* 1989, Apel *et al.* 1981) gezeigt worden. *PORA* wurde aufgrund des Doppelspotkriteriums bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Die abnehmende Expression von *PHYA* und *PORB* (Tab. 9: Gruppe 1) entsprach den veröffentlichten Daten (vgl. Abb. 18 und Tab. 9). Zunehmende Expression (in den Wildtypen) bei Belichtung wurde für Gene wie *LHCB2*, *RBCS3* (Tobin und Silverthorne 1985) und

Rubiscoaktivase (Orozco und Ogren 1993) bereits gezeigt und konnte mit den vorliegenden Daten (vgl. Abb. 18 und Tab. 9 je Gruppe 9) bestätigt werden.

#### **4.4. Kriterien für reproduzierbare und interpretierbare Daten**

Die Charakterisierung der cDNA-Array-Technik durch das Verhältnis zwischen Signal- und Hintergrundwert, das Verhältnis der Doppelspots zueinander, die nachbarschaftliche Beeinflussung der Signalintensitäten durch Überstrahlung und der in die Reproduzierbarkeit der Experimente wurden anhand einer Serie von 4 bzw. 8 cDNA-Array-Experimenten mit etiolierten Keimlingen des Wildtyps Ler-0 analysiert (siehe Pkt. 3.4.). Im Ergebnis dieser Analyse wurden bezüglich der Reproduzierbarkeit und Interpretierbarkeit zwei Kriterien für die Datensicherheit und ein Kriterium zur Auswahl differenziell exprimierter Gene für die Auswertung der cDNA-Arrays abgeleitet (siehe Pkt. 3.4.6.).

Ein erstes Sicherheitskriterium diene der Differenzierung von Hybridisierungssignal und Hintergrundwert sowie der Diskriminierung niedriger Signalwerte. In mindestens einem der betrachteten Experimente mußte der Signalwert zehnfach über dem Hintergrundwert liegen. Für niedrige Signalwerte ist bei gleichem absolutem Fehler von Signalintensität und Hintergrundwert ein höherer relativer Fehler charakteristisch. Entsprechend ist die Standardabweichung bei ihnen vergleichsweise höher als bei hohen Signalwerten (Abb. 13A und B). Eine Verkleinerung des eingeführten Sicherheitsfaktors würde mehr Signalwerte nahe den Hintergrundwerten und folglich mehr Signalwerte mit höherer Standardabweichung einschließen. Eine Erhöhung hingegen könnte möglicherweise differenziell exprimierte cDNA-Fragmente von der Auswahl ausschließen. Das Sicherheitskriterium mußte in nur einem der Experimente erfüllt werden, weil die Möglichkeit bestand, dass ein Gen spezifisch nur zu einem Zeitpunkt und folglich nur in einem der Experimente (z.B. in *det1*) differenziell exprimiert sein könnte, während die Expression in den anderen Experimenten unterhalb der Messgrenze lag.

Für das zweite Sicherheitskriterium wurde der Quotient der Doppelspots (kleiner 1,5) herangezogen, da der Doppelspot eine interne Kontrolle des Hybridisierungssignales darstellt (siehe Pkt. 3.4.2). Der Quotient sollte so niedrig wie möglich sein, ohne unnötig Signalwerte von der Auswertung auszuschließen. Ein höherer Quotient würde möglicherweise Hybridisierungsartefakte oder Signalwerte mit Detektionsproblemen einschließen. Wird der Quotient verkleinert, so werden weitere Gene von der Analyse ausgeschlossen. Die Wahl von 1,5 als Quotient entspricht ungefähr dem weitestmöglichen Abstand für Signalwerte von ihrem Mittelwert bei einer Standardabweichung von 26 %.

Aus der Analyse zur Reproduzierbarkeit der Experimente resultierte ein drittes Kriterium, das speziell für die Auswahl von differenziell exprimierten Genen eingesetzt wurde. Die Festlegung auf einen Faktor 5 ( $\pm 5^{0.5}$  vom Mittelwert) erfolgte, weil sich eine dreifache Standardabweichung (26 %, Faktor  $\pm 1,8$ ) zur Auswahl als unzureichend erwies (siehe Pkt. 3.4). Die Herabsetzung des Faktors würde zwar mehr Gene differenziell exprimiert erscheinen lassen, aber den dargestellten und nachfolgend diskutierten Sachverhalt nicht verändern.

#### 4.5. Hauptkomponentenanalyse

Nach Etablierung der Methode wurde im wissenschaftlichen Teil der Arbeit die Genexpression während der frühen Photomorphogenese analysiert. Dafür wurden 5 Tage alte etiolierte Keimlinge der Wildtypen Col-0, Ler-0 und Ws-2 (*phyD*), der Phytochrommutanten *phyA*, *phyB* und *phyAB*, der Phytochromophormmutanten *hy1* und *hy2*, der Cryptochrommutanten *cry1* und *cry2*, der Mutante *det1* und der PHYB-überexprimierenden Linie mit Weißlicht bestrahlt. Das Pflanzenmaterial wurden zu den Zeitpunkten 0 h, 0,5 h (nur Col-0 und *det1*), 2 h und 4 h geerntet, daraus Sonden angefertigt und in cDNA-Array-Experimenten verwendet (siehe Pkt. 3.5). Aus diesen cDNA-Array-Experimenten resultieren große Datenmengen. Um einen Überblick zu erhalten, wurde das statistische Verfahren der Hauptkomponentenanalyse zur Fokussierung der im Datensatz enthaltenen Information verwendet. Die sukzessive Reduzierung des Datensatzes zunächst auf die den Sicherheitskriterien (siehe Pkt. 3.4.6) und danach auf die dem differenziellen Kriterium (siehe Pkt. 3.4.6) entsprechenden Gene wurde jeweils mit der Hauptkomponentenanalyse überprüft (siehe Pkt. 3.5.1 und 3.5.2.3). Die Hauptkomponentenanalysen zeigten für die unterschiedlichen Datensätze ähnliche Abbildungen (vgl. Abb. 15, 16 und mit 17). Folglich wurden trotz der Reduktion des Datensatzes um 94 % die wesentlichen Informationen der cDNA-Array-Experimente erhalten und die in 3.4.6 beschriebenen Kriterien bestätigt.

Da die Hauptkomponentenanalyse die maximale Varianz multivariabler Daten in einer minimalen Zahl von orthogonalen Hauptkomponenten (-achsen, -dimensionen) abnehmend konzentriert, sind die ersten Achsen für die Hauptkomponentenanalyse bestimmend. Ideal wäre die Abbildung der Gesamtvarianz auf einer (der ersten) Achse. Die Abb. 15, 16 und 17 zeigen in einem zweidimensionalen Koordinatensystem, in dem die Abszisse der 1. (höchsten) und die Ordinate der 2. Varianz entspricht, eine Gesamtvarianz der Expressionsdaten in den Weißlichtexperimenten in Abhängigkeit vom verwendeten Datensatz von 50, 66 und 77 %. Mit der Reduktion des Datensatzes nimmt die dargestellte Varianz zu (vgl. Abb. 15,

16 und mit 17). Gleichzeitig wird die wesentliche Information konzentriert, indem die Distanzen zwischen Experimenten mit ähnlicher Aussage (z. B. ähnliche Genexpression) geringer werden und bei unterschiedlicher Information erhalten bleiben. Das zeigt z. B. die Einordnung der Experimente mit dem Wildtyp Col-0 in die Hauptkomponentenanalyse (siehe Abb. 15, 16 und 17).

Die Hauptkomponentenanalyse klassifiziert die cDNA-Array-Experimente in voneinander unabhängige Gruppen. Zu einer Gruppe zählen diejenigen Experimente, die in der Hauptkomponentenanalyse geringe Distanzen zueinander aufweisen und somit zum Zeitpunkt der Probenahme eine ähnliche Genexpression zeigen. Entscheidend für die Analyse der Gruppenbeziehungen ist die Anzahl der dargestellten Dimensionen (Achsen) und die damit verbundene Varianz. Das wird am Beispiel der Gruppe 4 (siehe Pkt. 3.5.1 und 3.5.2.3) deutlich. Im zweidimensionalen Koordinatensystem der Hauptkomponentenanalyse sind die Experimente mit belichteten Keimlingen der PHYB-überexprimierenden Linie weder der Gruppe von Experimenten mit etiolierten Keimlingen (Gruppe 1) noch der Gruppe von Experimenten mit belichteten Keimlingen (Gruppe 2) zu zuordnen (vgl. Abb. 15, 16 und mit 17). Die Eigenständigkeit als Gruppe wird für die Experimente mit belichteten Keimlingen der transgenen Linie in der Darstellung der ersten drei Achsen (Dimensionen) deutlich, indem diese beiden Experimente nicht in der Ebene der Gruppen 1 und 2 liegen. Die Darstellung der Hauptkomponentenanalyse in einem räumlichen Koordinatensystem (3 Dimensionen) ist im Programm "J-Express" zwar verfügbar, aber nicht die Koordinaten (Vektoren) und auch nicht die Varianzen (Zahlenwerte) der Achsen.

Auch bei Veränderung von Auswahlkriterien (siehe Pkt. 3.4.6) veränderte sich die Hauptkomponentenanalyse nur geringfügig und die gruppenweise Zuordnung der Experimente blieb stabil (Daten nicht gezeigt). Demzufolge resultiert die ermittelte Varianz zwischen den Pflanzen hauptsächlich aus den 71 selektierten differenziell exprimierten Genen (88 cDNA-Fragmente). Somit nutzte die Hauptkomponentenanalyse zur Fokussierung der im Datensatz enthaltenen wesentlichen Informationen und deren Überprüfung in dem schrittweise reduzierten Datensatz. Durch diese Konzentrierung konnte die Analyse der cDNA-Array-Experimente wesentlich vereinfacht werden.

#### **4.6. Gruppierung von ko-exprimierten Genen**

Nach der zunächst komplexen Analyse der Weißlichtexperimente (siehe Pkt. 3.5) konnte mit Hilfe von Auswahlkriterien (siehe Pkt. 3.4.6) und Hauptkomponentenanalysen (siehe Pkt.

3.5.1 und 3.5.2.3) der Datensatz schrittweise auf 71 differenziell exprimierte Gene (88 cDNA-Fragmente) reduziert werden. Die wesentlichen Informationen (siehe 3.5.1 und 4.5) blieben trotz der Reduktion erhalten. Um eine weitere Vereinfachung bzw. eine detailliertere Analyse der frühen Genexpression während der Photomorphogenese zu erreichen, wurden die Gene des reduzierten Datensatzes mit Hilfe des statistischen Verfahrens "K-Mean-Clustering" auf der Basis ihrer Expression in den einzelnen Pflanzen gruppiert (siehe Pkt. 3.5.3). Wie bereits im Ergebnisteil der Arbeit dargelegt (siehe Pkt. 3.5.3), entspricht die verwendete Gruppierung nur einer von vielen möglichen. In dem verwendeten statistischen Verfahren ist die Aufteilung der Gene in Gruppen sowohl von der vorgegebenen Gruppenanzahl als auch von der gewählten Zufallszahl abhängig. Mit der Veränderung der Zufallszahl wird die Lage der orthogonalen Hauptachsen (Hauptkomponenten) in der Punkteschar verändert und somit in Abhängigkeit von den Distanzen zwischen Punkten (die Lage eines Punktes entspricht der Expression eines Genes in den betrachteten Experimenten) die zu einer Gruppe zu zählenden Gene. Wenn der Prozess der Gruppenbildung mehrfach mit unterschiedlichen Zufallszahlen durchlaufen wird und im Ergebnis die Gene auf ihre Gruppenzugehörigkeit verglichen werden, so ist festzustellen, dass einige Gene immer wieder einer gemeinsamen Gruppe angehören, während andere Gene einer anderen Gruppe zugeordnet werden. D.h. einige Gene haben nur geringe Expressionsunterschiede in den einzelnen Experimenten und bilden quasi den Kernbereich einer Gruppe. Andere hingegen sind im Randbereich einer Gruppe lokalisiert und werden somit bei Veränderung des Koordinatenursprungs anderen Gruppen zugeordnet. Ein Nachteil des Verfahrens für die Analyse von ko-exprimierten Genen ist, dass Gene, deren Expression von der Expression aller anderen Gene abweicht und die somit zu keiner der Gruppen zu zählen sind, letztlich einer der vorhandenen Gruppen zugeordnet werden. Z. B. ist die Expression der zwei Gene von Gruppe 4 (siehe Abb. 18) in der Mutante *det1* deutlich unterschiedlich, so dass diese beiden Gene eigentlich in unterschiedliche Gruppen gehören sollten.

Die Gruppenzusammensetzung, die wie oben beschrieben bedingt variabel ist, hat Auswirkungen auf die Promotorelementsuche und könnte erklären, weshalb in der Promotorelementsuche nicht alle Gene einer Gruppe dasselbe Promotorelement aufweisen. Außerdem liegt der Gruppenzusammensetzung aufgrund der statistischen Auswertung der Genexpression nicht unbedingt ein biologischer Zusammenhang zugrunde (siehe Pkt. 3.5.3). Zusätzlich wird die Gruppenzugehörigkeit von Genen durch Messgenauigkeit bzw. Reproduzierbarkeit (siehe Pkt. 3.4) beeinflusst.

Ein weiterer Aspekt der Gruppierung von Genen auf der Basis der Ko-Expression ist, dass möglicherweise Gene ohne funktionelle Beschreibung in einem biologischen Zusammenhang

mit den anderen Mitgliedern der Gruppe stehen könnten. In den Gruppen 1 und 2 (Abb. 18, Tab. 9) waren unter den Genen in den Wildtypen 5 Gene ohne Funktionsbeschreibung, in den Gruppen 8 bis 10 (Abb. 18, Tab. 9) wurden 3 Gene ohne funktionelle Zuordnung ermittelt. Letztere könnten insbesondere mit der Photosynthese im Zusammenhang stehen, da in diesen drei Gruppen (Gruppen 8 bis 10: Tab. 9) hauptsächlich kernkodierte Gene von Proteinen des Photosyntheseapparates enthalten sind. Eine Zuordnung der anderen "unbekannten" Gene zu bestimmten Stoffwechselwegen ist aufgrund der unterschiedlichen funktionellen Zuordnung der Gene in den Gruppen nicht möglich, da nur ca. 1/22 der Gene des Arabidopsisgenoms auf der Membran enthalten sind.

#### **4.7. Genexpression während der frühen Photomorphogenese**

Die Ähnlichkeit von Expressionsprofilen war Voraussetzung für die Gruppierung ko-exprimierter Gene (Abb. 18). Bisher wurde die Expression der Gene einer Gruppe in Wildtypen oder Mutanten analysiert. Im folgenden wird die Genexpression der Gruppen in Wildtypen und Mutanten im Zusammenhang mit der Lichtwahrnehmung der Pflanzen diskutiert.

Im Vergleich der Wildtypen untereinander war die Expression der Gene bei Bestrahlung mit Weißlicht ähnlich (siehe Abb. 18). Das war einerseits von den Wildtypen zu erwarten, andererseits stellt *Ws-2* auch gleichzeitig eine *PHYD*-Mutante und somit eine Rotlichtrezeptormutante dar (Aukerman *et al.* 1997). Die Hauptkomponentenanalysen (Abb. 15, 16 und 17) bestätigten das ähnliche Expressionsverhalten der Wildtypen. Der Vergleich der Experimente in der Hauptkomponentenanalyse zeigte nicht nur ein ähnliches Expressionsverhalten für Wildtypen untereinander sondern auch der Rot- und Blaulichtrezeptormutanten zu diesen (Abb. 15, 16 und 17). Das kann auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein. Weißlicht könnte für die Untersuchung einer frühen Phase der Photomorphogenese in Rot- bzw. Blaulichtrezeptormutanten ungeeignet sein oder die Analyse erfolgte zu früh nach der Belichtung. Entsprechend wäre der Phänotyp noch nicht ausgeprägt und die Unterschiede in der Genexpression noch zu gering. Dem widersprechen die Ergebnisse der Lichtpulsexperimente, nach denen kurzzeitiges rotes bzw. blaues Licht die Expression der Gene des Photosyntheseapparates ebenfalls stimuliert (vgl. Abb. 21). Spätere Stadien wurden nicht untersucht, so dass eine Aussage darüber nicht möglich ist. Denkbar wäre auch, dass sich die eigentlichen lichtgesteuerten differenziell exprimierten Gene nicht auf der Membran befinden. Allerdings sind mit den kernkodierten Genen des Photosyntheseapparates gerade diejenigen Gene im cDNA-Array enthalten, die erwartungsgemäß zu den lichtinduzierten

Genen zu zählen sind (siehe Pkt. 1 und 3.2).

In früheren Untersuchungen wurden überlappende, ergänzende bzw. auch konkurrierende Funktionen der Photorezeptoren gezeigt (Reed *et al.* 1994, Casal und Boccalandro 1995, Whitelam und Devlin 1997, Casal und Mazella 1998, Neff und Chory 1998, Ahmad *et al.* 1998, Mockler *et al.* 1999). Die vorliegenden Daten zur Genexpression verweisen während der frühen Phase der Photomorphogenese auf eine von *PHYA*, *PHYB*, *PHYD*, *CRY1* oder *CRY2* unabhängige Entwicklung (Abb. 15, 16 und 17). Dieses Ergebnis wurde für die Phytochrome A, B und D durch die Weißlichtexperimente mit den Phytochromchromophor-mutanten *hyl* und *hy2* (siehe Anhang: Pkt. 6.1) bestätigt. Darüber hinaus schließen diese Experimente die nicht untersuchten Phytochrome C und E in die Analyse mit ein, da durch den Defekt in der Chromophorbiosynthese keine Phytochrom-vermittelte Lichtwahrnehmung stattfinden dürfte. Demzufolge ist festzustellen, dass weder Phyto- noch Cryptochrome einen Einfluss auf die frühe Phase der Photomorphogenese ausüben.

Die Mutante *det1* hingegen unterschied sich nicht nur im Phänotyp (Abb. 6) sondern auch im Expressionsverhalten der Gene (Abb. 15, 16, 17 und 26) deutlich von Wildtypen und Photorezeptormutanten. Nach Chory *et al.* (1989) ist die Expression lichtregulierter kernkoderter (*LHC*, *RBCS*) und plastidär kodierter Gene (*RBCL*, *PSAA*, *PSBA*) in etiolierten Keimlingen von *det1* erhöht. In lichtgewachsenen Keimlingen der Mutante entsprachen die Expressionswerte dieser Gene hingegen denen des Wildtyps Col-0 (Chory *et al.* 1989). Entsprechend wurde das Gen *DET1* als Repressor eingestuft (Chory *et al.* 1989, Ang und Deng 1994, Pepper *et al.* 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde während der frühen Photomorphogenese ein anderes Expressionsverhalten der Gene in der Mutante *det1* bei Belichtung gegenüber den Wildtypen ermittelt. Erwartungsgemäß wurde für die differenziell exprimierten Gene kernkodierter Proteine des Photosyntheseapparates der Gruppen 8 bis 10 (Abb. 18, Tab. 9) eine zunehmende Expression bei Bestrahlung mit Weißlicht in den Wildtypen bestimmt. In der Mutante *det1* hingegen wurden abnehmende Expressionswerte für diese Gene bei Belichtung festgestellt. Letzteres wurde kürzlich auch von Ma *et al.* (2003) veröffentlicht. Dementsprechend fehlt in der Mutante *det1* eine Komponente, die diese Gene bei Belichtung aktiviert.

Der Vergleich der Expressionswerte der Gene von Gruppe 8 und 9 (Abb. 18) in etiolierten Keimlingen (Zeitpunkt 0 h) von *det1* und Wildtypen zeigt, dass *DET1* in etiolierten Keimlingen auch als Repressor fungiert (s. o.). In den Gruppen 1 und 3 (Abb. 18) hingegen lagen die Expressionswerte der Gene in etiolierten Keimlingen der Wildtypen höher als in der Mutante *det1*. Somit fungiert *DET1* im Dunkeln nicht nur als Repressor sondern auch als Aktivator. Dieses duale Verhalten wurde auch bei Belichtung festgestellt. Die Unterdrückung der Gene



der Gruppen 8 bis 10 (Abb. 18) bei Bestrahlung mit Weißlicht wurde bereits diskutiert (s. o.). Im Gegensatz zu diesen war für die Gene der Gruppen 2 und 6 (Abb. 18) in der Mutante *det1* im Vergleich zu den Wildtypen eine Verstärkung der Expression bei Belichtung und somit eine aktivierende Wirkung zu verzeichnen. Folglich könnte DET1 als eine Art Schalter sowohl bei Dunkelheit als auch bei Licht funktionieren, wobei zwischen primären - von DET1 direkt beeinflussten Genen und sekundären Effekten (indirekter Einfluss von DET1) auf der Basis dieser Experimente nicht unterschieden werden kann. Interessanterweise gab es Gene, die in der Mutante *det1* vornehmlich nur in Dunkelheit (Abb. 18, Gruppe 7) bzw. nur unter Lichteinfluss (Abb. 18: Gruppen 2 und 6) reguliert wurden. Das deutet auf mehrere wirkende Komponenten bzw. sekundäre Effekte hin (s.u.).

In der PHYB-überexprimierenden Linie war ebenfalls abweichendes Expressionsverhalten von Wildtypen und Photorezeptormutanten zu verzeichnen (siehe Pkt. 3.5.1 und 3.5.3). Im Unterschied zur Mutante *det1* trat diese Divergenz erst nach Belichtung auf (Abb. 15, 16, 17 und 26), obwohl PHYB unter der Kontrolle des 35S-Promotors kontinuierlich exprimiert wird (Wagner *et al.* 1991). Demzufolge ist PHYB erst in der lichtaktivierten P<sub>FR</sub>-Form funktionell aktiv. Das steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren (siehe Kendrick und Kronenberg 1994). Auffällig ist, dass im Vergleich zur Mutante *det1* nur einige Gene durch PHYB reguliert wurden. Demzufolge sind Gene der Gruppen 1, 3 bis 5 und 7 (Abb. 18) aufgrund ihres annähernd gleichen Expressionsverhaltens in Wildtypen, Photorezeptormutanten und 35S::PHYB bei Bestrahlung mit Weißlicht als nicht PHYB reguliert einzustufen. Zunehmende Expressionswerte in 35S::PHYB wurden dagegen für die Gene der Gruppe 6 (Abb. 18) bei Belichtung ermittelt. Die verstärkte Expression dieser Gene wurde ebenfalls in der Mutante *det1* festgestellt. Folglich sind diese Gene nicht nur direkt oder indirekt PHYB reguliert, sondern auch überlappend von DET1 in derselben Art und Weise beeinflusst (vgl. Abb. 18). Das Expressionsverhalten für die Gene der Gruppen 8 bis 10 (siehe Abb. 18) in der PHYB-überexprimierenden Linie gleicht weder dem in den Wildtypen/Photorezeptormutanten noch jenem in der *det1* Mutante (vgl. Abb. 18). Während in der Mutante *det1* abnehmende und in den Wildtypen zunehmende Expressionswerte bei Bestrahlung mit Weißlicht ermittelt wurden, waren die Werte in der transgenen überexprimierenden Linie trotz Belichtung relativ konstant (vgl. Abb. 18). Aus dem unterschiedlichen Expressionsverhalten der Gene in der transgenen Linie im Vergleich zu Wildtypen und Photorezeptormutanten bzw. zu dem in der Mutante *det1* ist auf eine Beeinflussung der Transkription durch PHYB zu schließen. Einerseits ist eine Repression für die Gene der Gruppen 8 bis 10 in der transgenen Linie gegenüber den Wildtypen zu verzeichnen, andererseits eine Aktivierung gegenüber *det1*. Die PHYB-Überexpression hat vermutlich Kon-

kurrenz bzw. Überlagerung des Signals zur Folge, wovon insbesondere die kernkodierte Proteine des Photosyntheseapparates betroffen sind (Gruppen 8 bis 10: Abb. 18, Tab. 9). Die Ursache für dieses Expressionsverhalten liegt möglicherweise in der konstanten Expression durch den 35S-Promotor und dem erst nach Belichtung in der P<sub>FR</sub>-Form agierenden PHYB (in Kendrick und Kronenberg 1994). Eine Funktion der P<sub>R</sub>-Form, wie von Liscum und Hangarter (1993), Reed *et al.* (1994) und Shinomura *et al.* (1994, 2000) vermutet, war in diesen Experimenten nicht zu erkennen.

#### 4.8. Promotorelemente

Mit der Gruppierung der Gene aufgrund ihres Expressionsverhaltens in Wildtypen und Mutanten wurde deutlich, dass Gene wie z. B. die für Proteine des Photosyntheseapparates (siehe Pkt. 3.7) einer Ko-Expression unterliegen. Eine Möglichkeit der Regulation der Genexpression besteht auf Transkriptionsebene durch Transkriptionsfaktoren, die an Promotorelemente der Gene binden (Mathews und van Holde 1990, Ferl und Paul 2000). Deshalb wurden für jedes differenziell exprimierte Gen die Sequenz von 500 bp vor dem Startkodon aus der genomischen Sequenz extrahiert und mit dem Programm "Meme" bezüglich kurzer nahezu identischer Sequenzabschnitte verglichen. Mit der Wahl der Parameter im Programm "Meme" wird das Suchergebnis beeinflusst. Die Einschränkungen bezüglich der Länge des gesuchten Sequenzabschnittes waren notwendig, um sinnvolle Suchergebnisse zu erreichen. Wird die untere Schranke bezüglich der Länge der zu suchenden Sequenz zu tief angesetzt, werden viele x-beliebige Sequenzabschnitte aufgrund ihres statistischen Vorkommens in der Sequenz herausgesucht. So diente die untere Schranke ( $\geq 5$  bp) der Wahrung der Spezifität. Die obere Schranke bzw. die maximale Länge des zu erwartenden Sequenzmotivs ergab sich aus der Größe der Transkriptionsfaktoren. Demnach könnte ein Transkriptionsfaktor von 500 aa als globuläres Protein etwa 15 bp je nach Streckung der DNA bzw. der Dichte des Proteins abdecken (siehe Pkt. 3.5.5). Entsprechend wurde die obere Schranke mit 15 bp festgelegt. Von längeren Sequenzabschnitten für die gesuchten Promotorelemente wurde auch deshalb nicht ausgegangen, weil die Proteine wahrscheinlich nur partiell mit der DNA interagieren. Desweiteren wurden bei Erhöhung der vorzugebenden Sequenzlänge lediglich Elemente mit geringer Identität zwischen den einzelnen Mitgliedern bzw. mit hohen Erwartungswerten gefunden (Daten nicht gezeigt). Innerhalb der Grenzwerte (siehe Pkt. 3.5.4) blieben die Suchergebnisse auch nach Veränderung weiterer Parameter (Anzahl der Motive, Häufigkeit, Suchrichtung und DNA-Strang) relativ stabil und zeigten in

Abhängigkeit von den vorgegebenen Parametern für das gefundene Promotorelement nahezu diesselben Gene (Daten nicht gezeigt).

Nicht alle Gene einer Gruppe (Tab. 9) müssen im Ergebnis der Promotoranalyse enthalten sein. Die Ursache ist zum einen im statistischen Verfahren “K-Mean Clustering” begründet. In Abhängigkeit von den gewählten Parametern des Verfahrens (Zufallszahl, Anzahl der Gruppen) waren die Gene aufgrund ihrer Expression in Wildtypen und Mutanten nicht ein und derselben Gruppe zugehörig. Demzufolge können Gene des “Randbereiches” einer Gruppe auch anderen Gruppen mit ähnlicher Expression angehören. Zum Beispiel ist das Gen *LHCB5* mit je einem cDNA-Fragment in Gruppe 8 bzw. 10 vertreten (vgl. Tab. 9). Derartige Ergebnisse können auf verschiedenen cDNA-Fragmenten, unterschiedlichen PCR-Amplifikationen bzw. auch unterschiedlicher Materialübertragung während der Membranherstellung beruhen.

Die verwendeten 500 bp vor dem Startkodon erwiesen sich insofern für die Promotorelementsuche als hinreichend, da die identifizierten Promotorelemente nur im Bereich von -300 bp bis -1 bp vor dem Gen signifikant häufiger auftreten (siehe Abb. 23). Für G-box bzw. G-Box-ähnliche Promotorelemente wurde das durch die Umkehrung der Expressions-/Promotorelementanalyse in Pkt. 3.5.6 bestätigt, indem die Promotoren (500 bp vor ATG) aller Gene von Arabidopsis nach den entsprechenden Sequenzen durchsucht wurden (siehe Anhang: G\_Box.xls). Auch eine Verwendung von 2000 bp vor dem Startkodon für die Promotorelementsuche von allen Genen des Arabidopsis Genoms ändert nichts an der signifikanten Häufung der G-Box im Bereich von -300 bis -100 bp vor dem Startkodon (L.Altshmidt, persönliche Mitteilung).

Die G-Box (CCACGTGG) wurde sowohl in Gruppen von Genen in Belichtungsexperimenten mit Weißlicht (Gruppen 9 und 10, Tab. 9) als auch mit spezifischen Lichtbedingungen (Tab. 14) bestrahlter etiolierter Keimlinge gefunden. Die vollständige G-Box ist in den Gruppen 9 und 10 (Tab. 9) nur vor den Genen Rubiscoaktivase, *RBCS3b*, *PSAH2* und *PSBQ1* enthalten. *PSAH2* und *PSBQ1* verfügten sogar über ein zweites G-Box (ähnliches) Promotorelement (siehe Anhang: G\_Box.xls). Möglicherweise führt dieses zur Expressionsverstärkung, die von Ishige *et al.* (1999) mit GUS-Aktivitätsmessungen durch Nutzung von vier aufeinander folgenden G-Box Sequenzen gezeigt wurde. Die Mehrzahl der in den Promotoren gefundenen Motive umfasst G-Box ähnliche Elemente (vgl. Tab. 12 und Anhang: Motive\_Groupen.xls, spez\_Licht.xls). Folglich kann die palindromische Sequenz CCACGTGG nicht als allgemeine Bindestelle gelten. Die Analyse der Expressionsprofile von Genen mit G-Box-ähnlichen Promotorelementen zeigte, dass Gene mit den Motiven CCACGTGT bzw. ACACGTGG eine ähnliche Expression wie Gene mit G-Box im Promotor aufweisen (siehe

Abb. 20). Für Gene mit der Sequenz ACACGTGT trifft das nicht zu (siehe Abb. 20). Auffällig häufig waren die Gene von Proteinen des Photosyntheseapparates unter den Genen mit G-Box (-ähnlichem) Promotorelement (siehe Tab. 12 und Anhang: spez\_Licht.xls). Die Analyse zeigt für diese Gene eine deutliche Ko-Expression in den Belichtungsexperimenten (siehe Pkt. 3.7). Durchschnittlich entsprachen 2 Nukleotide in den Promotoren dieser Gene nicht der vollständigen G-Box. Die statistische Auswertung für das G-Box (-ähnliche) Element der 46 in der Promotoranalyse verwendeten "photosynthetischen" Gene ist in Abb. 24 als Gewichtsmatrix dargestellt. Die Gewichtsmatrix gibt den prozentualen Anteil eines Nukleotids auf der jeweiligen Position im möglichen Promotorelement (Motiv) wieder.

Abbildung 24 zeigt, dass die einzelnen Nukleotide der G-Box im Promotor der für Proteine des Photosyntheseapparates kodierenden Gene unterschiedlich konserviert sind (siehe Anhang: Motive\_Groupen.xls). Demnach sind insbesondere das Cytosin an zweiter Position, Adenin an der dritten und Thymin auf der sechsten Position für das Promotorelement essenziell. Dagegen sind die Nukleotide Adenin an der ersten Stelle durch Cytosin, Guanin an fünfter und achter Position durch Thymin austauschbar. In Untersuchungen zur Bindung von PIF3 an die vollständige G-Box bestätigen Martinez-Garcia *et al.* (2000) diese Analyse (teilweise), indem sich der Austausch des ersten Nukleotids der G-Box (Cytosin⇒Adenin) als konventionell erwies, während sich der Wechsel des 6. Nukleotids (Thymin⇒Guanin) als essenziell herausstellte (Martinez-Garcia *et al.* 2000). Als "kleinstes gemeinsames Vielfaches" dieser Promotoren könnte ein Promotorelement mit der Sequenz "CANNTG" fungieren. Dieses weniger spezifische als E-Box bekannte Promotorelement ist im Gegensatz zur vollständigen G-Box in fast allen gefundenen Promotorelementen enthalten. Die E-Box dient in unterschiedlichsten zellulären Prozessen (zur Übersicht siehe Atchley und Fitch 1997, Littlewood und Evan 1998) speziell in nichtpflanzlichen Systemen als Promotorelement für bHLH-Transkriptionsfaktoren, zu denen auch das pflanzliche Protein PIF3 zu zählen ist (Ni *et al.* 1998). Die E-Box selbst ist relativ unspezifisch und im Promotor (-500 bp vor dem ATG) fast jeden Genes zu finden (Gensatz der Membran "2B": 77 %, siehe Anhang: G\_Box.xls).

Mit HY5 bindet ein weiterer Transkriptionsfaktor an die G-Box (Chattopadhyay *et al.* 1998), der den Leucin-Zipper Proteinen ( $\beta$ -ZIP Proteine) zu zurechnen ist (Oyama *et al.* 1997). Den Proteinen HY5 und PIF3 bzw. beiden Gruppen von Transkriptionsfaktoren ist gemeinsam, dass sie als Dimere agieren und die Moleküle sich zu einem "X" aneinander lagern. Die obere Hälfte des "X" dient der Dimerisierung, während die unteren Schenkel an das Promotorelement in der DNA binden (Ferl und Paul 2000, Jacoby *et al.* 2002, Heim *et al.* 2003). Letzteres könnte erklären, weshalb die mittleren Nukleotide entbehrlich sind. Das zeigt andererseits auch, dass bei Gleichrichtung der X-Form von bHLH und/oder  $\beta$ -ZIP Proteinen

<b>Motiv 1</b>		<b>G</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>					
<b>G-Box-ähnlich</b>	<b>A</b>	7,5	<b>57,5</b>	2,5	<b>100,0</b>	2,5	5,0	2,5	5,0	12,5	35,0	<b>65,0</b>					
	<b>C</b>	0,0	37,5	<b>92,5</b>	0,0	<b>85,0</b>	0,0	0,0	7,5	0,0	<b>47,5</b>	27,5					
	<b>G</b>	<b>92,5</b>	5,0	5,0	0,0	7,5	<b>75,0</b>	0,0	<b>87,5</b>	<b>65,0</b>	17,5	5,0					
	<b>T</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	20,0	<b>97,5</b>	0,0	22,5	0,0	2,5					
		<b>G</b>	<b>M</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>M</b>					
<b>Motiv 4</b>		<b>G</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>					
<b>G-Box-ähnlich</b>	<b>A</b>	14,3	0,0	0,0	<b>100,0</b>	0,0	42,9	0,0	0,0	<b>92,9</b>	0,0	7,1					
	<b>C</b>	0,0	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	<b>100,0</b>	7,1	7,1	<b>100,0</b>	7,1	14,3	<b>78,6</b>					
	<b>G</b>	<b>50,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	<b>50,0</b>	0,0	0,0	0,0	28,6	0,0					
	<b>T</b>	35,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<b>92,9</b>	0,0	0,0	<b>57,1</b>	14,3					
		<b>D</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Y</b>					
<b>Motiv 2</b>		<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>
<b>PR-Motiv 1</b>	<b>A</b>	<b>78,3</b>	47,8	<b>82,6</b>	37,0	<b>69,6</b>	26,1	<b>100,0</b>	26,1	<b>76,1</b>	<b>60,9</b>	<b>69,6</b>	<b>58,7</b>	<b>91,3</b>	23,9	<b>97,8</b>	
	<b>C</b>	4,3	2,2	0,0	19,6	0,0	8,7	0,0	4,3	15,2	4,3	0,0	10,9	0,0	6,5	0,0	
	<b>G</b>	17,4	<b>50,0</b>	2,2	<b>39,1</b>	30,4	<b>65,2</b>	0,0	<b>47,8</b>	0,0	34,8	26,1	30,4	0,0	<b>69,6</b>	2,2	
	<b>T</b>	0,0	0,0	15,2	4,3	0,0	0,0	0,0	21,7	8,7	0,0	4,3	0,0	8,7	0,0	0,0	
		<b>R</b>	<b>R</b>	<b>W</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>H</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>A</b>
<b>Motiv 5</b>				<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>			
<b>PR-Motiv 2</b>	<b>A</b>			0,0	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0			
	<b>C</b>			0,0	<b>83,3</b>	8,3	<b>75,0</b>	0,0	<b>83,3</b>	33,3	0,0	<b>91,7</b>	0,0	<b>83,3</b>			
	<b>G</b>			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0	8,3	0,0	0,0	16,7			
	<b>T</b>			<b>100,0</b>	0,0	<b>91,7</b>	25,0	<b>100,0</b>	0,0	<b>66,7</b>	<b>91,7</b>	0,0	<b>100,0</b>	0,0			
				<b>T</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>S</b>			
<b>Motiv 1</b> (Tab. 14, Gruppe I)		<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>
	<b>A</b>	0,0	0,0	10,3	0,0	0,0	12,8	6,4	5,1	3,8	14,1	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6	
	<b>C</b>	9,0	<b>66,7</b>	0,0	46,2	25,6	37,2	10,3	<b>56,4</b>	2,6	<b>43,6</b>	33,3	41,0	1,3	<b>59,0</b>	11,5	
	<b>G</b>	5,1	0,0	0,0	3,8	5,1	2,6	21,8	1,3	0,0	0,0	0,0	12,8	1,3	1,3	3,8	
	<b>T</b>	<b>85,9</b>	33,3	<b>89,7</b>	<b>50,0</b>	<b>69,2</b>	<b>47,4</b>	<b>61,5</b>	37,2	<b>93,6</b>	42,3	<b>66,7</b>	<b>46,2</b>	<b>97,4</b>	39,7	<b>82,1</b>	
		<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>K</b>	<b>Y</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	
<b>Motiv 3</b>		<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	
<b>CAAT-Box</b>	<b>A</b>	35,1	<b>59,5</b>	<b>59,5</b>	32,4	27,0	<b>100,0</b>	<b>89,2</b>	35,1	13,5	<b>73,0</b>	<b>94,6</b>	29,7	0,0	<b>75,7</b>	<b>45,9</b>	
	<b>C</b>	<b>37,8</b>	35,1	35,1	<b>35,1</b>	<b>67,6</b>	0,0	0,0	<b>54,1</b>	<b>81,1</b>	24,3	5,4	0,0	<b>100,0</b>	0,0	32,4	
	<b>G</b>	2,7	0,0	5,4	0,0	0,0	0,0	5,4	0,0	5,4	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	8,1	
	<b>T</b>	24,3	5,4	0,0	32,4	5,4	0,0	5,4	10,8	0,0	0,0	0,0	<b>70,3</b>	0,0	24,3	13,5	
		<b>H</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>H</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>H</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>W</b>	<b>C</b>	<b>W</b>	<b>M</b>	
<b>Motiv 6</b>		<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	
<b>CAAT-Box-ähnlich</b>	<b>A</b>	<b>83,3</b>	0,0	0,0	<b>83,3</b>	0,0	<b>91,7</b>	<b>50,0</b>	0,0	0,0	<b>66,7</b>	16,7	41,7	<b>50,0</b>	25,0	16,7	
	<b>C</b>	0,0	<b>100,0</b>	<b>83,3</b>	16,7	<b>100,0</b>	0,0	0,0	<b>75,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	<b>41,7</b>	0,0	0,0	<b>41,7</b>	<b>83,3</b>	
	<b>G</b>	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3	0,0	
	<b>T</b>	0,0	0,0	16,7	0,0	0,0	8,3	0,0	25,0	0,0	33,3	41,7	<b>58,3</b>	50,0	25,0	0,0	
		<b>R</b>	<b>C</b>	<b>Y</b>	<b>M</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>C</b>	<b>W</b>	<b>H</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	

Abb. 24: Gewichtsmatrizen zu den in Abb. 23 und Tab. 15 dargestellten möglichen Promotorelementen (Motiven) der für Proteine des Photosyntheseapparates kodierenden Gene sowie für Motiv 1 der Gene von Gruppe I in den Lichtpulsexperimenten (Abb. 21 und Tab. 14). Das Nukleotid mit dem höchsten Anteil auf der jeweiligen Position innerhalb der Matrix ist fett markiert und im Konsensus oberhalb der Matrix wiedergegeben. Unterhalb der Matrix ist der Konsensus nach Staden/Sanger zusammengefasst.

eine Verschachtelung sowohl der Transkriptionsfaktoren als auch der Promotorelemente ineinander möglich ist. Neben der Verschachtelung von Promotorelementen bzw. Transkriptionsfaktoren besteht auch die Möglichkeit einer heterologen Dimerisierung. Fairchild *et al.* (2000) zeigten dieses für die Interaktion von HFR und PIF3. HFR, selbst ein bHLH Protein, kann weder PHYA noch PHYB binden. Der heterologe dimere Komplex hingegen bindet photoaktiviertes PHYA und PHYB. Mit PIF4 wurde ein weiteres bHLH Protein gefunden, das im Unterschied zu PIF3 jeweils separat mit der G-Box als auch mit photoaktiviertem PHYB interagiert (Huq und Quail 2002). Somit ergibt sich eine Steuerung verschiedenster Regulationswege über die Interaktion von sowohl Transkriptionsfaktoren als auch Rezeptormolekülen über das G-Box Promotorelement. Möglicherweise sind auch die zur G-Box bzw. E-Box auftretenden unterschiedlichen Randnukleotide (siehe Anhang: Motive\_Groupen.xls, spez\_Licht.xls) für die Bindung der Transkriptionsfaktoren bzw. die Steuerung der Stoffwechselwege entscheidend. Einige dieser Randnukleotide sind ebenso hoch konserviert, wie Teile der G-Box selbst (siehe Anhang: Motive\_Groupen.xls). Möglicherweise könnte die Sequenz GMCASKTSKVM (siehe Abb. 24: Konsensus Motiv 1) oder Teile von ihr ein gemeinsames Promotorelement für die Proteine des Photosyntheseapparates kodierenden Gene sein.

Zum anderen bestehen weitere Möglichkeiten zur Begründung der Unvollständigkeit der Promotorelementvorhersage in der gleichartigen Steuerung der Expression durch weitere (möglicherweise nicht erkannte) Promotorelemente bzw. auch durch andere Regulationsmechanismen. Mit der CAAT-Box wurde zunächst ein weiteres Promotorelement in der Analyse aufgrund der hohen Erwartungswerte (siehe Tab. 11) nicht betrachtet. Erst die Suche nach Promotorelementen für die Gene von Proteinen des Photosyntheseapparates offenbarte deren Signifikanz. Aus der Literatur ist eine lichtabhängige Steuerung der Transkription von *ATPC* bekannt (Kusnetsov *et al.* 1999), indem *ATPC2* an ein Adeninnukleotid drei Basenpaare vor der CAAT-Box bindet und die Transkription des an die CAAT-Box bindenden CBF-Komplexes verhindert (Bezhani *et al.* 2001). Die statistische Analyse der für Proteine des Photosyntheseapparates kodierenden Gene zeigt (Abb. 24), dass die CAAT-Box (Abb. 24: Motiv 3) zwar in einer Reihe von Genen vorkommt, aber das eigentliche Promotorelement möglicherweise nur unzureichend beschreibt. Aus dem Vergleich der Promotorabschnitte für die CAAT-Box ist zu entnehmen, dass lediglich ein Adeninnukleotid an der dritten Position in fast allen dieser Promotoren (95 %) auftritt (siehe Abb. 24). Dagegen ist das Adenin drei Basenpaare vor der CAAT-Box in allen dieser Promotoren enthalten. Ebenso essenziell dürfte das Cytosin unmittelbar nach der CAAT-Sequenz sein (siehe Abb. 24). Ebenfalls hoch konserviert ist ein weiteres Adeninnukleotid zwei Basenpaare vor der CAAT-

Box. Folglich ist ein mögliches Bindemotiv eventuell mit (HMMHM)AAHMMAWCW zu beschreiben (siehe Abb. 24).

Außer der G- und CAAT-Box wurde noch ein purinreicher Sequenzabschnitt (PR-Motiv 1, Tab. 15) in allen Promotoren der für Proteine des Photosyntheseapparates kodierenden Gene identifiziert. Dieses unmittelbar vor dem Startkodon lokalisierte Promotorelement könnte mit der Sequenz RRWRRRARHRRRARA beschrieben werden (siehe Abb. 24: Konsensus Motiv 2). Ein zu diesem ähnliches allerdings komplementäres Element mit ähnlicher Position vor dem Startkodon wurde in der Promotorelementanalyse der Experimente mit spezifischen Lichtbedingungen identifiziert. Das mit YYWYYYKYWYYYTTY (komplementär: RRSRRRHSRRRARR) definierte Promotorelement wurde jedoch nur für die Gene ohne Induktion (Gruppen I und II) unter den spezifischen Lichtbedingungen gefunden, woraus eine mögliche repressive Wirkung von Transkriptionsfaktoren auf die Gene über das Promotorelement zu schließen wäre. Im Gegensatz dazu wird für die Gene von Proteinen des Photosyntheseapparates mit dem komplementär-ähnlichen Promotorelement unter den jeweiligen Lichtbedingungen die Expression induziert.

Das Vorhandensein der drei Promotorelemente (G-Box-ähnlich, CAAT-Box-ähnlich und PR-Motiv) könnte möglicherweise spezifisch für die lichtabhängige Steuerung der Genexpression von Proteinen des Photosyntheseapparates sein. Möglicherweise sind weitere Gene ohne Funktionsbeschreibung über diese Kombination von Promotorelementen dem Photosyntheseapparat zu zuordnen. Auch eine allgemeinere Nutzung der Bindestellen in Kombination mit anderen Promotorelementen ist denkbar. Die Anzahl derzeitig bekannter Transkriptionsfaktoren (ca. 1800 Gene im Arabidopsisgenom, H. Bäumlein, persönliche Mitteilung) und ihre Variationsmöglichkeiten sind vielfältig (s. o.). Eine Aussage zu Transkriptionsfaktoren, die die identifizierten Bindestellen benutzen, ist auf der Basis von cDNA-Array Experimenten und somit auf dem Stand der derzeitigen Experimente nicht möglich.

#### 4.9. Unbekannter Lichtfaktor

In den vorhergehenden Abschnitten wurde die Genexpression vergleichend zwischen Wildtypen und Mutanten sowie die möglichen Promotorelemente erörtert. Beides soll im folgenden im Zusammenhang mit der frühen Photomorphogenese diskutiert werden.

Für Pflanzen wurde die Bindung von PIF3, einem bHLH Protein, an die vollständige G-Box *in vivo* gezeigt (s. o., Martinez-Garcia *et al.* 2000). PIF3 wiederum interagiert mit dem N-Terminus des Rotlichtphotorezeptors PHYB bzw. auch schwach mit dem von PHYA (Ni *et*

al. 1998, 1999, Zhu *et al.* 2000). Allerdings erfolgt die Interaktion erst nach der Photoaktivierung des Phytochroms in die P<sub>FR</sub>-Form. Abb. 25B zeigt ein Modell für eine mögliche Beeinflussung der Transkription über die G-Box durch die Phytochrome B und A. Das Expressionsverhalten der Proteine des Photosyntheseapparates kodierenden Gene (Abb. 25A und Abb. 18: Gruppen 8, 9, 10) bei Belichtung in den Wildtypen entspricht diesem Modell (Abb. 25B), aber nicht das Expressionsverhalten der Gene in den Phytochromphotorezeptormutanten (Abb. 25A und Abb. 18: Gruppen 8, 9, 10). Keines der einzeln "ausgeschalteten" Phytochromgene A und B und auch nicht deren Kombination verändern die Expression unter Weißlichtbedingungen (Abb. 25A). Mit *Ws-2* befand sich bereits eine weitere Phytochrommutante (PHYD<sup>-</sup>, Aukerman *et al.* 1998) unter den Wildtypen (Abb. 25A). Eine PHYC-Mutante existiert noch nicht und eine PHYE-Mutante stand nicht zur Verfügung (vgl. Pkt. 1. und 2.1.1). PHYC beeinflusste in überexprimierenden Linien Blattwachstum (Vergrößerung) und Inhibierung der Hypokotylverlängerung (Qin *et al.* 1997). PHYE hingegen wird sehr spezifisch z. B. im Bereich des Hypokotylhakens sowie dem oberen Hypokotyl exprimiert (Goosey *et al.* 1997) und in der lichtabhängigen Keimung benötigt (Hennig *et al.* 2002). Eine Beteiligung von PHYC und PHYE an der Stimulation der photosynthetischen Gene unter Weißlichtbedingungen ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand relativ unwahrscheinlich. Die Experimente an mit Weißlicht bestrahlten Keimlingen der Chromophormutanten *hy1* und *hy2* bestätigen die Ergebnisse der Weißlichtexperimente Phytochrommutanten (siehe Pkt. 3.5 und Anhang: 6.1) und schließen die nicht verfügbaren Mutanten der Phytochrome C und E in die Analyse mit ein. Obwohl die Lichtwahrnehmung durch Phytochrome aufgrund des Defektes in der Chromophorbiosynthese unterbrochen sein sollte, zeigen die Chromophormutanten ein ähnliches Expressionsprofil für die Gene wie Wildtypen und Phytochromrezeptormutanten (siehe Abb. 25 A). Die in dieser Arbeit präsentierten Versuche zeigen, dass die Phytochrome entgegen der allgemeinen Annahme keine Funktion während der frühen Phase der Photomorphogenese besitzen. Aus dieser Diskrepanz ist zu schlussfolgern, dass ein weiterer Photorezeptor notwendig wäre.

Mit HY5 bindet ein  $\beta$ -ZIP Transkriptionsfaktor ebenfalls an die vollständige G-Box (Abb. 27A; Oyama *et al.* 1997, Chattopadhyay *et al.* 1998). Dieser Transkriptionsfaktor wiederum interagiert mit dem lichtabhängigen Repressor COP1 (Deng *et al.* 1992, Ang *et al.* 1998). Ein Zusammenhang zu den Photorezeptoren wurde erst kürzlich von Wang *et al.* (2001) hergestellt. In "Yeast two hybrid" Studien und auch durch Ko-Immunopräzipitationsversuche konnten sie zeigen, dass der C-Terminus von CRY2 photoaktiviert mit COP1 interagiert. Gleiches wird für CRY1 vermutet (Wang *et al.* 2001). Dementsprechend könnte der Repressor COP1 den Aktivator HY5 durch dessen Inaktivierung steuern. Diese Blockie-



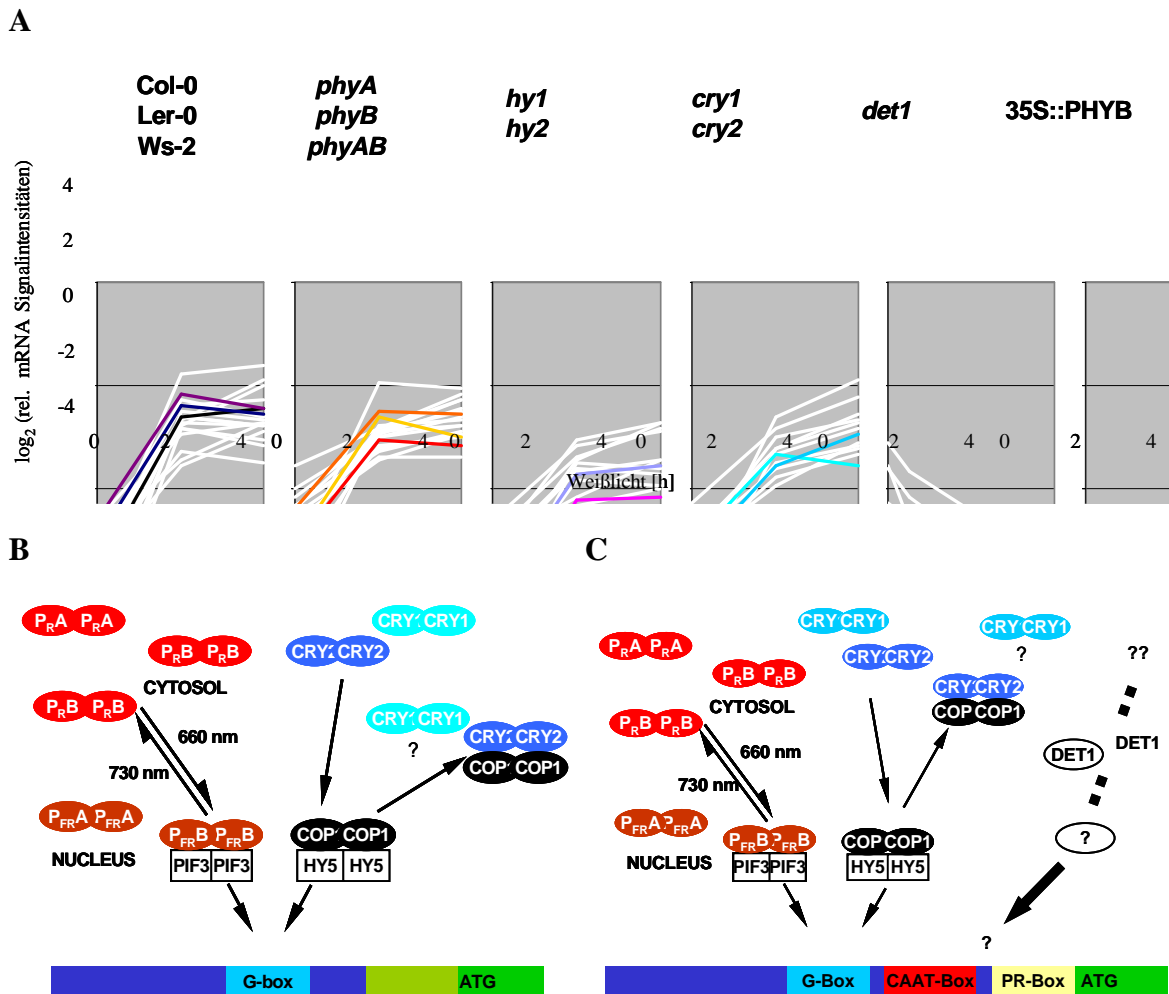


Abb. 25: Entwicklung eines Arbeitsmodells für die Lichtregulation. A: Expressionskinetik der Gene von Proteinen des Photosyntheseapparates. In den Diagrammen ist der Verlauf der Expression bei Bestrahlung mit Weißlicht für die Gene der photosynthetischen Komplexe am Beispiel von PSAH2, LHCA2, PSBS, LHCB6, PETE1 und ATPD in den Keimlingen der Wildtypen (Col-0, Ler-0, Ws-2), der Phytochrommutanten (*phyA*, *phyB*, *phyAB*), der Phytochromchromophormutanten (*hy1*, *hy2*), der Cryptochrommutanten (*cry1*, *cry2*), der PHYB-überexprimierenden Linie und der Mutante *det1* in den Weißlichtexperimenten dargestellt. Die Daten wurden logarithmisch unter Verwendung gleicher Skaleneinteilungen abgebildet. Die Farbwahl für Wildtypen und Mutanten entspricht der in Abb. 17. B: Modell zur lichtabhängigen Transkription durch Konkurrenz um die Bindung an der G-Box. C: Modell zur lichtabhängigen Transkription durch einen unbekannten Lichtfaktor während der frühen Photomorphogenese.

zung des Aktivators wiederum könnte durch die Inaktivierung des Repressors aufgehoben werden, indem die photoaktivierten Cryptochrome den negativen Regulator COP1 in seiner Wirkung lichtabhängig neutralisieren (Abb. 28B). Ebenfalls wurde gezeigt, dass CRY1 und PHYB für die Keimblattentfaltung und die Inhibierung der Hypokotylverlängerung bei Bestrahlung mit Blaulicht in rotem Hintergrundlicht einander bedingen (Casal und Mazella 1998, Neff und Chory 1998). Casal und Mazella (1998) verweisen auch auf die Unabhängigkeit von PHYA und CRY1 unter ihren Bedingungen. Dagegen beweisen Ahmad *et al.* (1998)

die direkte Interaktion von CRY1 und PHYA *in vivo*. Das Zusammenwirken von PHYA und CRY1 unter Rot- bzw. Blaulichtbedingungen wurde ebenfalls für die Steuerung der circadianen Uhr der Pflanzen festgestellt (Devlin und Kay 2000). Devlin und Kay verweisen auch auf eine redundante Wirkungsweise von CRY1 und CRY2 bezüglich der Steuerung von circadianer Rhythmik. Somit wäre auch das unveränderte Expressionsverhalten dieser Gene in Wildtypen, in Phyto- und Cryptochrommutanten erklärbar (vgl. Abb. 18), indem die Photorezeptoren miteinander interagieren bzw. eine Bindung der Transkriptionsfaktoren an das G-Box Promotorelement beeinflussen und sich in ihrer Wirkung überlappen, ergänzen bzw. auch untereinander konkurrieren.

Das Modell der Konkurrenz um die Bindung an die G-Box (Abb. 25B) steht allerdings im Widerspruch zum Expressionsverhalten der Gene von Gruppen 8 bis 10 (Abb. 18) in der PHYB-überexprimierenden Linie. Nach dem Modell wäre eine zunehmende Expression bei Belichtung aufgrund des im Überschuss zur Verfügung stehenden PHYB zu erwarten, das durch die Belichtung aktiviert ist. Die Daten verweisen hingegen auf eine kontinuierliche Expression dieser Gene in der transgenen Linie und im Vergleich zu Wildtypen und Photorezeptormutanten auf eine repressive Wirkung durch kontinuierlich exprimiertes PHYB. Auch das Expressionsverhalten der Gene in der Mutante *det1* widerspricht dem aufgestellten Modell. In der Mutante *det1* war sogar eine Abnahme der Expression für diese Gene bei Belichtung zu verzeichnen (Abb. 18: Gruppen 8-10). Daraus resultieren eine Reihe interessanter Aspekte.

Trotzdem jeder der Rot- bzw. Blaulichtrezeptoren verfügbar sein müßte, ist dem Modell der Konkurrenz um die G-Box (Abb. 25B) entsprechend keine Zunahme der Expression bei Belichtung zu verzeichnen. Somit kann eine Steuerung der Transkription durch Rot- und Blaulichtrezeptoren während der frühen Photomorphogenese unter Weißlichtbedingungen ausgeschlossen werden bzw. ist sekundär. Letzteres kann aus der aktivierenden Wirkung von PHYB im Vergleich der Expression der Gene in 35S::PHYB und *det1* entnommen werden. Folglich könnte PHYB bzw. Phytochromen und möglicherweise auch Cryptochromen eine modulierende Funktion während der frühen Phase der Photomorphogenese über ihren Einfluss auf Transkriptionsfaktoren des G-Box Promotorelementes besitzen.

Außerdem erscheint das Wirkungsspektrum von PHYB auf die Gene der Gruppen 2, 6, 8, 9 und 10 (Abb. 18) begrenzt und somit möglicherweise speziell auf die Regulation bestimmter Gruppen von Genen wie z. B. der für Proteine des Photosyntheseapparates (Abb. 24) oder des Calvinzykluses abgestimmt zu sein. Daraus wäre eine lokale Steuerung einiger weniger Prozesse zu schlussfolgern. DET1 hingegen sollte global agieren, denn alle für die Analyse ausgewählten Gene zeigen eine veränderte Genexpression in der Mutante *det1* sowohl im

Vergleich zu 35S::PHYB als auch zu Wildtypen und Photorezeptormutanten (Abb. 18).

Auf der Basis der abnehmenden Expression der Gene der Gruppen 8 bis 10 (Abb. 18) in der Mutante *det1* kann die Funktion von DET1 gegenüber den Photorezeptoren als primär eingestuft werden. Obwohl die Photorezeptoren bei Belichtung aktiv sein müßten, nimmt die Expression dieser Gene nicht zu. Folglich wäre aus dem Vergleich der Genexpression ein weiterer unabhängiger Lichtfaktor zu postulieren (Abb. 25C), der vor Phyto- als auch Cryptochromen agiert. Strand *et al.* (2003) fanden mit Magnesiumprotoporphyrin einen möglichen Signalgeber, dessen Akkumulation notwendig und ausreichend für die Steuerung der Genexpression im Zellkern ist. Inwieweit DET1 der Photorezeptor selbst oder ein Mitglied einer Signalkette ist, kann auf der Grundlage dieser Versuche nur vermutet werden (s.u.), da zwischen primären und sekundären Effekten nicht zu unterscheiden war.

Erstaunlicherweise fehlt für die Gene in der Mutante *det1* nicht nur ein Repressor in etiolierten Keimlingen im Vergleich zu etiolierten Keimlingen der Wildtypen (s. o., Abb. 18: Gruppen 8 bis 10), sondern auch ein Aktivator (Abb. 18: Gruppen 1 und 3). Reprimierende bzw. stimulierende Wirkung auf Gene durch DET1 wurde ebenfalls bei Belichtung festgestellt (siehe Pkt. 4.7; Abb. 18: Gruppen 2, 6, 8, 9 und 10). Diese duale Wirkungsweise von DET1 auf Gene bei Dunkelheit oder Licht hat zur Folge, dass DET1 möglicherweise als globaler Schalter in Photomorphogenese und Skotomorphogenese fungiert. Interessanterweise war die Expression einiger Gene zwischen *det1* und den Wildtypen nur in etiolierten Keimlingen different (s. o.; vgl. Abb. 18, Gruppe 7). Ebenfalls different verhielten sich die Gene der Gruppen 2 und 6 im Vergleich von Wildtypen und Mutante *det1* allerdings ausschließlich unter Lichteinfluss (s. o.; vgl. Abb. 18). Die duale Wirkungsweise eines Repressors und Aktivators in Dunkelheit und Licht einerseits als auch die Trennung dieser Wirkungsweisen in Dunkelheit und Licht andererseits deuten auf mehrere wirkende Komponenten bzw. sekundäre Effekte hin wie z. B. Modulation (Abb. 25C). Folglich wäre DET1 nicht als Photorezeptor sondern als nachfolgend agierende Komponente einer Signalkaskade einzustufen, wenn nicht noch mehrere gemeinsam agierende unbekannte Photorezeptoren existieren. Die Annahme einer nachfolgend agierenden Komponente einer Lichtsignalkaskade entspricht der derzeitigen Auffassung zur Funktion von DET1 (Hardtke und Deng 2000, Ma *et al.* 2001, 2003, Schröder *et al.* 2002).

In Nullmutanten von *det1* und *cop1* fanden Ma *et al.* (2003) annähernd gleiche Expressionsprofile in Dunkelheit und Licht und schlussfolgerten, dass COP1 und DET1 enger zusammenarbeiten als aus früheren Studien erwartet (Ang *et al.* 1994). Bei einem Vergleich von lichtgewachsenen Keimlingen der Wildtypen Col-0 und Ws und der Mutanten *det1* und *cop1* nach Hochlichtstresseinfluss gelangten Ma *et al.* (2003) zu ähnlichen Expressionsprofilen

und schlussfolgerten daraus, dass sowohl DET1 als auch COP1 Hochlichtstress simulieren. Ein Indiz für diese Annahme sind induzierte Lichtstressmarkergene in etioliert gewachsenen Keimlingen der Nullmutanten *det1* und *cop1* (Ma *et al.* 2003). Auch in den vorliegenden Experimenten wurde gefunden, dass in *det1* die Expression für einen Teil der auf der Membran repräsentierten potenziellen Lichtstressmarkergene (*LEA* und *HSP70*) bei Belichtung zunimmt (Abb. 18, Gruppe 6), während die Expression in Wildtypen und Photorezeptor-mutanten annähernd konstant bleibt (siehe Anhang: Datei). Ein weiteres Lichtstressmarker-gen - ein Metallothionin - zeigt sowohl in Wildtypen als auch in den Mutanten konstante Expression.

Nach Schröder *et al.* (2002) gehört DET1 zu einem 350 kDa Komplex im Zellkern, zu dem auch das DDB1 (*damaged DNA binding protein 1*) zählt. DDB1 interagiert in Tieren mit dem Histonacetyltransferasekomplex, wodurch in Pflanzen möglicherweise die Histon-Acetyl-transferase-Aktivität als Antwort auf die Lichtwahrnehmung reguliert wird. Demnach würde DET1 einem anderem Syntheseweg zugehören als COP1.

#### **4.10. Lichtwahrnehmung durch Photorezeptoren**

Die Analyse der Weißlichtexperimente zeigen, dass die Lichtwahrnehmung während der frühen Photomorphogenese unabhängig von Rot- und Blaulichtrezeptoren ist. Bisherige Untersuchungen zu Photorezeptoren wurden hauptsächlich unter speziellen Lichtbedingungen wie Rot- und Blaulichtexperimenten und dem klassischen Revertierungsexperiment R/FR durchgeführt, um die Lichtwahrnehmung der Pflanzen bzw. die lichtabhängige Expression von Genen zu charakterisieren (vgl. Pkt. 1). Aus diesem Grund wurde das Expressionsverhalten der auf der Membran repräsentierten Gene unter spezifischen Lichtbedingungen analysiert. Dazu wurden 5 Tage alte Keimlinge des Wildtyps Ler-0 kurzzeitig mit einem Rot- bzw. Blaulichtpuls bestrahlt. Die in den Weißlichtexperimenten den Gruppen 8 bis 10 zugeordneten Gene (Tab. 9) zeigten in den Experimenten mit spezifischen Lichtbedingungen ebenfalls zunehmende Expression (vgl. Abb. 18, Tab. 9 mit Abb. 21, Anhang:spez\_Licht.xls). Im Revertierungsexperiment, d. h. bei Bestrahlung der Keimlinge mit Rot- gefolgt von Dunkelrotlicht (R/FR), wurde eine Verzögerung der Expression dieser Gene ermittelt (siehe Abb. 21). Folglich war der Dunkelrotlichtpuls zunächst für die Revertierung des expressions-induzierenden Rotlichtpuls im Intervall von 0 bis 0,5 h ausreichend (siehe Abb. 21). Die zunehmende Genexpression im Zeitintervall von 0,5 bis 2 h (siehe Abb. 24) ist möglicherweise auf einen unzureichenden Dunkelrotlichtpuls zurückzuführen, da eine Revertierung

durch den Dunkelrotlichtpuls von Strahlungsintensität und -dauer abhängig ist (Mancinelli 1994). Folglich beeinflusste Dunkelrotlicht die Rotlichtinduktion nur, ohne dieselbe zu verhindern. Somit könnte die Genexpression das Resultat der Stimulation durch Phyto- oder Cryptochrome unter den angewendeten spezifischen Lichtbedingungen sein. Das schließt andererseits die Existenz eines weiteren Photorezeptors nicht aus. Umgekehrt beweist es auch nicht, dass Phyto- bzw. Cryptochrome für die Stimulation der Genexpression verantwortlich sind.

In der Promotoranalyse der Pulsexperimente wurde ebenfalls ein G-Box ähnliches Promotorelement für die Gene gefunden, deren Expression bei Belichtung zunimmt (siehe Tab. 14 und Abb. 24: Gruppen III bis V). Allerdings wurde das Element auch für Gene der Gruppen I und II (siehe Tab. 14) ermittelt, die eine relativ konstante Expression bei Bestrahlung mit spezifischen Lichtbedingungen besitzen (siehe Abb. 21). Daraus ist zu schlussfolgern, dass eine Steuerung der Genexpression nicht allein über die G-Box (E-Box) durch Phyto- bzw. Cryptochrome erfolgen kann. Die jeweils ersten Motive der Gruppen I und II besitzen in der Promotorelementsuche nicht nur die niedrigsten Erwartungswerte, sie sind auch einander ähnlich und wurden für keine andere Gruppe identifiziert (siehe Tab. 14). Das könnte auf die diskutierte Möglichkeit der Überlagerung des Lichtsignals hinweisen (s. o.), indem die Transkription über diese Promotorelemente unterdrückt wird und weitere Transkriptionsfaktoren in die Steuerung der Expression eingreifen.

Die Regulation der Transkription über weitere von der G-box verschiedene Bindestellen wird durch die Promotorelementanalyse der in Tepperman *et al.* (2001) veröffentlichten 58 frühen lichtinduzierten Gene aus dem Vergleich von Dunkelrotlichtexperimenten mit der Mutante *phyA-101* und dem Wildtyp RLD unterstützt. Im Ergebnis der Promotorelementanalyse mit "Meme" wurde die G-Box bzw. E-Box als mögliches Promotorelement gefunden (siehe Anhang: spez\_Licht.xls), allerdings nur für 47 % Gene (27 von 58) und nur eines der Gene weist eine vollständige G-Box auf. Der Erwartungswert (0,019) der Gruppe für das G-Box Motiv ist ebenfalls relativ hoch, während zwei weitere mögliche Promotorelemente weitaus niedrigere Erwartungswerte besitzen (siehe Anhang: spez\_Licht.xls). Eines von diesen ähnelt dem PR-Motiv 1 mit einem Erwartungswert von  $2.5 \times 10^{-49}$  (siehe Pkt.4.8) .

Letztlich kann auf dem gegenwärtigem Stand der Experimente nicht entschieden werden, welche(r) der Photorezeptoren in den Lichtpulsexperimenten agieren(-t). Die Weißlichtexperimente weisen darauf hin, dass weder Rot- noch Blaulichtrezeptoren für die Initiation der Genexpression der analysierten Gene von Bedeutung sind. Obwohl beide Arten von Photorezeptoren in der Mutante *det1* vorhanden sein müßten, wird die Expression der Gene

insbesondere der von Proteinen des Photosyntheseapparates (vgl. Abb. 22) nicht induziert. Folglich wirken die Photorezeptoren unter den gegebenen Weißlichtbedingungen nicht primär (s. o.), d.h. es ist ein weiterer Lichtfaktor zu schlussfolgern. Diese Schlussfolgerung steht im Widerspruch zu den Literaturdaten (vgl. Pkt. 1), die von einer Funktion der Phyto- und Cryptochrome während der frühen Photomorphogenese ausgehen (Kendrick und Kronenberg 1994). Aus den durchgeführten Rot- bzw. Blaulichtexperimenten lässt sich diese Funktion nicht eindeutig ableiten.

Die aktivierende bzw. reprimierende Wirkung von DET1 auf unterschiedliche Gene in unbelichteten und belichteten Keimlingen lässt DET1 als lichtabhängigen Schalter fungieren. Allerdings waren auch Gene von der Regulation nur in Dunkelheit (Abb. 18, Gruppe 7) bzw. nur im Licht (Abb. 20, Gruppe 2 und 6) betroffen, demzufolge agieren mehrere Komponenten in (mindestens) einem weiteren lichtabhängigen, von Phyto- und Cryptochromen unabhängigen Signalweg.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression in etiolierten Arabidopsis Keimlingen bei Belichtung untersucht, um Ereignisse während der frühen Phase der Photomorphogenese zu erfassen. Für das Studium der lichtabhängigen Genregulation auf mRNA-Ebene wurde die cDNA-Array-Methode mit der Untersuchung von Photorezeptormutanten kombiniert. 5 Tage alte etiolierte Keimlinge der Wildtypen Col-0, Ler-0 und Ws-2 (*phyD*), der Phytochrommutanten *phyA*, *phyB* und *phyAB*, der Phytochromchromophormutanten *hyl* und *hy2*, der Cryptochrommutanten *cry1* und *cry2*, der transgenen *PHYB* überexprimierenden Linie und der Mutante *det1* wurden mit Weißlicht bestrahlt. Weiterhin wurde die Genexpression des Wildtyps Ler-0 während der frühen Photomorphogenese in Rot- und Blaulichtexperimenten sowie dem klassischen Revertierungsexperiment (Rotlicht gefolgt von Dunkelrotlicht) untersucht. Die Ergebnisse wurden durch die Umkehrung der cDNA-Array Methode im klassischen Northern-Blot-Experiment bestätigt sowie durch den Nachweis von Phänotyp und Mutation der verwendeten Photorezeptormutanten untermauert.

Grundlage für die cDNA-Array-Experimente war die Herstellung von Macro-Arrays und die Etablierung der Methode. Für die Untersuchungen wurden drei Membransätze mit unterschiedlicher Anzahl von cDNA-Fragmenten hergestellt. Zwei der Membransätze dienten der Etablierung der cDNA-Array Methode. Neben der Kreuzhybridisierung als biologischem Parameter wurden technische Parameter der Methode analysiert. Die Kreuzhybridisierungsexperimente zeigten, dass ab 75 % Sequenzidentität eine Kreuzhybridisierungsreaktion möglich, ab 85 % Sequenzidentität diese wahrscheinlich ist. Aus den Daten für Kreuzhybridisierungsereignisse war keine eindeutige Korrelation zwischen Sequenzidentität und Ausmaß der Kreuzhybridisierung abzuleiten. Um die komplexen Teilprozesse der Methode (Membran- und Sondenherstellung, Hybridisierung) zu charakterisieren, wurde mit einer Serie von 8 analogen Experimenten das Verhältnis von Signalintensität und Hintergrundwert, der Doppelpot als interne Hybridisierungskontrolle, die automatische Detektion der Signalwerte, der Überstrahlungseffekt durch benachbarte Hybridisierungssignale und die Reproduzierbarkeit der Experimente analysiert. Aus der Analyse dieser Experimente wurden zwei Kriterien für die Datensicherheit und ein Kriterium für die differenzielle Expression von Genen abgeleitet, um die Reproduzierbarkeit und Interpretierbarkeit der cDNA-Array-Daten in den nachfolgenden Belichtungsexperimenten zu gewährleisten.

Durch Hauptkomponentenanalyse und abgeleitete Kriterien wurde unter Erhaltung der wesentlichen Informationen der Weißlichtexperimente der Datensatz auf 71 (88 cDNA-Fragmente) von 1188 Genen (1514 cDNA-Fragmenten) reduziert. Unter Verwendung dieser

wesentlichen Information wurde festgestellt, dass in Wildtypen und Mutanten bei Belichtung eine Veränderung der Genexpression hauptsächlich in den ersten zwei Stunden erfolgt. Phytochrom- und Cryptochrommutanten sowie auch Phytochromchromophormutanten weisen im Vergleich zu Wildtypen ein ähnliche Genexpression auf. Folglich sind Phyto- und Cryptochrome entgegen der allgemeinen Annahme über die Steuerung der Photomorphogenese nicht an dieser beteiligt bzw. ihre Wirkung ist sekundär. Eine von Wildtypen und Photorezeptormutanten abweichende Genexpression konnte bei Belichtungsexperimenten an Keimlingen der Mutante *det1* und der PHYB-überexprimierende Linie gezeigt werden. Aus dem Vergleich der Genexpression von Wildtypen/Photorezeptormutanten und Mutante *det1* kann entnommen werden, dass z. B. für die Gene von Proteinen des Photosynthesapparates eine aktivierende Komponente fehlt. Da alle Phyto- und Cryptochrome verfügbar sein müssten, ist ein weiterer Lichtfaktor zu postulieren. Die detaillierte Analyse ergab für DET1 aktivierende und repressive Wirkungen auf die Genexpression sowohl in Dunkelheit als auch im Licht. Demzufolge nimmt DET1 eine Schlüsselstellung als eine Art Schalter während der frühen Phase der Photomorphogenese ein. Zwischen primären und sekundären Effekten von DET1 auf die Genexpression ist auf diesem Stand der Experimente nicht zu unterscheiden. Aus dem Vergleich der Genexpression von transgener Linie und Wildtypen ist zu schlussfolgern, dass PHYB als Repressor während der frühen Photomorphogenese dient, während der Vergleich zur Mutante *det1* einen Aktivator vermuten lässt. Die Verwendung spezifischer Lichtquellen (pR, pR/pFR, pB) zur Belichtung von etiolierten Keimlingen des Wildtyps Ler-0 ließen keinen Rückschluss auf den/die Genexpression induzierenden Photorezeptor/en zu. Interessanterweise wurde bei Verwendung von spezifischen Lichtquellen für keines der Gene abnehmende Expression bestimmt.

Die Ko-Expression von Genen in den Belichtungsexperimenten wurde zu deren Gruppierung genutzt. Als eine mögliche Ursache für die Ko-Expression der Gene wurden gemeinsame Promotorelemente angenommen. Durch die Promotorelementanalyse wurde eine G-Box (CCACGTGG)-ähnliche Sequenz u. a. für die Proteine des Photosynthesapparates kodierenden Gene identifiziert. Das Vorkommen der G-Box-ähnlichen Sequenz in den Promotoren ist signifikant häufiger im Bereich von -225 bis -150 (-100) bp vor dem Startkodon. Im Zusammenhang mit der Genexpression während der frühen Photomorphogenese wurde deutlich, dass dieses Promotorelement wahrscheinlich nicht allein für die Steuerung der Genexpression verantwortlich ist. Außer dem G-Box-ähnlichen wurden zwei weitere Promotorelemente identifiziert, von denen eines als CAAT-Box ähnliche Sequenz zu bezeichnen ist. Dieses Promotorelement ist im Bereich von -75 bis -50 bp vor dem Startkodon signifikant erhöht, während ein purinreiches Sequenzmotiv (PR-Motiv)



unmittelbar vor dem ATG im Intervall von -50 bis -1 bp häufiger präsent ist. Das Vorhandensein aller drei Promotorelemente ist möglicherweise ein Spezifikum der Transkriptionsregulation von Genen für Proteine des Photosyntheseapparates.

Die Analyse der Genexpression verwies auch auf Gene, die spezifisch in den Keimlingen der einzelnen Wildtypen und Mutanten exprimiert werden. Zusammen mit der Analyse zur Ko-Expression von Genen und der Identifizierung von Promotorelementen eröffnet sich gleichzeitig die Chance Gene mit bisher unbekannter Funktion in einen biologischen Zusammenhang zu stellen.

## 6. Anhang

### 6.1. Weißlicht-cDNA-Array-Experimente mit Phytochromchromophormutanten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der cDNA-Array-Technik anhand wiederholter cDNA-Array-Experimente und in Umkehrung der cDNA-Array-Methode durch Northern-Blot-Technik demonstriert. Unabhängig von diesen Experimenten sollten die überraschenden Ergebnisse der cDNA-Array-Experimente mit Weißlicht bestrahlter Keimlinge (siehe Pkt. 3.5) überprüft werden. Die Analyse zeigte, dass keines der mutierten Phytochromgene wesentlichen Einfluss auf die Genexpression der auf der Membran repräsentierten Gene bei Bestrahlung mit Weißlicht hat (Abb. 17 und 18).

Mit *phyA*, *phyB* und *phyD* (*Ws-2*) standen nur für 3 der 5 Phytochromgene in Arabidopsis Mutanten zur Verfügung (siehe Pkt. 1. und 2.1). Um sowohl den Einfluss von Phytochromen auf frühe Ereignisse in der Photomorphogenese zu überprüfen als auch die Phytochrome C und E mit in die Analyse einzuschließen, wurden die Weißlichtexperimente in Analogie zu den Belichtungsexperimenten der Photorezeptormutanten mit den Phytochromchromophormutanten *hy1* und *hy2* durchgeführt (siehe Pkt. 1 und 3.3). Der Defekt in der Chromophorbiosynthese müßte eine Lichtwahrnehmung durch Phytochrome verhindern. Folglich sollte die Genexpression dieser Mutanten in diesen Experimenten der Genexpression von Phytochrommutanten ähnlich sein.

Nach Hybridisierung auf den Membranen "2B" mit anschließender Normalisierung der Signalintensitäten erfolgte die Einordnung der Weißlichtexperimente von *hy1* und *hy2*, indem für alle den Sicherheitskriterien entsprechende relativierten Signalintensitäten des ausgewählten Gensatzes (68 Gene/84 cDNA-Fragmente) aller Weißlichtexperimente erneut einer Hauptkomponentenanalyse durchgeführt wurde (Abb. 26).

Bei einer dargestellten Varianz der ersten beiden Komponenten von 73 % ergaben sich wiederum die vier Gruppen von Experimenten (vgl. Abb. 15, 16 und 17 mit 26). Eine erste Gruppe beinhaltet die Experimente mit etiolierten Keimlingen (Kreise in Abb. 26) mit Ausnahme von *det1* und eine zweite Gruppe die Experimente mit belichteten Keimlingen der Ökotypen und Photorezeptormutanten (Vierecke und Rhomben in Abb. 26). Zu einer dritten Gruppe zählen die Experimente mit Keimlingen der Mutante *det1* (grüne Symbole in Abb. 26) und zu einer vierten Gruppe die Experimente mit den belichteten Keimlingen der PHYB-überexprimierenden Linie (hellgelbe Symbole in Abb. 26).

Die Experimente mit den Phytochromchromophormutanten *hy1* und *hy2* (rosa bzw. violette Symbole in Abb. 26) sind in der Hauptkomponentenanalyse sowohl für die etiierten als auch für die belichteten Keimlinge in den jeweiligen Gruppen der Ökotypen und Photorezeptormutanten enthalten. D.h. die Genexpression in den Phytochromchromophormutanten ist zur Genexpression in Ökotypen, Phyto- und Cryptochrommutanten bei Bestrahlung mit Weißlicht ähnlich. Folglich bestätigten diese Experimente die vorangegangenen Analysen der Phytochrommutanten bei Bestrahlung mit Weißlicht. Durch den Defekt im Chromophor sollte keines der Phytochrome funktionsfähig sein, entsprechend ist die Aussage, dass keines der Phytochrome die frühe Phase der Photomorphogenese beeinflusst, auf alle Phytochrome einschließlich der nicht durch Mutanten untersuchten Phytochrome C und E zu erweitern. Die Mutante *hy1* wurde in Analogie zu Pkt. 3.1.2 auf ihre Mutation überprüft.

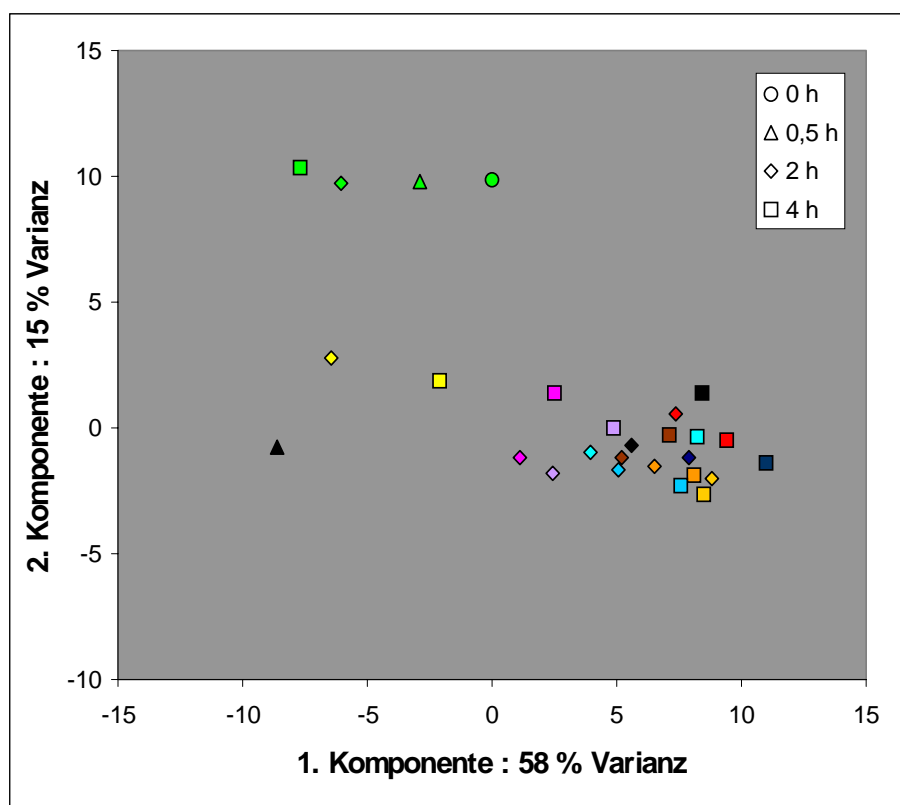


Abb. 26: Hauptkomponentenanalyse des auf 84 cDNA-Fragmente reduzierten Datensatzes. In den Experimenten zur Genexpression wurden Keimlinge der Wildtypen Col-0 (schwarz), Ler-0 (dunkelblau), Ws-2 (= *phyD*, dunkelrot), der Rotlichtrezeptormutanten *phyA* (rot), *phyB* (hy3, dunkelgelb) und *phyAB* (orange), der Phytochromchromophormutanten *hy1* (rosa) und *hy2* (violett), der Blaulichtrezeptormutanten *cry1* (hy4, graublau) und *cry2* (*fha-1*, hellblau), der transgenen *PHYB*-überexprimierenden Linie (35S::*PHYB*, hellgelb) und der Mutante *det1* (grün) eingesetzt und mit Weißlicht für 0 h (etiiert, Kreis), 0,5 h (Dreieck, nur Col-0 und *det1*), 2 h (Rhombus) und 4 h (Quadrat) bestrahlt.

## 6.2. Literaturverzeichnis

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Kerlavage AR, McCombie WR, Venter JC (1991): Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* Vol. 252, 1651-1656.

Ahmad M (1999): Seeing the world in red and blue: insight into plant vision and photoreceptors. *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol. 2, 230-235.

Ahmad M, Cashmore AR (1993): HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, Vol. 366, 162-166.

Ahmad M, Cashmore AR (1996): The pef mutants of *Arabidopsis thaliana* define lesions early in the phytochrome signaling pathway. *Plant J.* Vol. 10, 1103-1110.

Ahmad M, Jarillo JA, Smirnova O, Cashmore AR (1998): The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. *Mol. Cell* Vol. 1, 939-948.

Andel F, Lagarias JC, Mathies RA (1996): Resonance raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct. *Biochemistry* Vol. 35, 15997-16008.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1990): *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 2. Auflage, 1990.

Ang LH, Deng XW (1994): Regulatory hierarchy of photomorphogenic loci: Allele-specific and light-dependent interaction between the hy5 and cop1 loci. *Plant Cell* Vol. 6, 613-628.

Ang LH, Chattopadhyay S, Wei, Oyama T, Okada K, Batschauer A, Deng XW (1998): Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Mol. Cell* Vol. 1, 213-222.

Apel K (1981): The protochlorophyllide homochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.) phytochrome-induced decrease of translatable mRNA coding for the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur. J. Biochem* Vol. 120, 89-93.

von Arnim A, Deng XW (1994): Light inactivation of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* Vol. 79, 1035-1045.

Atchley WR, Fitch WM (1997): A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, 5172-5176.

Aukerman MJ, Hirschfeld M, Wester L, Weaver M, Clack T, Amasino RM, Sharrock RA (1997): A deletion in the PHYD gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far red light sensing. *Plant Cell* Vol. 9, 1317-1326.

Bagnall DJ, King RW, Whitelam GC, Boylan MT, Wagner D, Quail PH (1995): Flowering responses to altered expression phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.. *Plant Physiol.* Vol. 108, 1405-1503.

Ballesteros ML, Bolle C, Lois LM, Moore JM, Vielle-Calzada JP, Grossniklaus U, Chua NH (2001): LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signalling. *Genes Dev.* Vol. 15, 2613-2625.

Barnes SA, Nishizawa NK, Quaggio RB, Whitelam GC, Chua NH (1996a): Far-red light blocks greening of *Arabidopsis* seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. *Plant Cell* Vol. 8, 601-615.

- Barnes SA, Quaggio RB, Whitelam GC, Chua NH (1996b): *fhy1* defines a branch point in phytochrome A signal transduction pathways for gene expression. *Plant J* Vol. 10(6), 1155-1161.
- Batschauer A, Ehrmann B, Schäfer E (1991): Cloning and characterization of a chalcone synthase gene from mustard and its light-dependent expression. *Plant Mol. Biol.* Vol. 16, 175-185.
- Batschauer A, Rocholl M, Kaiser T, Nagatani A, Furuya M, Schäfer E (1996): Blue und UV-A light-regulated chs expression in *Arabidopsis* independent of phytochrome A and phytochrome B. *Plant J.* Vol. 9(1), 63-69.
- Bezhani S, Sherameti I, Pfanschmidt T, Oelmüller R (2001): A Repressor with similarities to prokaryotic and eukaryotic DNA helicases controls the assembly of the CAAT Box binding complex at a photosynthesis gene promoter. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, 23785-23789.
- Bhoo SH, Davis SJ, Walker J, Karniol B, Vierstra RD (2001): Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a bacteriopheophytin chromophore. *Nature* Vol. 414, 776-779.
- Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* Vol. 24(6), 1513-23.
- Bolle C, Koncz C, Chua NH (2000): PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev.* Vol. 14, 1269-1278.
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK (1952): A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 38, 662-666.
- Bortz J (1999): *Statistik für Sozialwissenschaftler*. 5. Aufl., Springer-Verlag, Berlin.
- Botto JF, Sanchez RA, Whitelam GC, Casal JJ (1996): Phytochromes A mediates the promotion of seed germination by very low fluences of light and canopy shade light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* Vol. 110, 439-444.
- Boylan M, Douglas N, Quail PH (1994): Dominant negative suppression of *Arabidopsis* photoresponses by mutant phytochrome A sequences identifies spatially discrete regulatory domains in the photoreceptor. *Plant Cell* Vol. 6, 449-460.
- Briggs WR, Rice HV (1972): Phytochrome: chemical and physical properties and mechanism of action. *Annu. Rev. Plant Physiol.* Vol. 23, 293-334.
- Briggs WR, Huala E (1999): Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Vol. 15, 33-62.
- Bruce WB, Christensen AH, Klein T, Fromm M, Quail PH (1989): Photoregulation of a phytochrome gene promoter from oat transferred into rice by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 86, 9692-9696.
- Butler WL, Norris KH, Siegelman HW, Hendricks SB (1959): Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 45, 1703-1708.
- Buche C, Poppe C, Schäfer E, Kretsch T (2000): *eid1*: A new *Arabidopsis* mutant hypersensitive in phytochrome A-dependent high-irradiance responses. *Plant Cell* Vol. 12, 547-558.
- Casal JJ (1995): Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Planta* Vol. 196, 23-29.
- Casal JJ (1996): Phytochrome A enhances the promotion of hypocotyl growth caused by reductions in levels of phytochrome B in its far-red-light absorbing form in light-grown *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* Vol. 112, 965-973.

- Casal JJ, Boccalandro H (1995): Co-action between phytochrome B and HY4 in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* Vol. 197, 213-218.
- Casal JJ, Mazella MA (1998): Conditional synergism between cryptochrome 1 and phytochrome B is shown by the analysis of phyA, phyB and hy4 simple, double, and triple mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* Vol. 118, 19-25.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D (1999): Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* Vol. 284, 760-765.
- Chamovitz DA, Wei N, Osterlund MT, von Arnim AG, Staub JM, Matsui M, Deng XW (1996): The COP9 complex a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* Vol. 86, 115-121.
- Chattopadhyay S, Ang LH, Puente P, Deng XW, Wei N (1998): *Arabidopsis* bZIP Protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell* Vol. 10, 673-683.
- Cherry JR, Hondred D, Walker JM, Vierstra RD (1992): Phytochrome requires the 6 kDa N-terminal domain for full biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 89, 5039-5043.
- Cherry JR, Hondred D, Walker JM, Keller JM, Hershey HP, Vierstra RD (1993): Carboxyterminal deletion analysis of oat phytochrome A reveals the presence of separate domains required for structure and biological activity. *Plant Cell* Vol. 5, 565-575.
- Choi G, Yi H, Lee J, Kwon YK, Soh MS, Shin B, Luka Z, Hahn TR, Song PS (1999): Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* Vol. 401, 610-613.
- Chory J, Peto C, Feinbaum R, Pratt L, Ausubel F (1989): *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* Vol. 58, 991-999.
- Chory J, Chatterjee M, Cook RK, Elich T, Fankhauser C (1996): From seedling germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93, 12066-12071.
- Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas AA, Liscum E, Briggs WR (1998): *Arabidopsis* NPH1: A flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* Vol. 282, 1698-1701.
- Chromchinski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* Vol. 162, 156-159.
- Chun L, Kawakami A, Christopher DA (2001): Related Articles, Links Free in PMC Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves. *Plant Physiol.* Vol. 125(4):1957-1966.
- Clack T, Mathews S, Sharrock RA (1994): The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant. Mol. Biol.* Vol. 25, 413-427.
- Cline J, Braman JC, Hogrefe HH (1996): PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* Vol. 24 (18), 3546-3551.
- Darwin C (1881): *The power of movement in plants*. Appleton, New York.
- Davis SJ, Vener AV, Vierstra RD (1999): Bacteriophytochromes: Phytochrome-like photoreceptors from non-photosynthetic eubacteria. *Science* Vol. 286, 2517-2520.
- Dehesh K, Franci C, Parks BM, Seeley KA, Short TW (1993): *Arabidopsis* HY8 locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* Vol. 5, 1081-1088.

Deng XW, Caspar T, Quail PH (1991): *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* Vol. 5, 1172-1182.

Deng XW, Matsui M, Wei N, Wagner D, Chu AM (1992): COP1, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G $\beta$  homologous domain. *Cell* Vol. 71, 791-801.

Deng XW, Dubiel W, Wei N, Hofmann K, Mundt K (2000): Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends Genet.* Vol. 16(7), 202-203.

DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997): Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* Vol. 278, 680-686.

Desnos T, Puente P, Whitelam GC, Harberd NP (2001): FHY1: a phytochrome A-specific signal transducer. *Genes Dev.* Vol. 15, 2980-2990.

Devlin PF, Patel SR, Whitelam GC (1998): Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* Vol. 10, 1479-1487.

Devlin PF, Kay SA (2000): Cryptochromes are required for phytochrome signalling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* Vol. 12, 2499-2509.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996): Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93(12), 6025-6030.

Dieterle M, Zhou YC, Schäfer E, Funk M, Kretsch T (2001): EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-specific light signaling. *Genes Dev.* Vol. 15, 939-944.

Dijkwel PP, Huijser C, Weisbeek PJ, Chua NH, Smeekens SCM (1997): Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* Vol. 9, 583-595.

Eker AP, Dekker RH, Berends W (1981): Photoreactivating enzyme from *Streptomyces griseus*-IV. On the nature of the chromophoric cofactor in *Streptomyces griseus* photoreactivating enzyme. *Photochem Photobiol.* Vol. 33(1), 65-72.

Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G (1999): ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* Vol. 8, 978-984.

Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M (1998): Cry, a *Drosophila* Clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* Vol. 95, 669-679.

Engelke, DR, Krikos, A, Bruck, ME, Ginsburg, D (1990): Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* Vol. 191, 396-400.

Edgerton MD, Jones AM (1992): Localization of protein-protein interactions between subunits of phytochrome. *Plant Cell* Vol. 4(2), 161-171.

Edgerton MD, Jones AM (1993): Subunit interactions in the carboxy-terminal domain of phytochrome. *Biochemistry.* Vol. 32, 8239-8245.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998): Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, 14863-14868.

Fairchild CD, Schuhmaker MA, Quail PH (2000): Hfr1 encodes an typical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev.* Vol. 14, 2377-2391.

- Fankhauser C (2001): The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J. Biol. Chem.* Vol. 276(15), 11453-11456.
- Fankhauser C, Chory J (1997): Light control of plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Vol 13, 203-229.
- Fankhauser C, Yeh KC, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD, Chory J (1999): PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* Vol. 284, 1539-1541
- Fankhauser C, Chory J (2000): RSF1, an *Arabidopsis* locus implicated in phytochrome A signaling. *Plant Physiol.* Vol. 124(1), 39-45.
- Ferl R, Paul AL (2000): Genome organization and expression. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* ed. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, Courier Companies.
- Folta KM, Spalding EP (2001): Opposing roles of phytochrome A and phytochrome B in early cryptochrome-mediated growth inhibition. *Plant J.* Vol. 28(3), 333-340.
- Frohnmeier H, Ehmann B, Kretsch T, Rocholl M, Harter K (1992): Differential usage of photoreceptors for chalcone synthase gene expression during plant development. *Plant J.* Vol. 2, 899-906.
- Fuglevand G, Jackson JA, Jenkins GI (1996): UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* Vol. 8, 2347-2357.
- Furuya M, Song PS (1994): Assembly and properties of holophytochrome. In Kendrick und Kronenberg (1994), 105-140.
- Galland P, Senger H (1991): Flavins as possible blue-light photoreceptors. In Holmes MG (ed) *Photoreceptor evolution and function*. Academic Press, London, 65-124.
- Genoud T, Millar AJ, Nishizawa N, Kay SA, Schäfer E, Nagatani A, Chua NH (1998): An *Arabidopsis* mutant hypersensitive to red and far-red light signals. *Plant Cell* Vol. 10, 889-904.
- Giraud E, Fardoux J, Fourrier N, Hannibal L, Genty B, Bouyer P, Dreyfus B, Vermeglio A (2002): Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature* Vol. 417, 202-205.
- Girke T, Todd J, Ruuska S, White J, Benning C, Ohlrogge J (2000): Microarray analysis of developing *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.* Vol. 124, 1570-1581.
- Goosey L, Palecanda L, Sharrock RA (1997): Differential patterns of expression of the *Arabidopsis* PHYB, PHYD, and PHYE phytochrome genes. *Plant Physiol.* Vol. 115, 959-969.
- Goto N, Yamamoto KT, Watanabe M (1993): Action spectra for inhibition of hypocotyl growth of wild-type plants and of the hy2 long-hypocotyl mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Photochem. Photobiol.* Vol. 57, 867-871.
- Gress TM, Hoheisel JD, Lennon GG, Zehetner G, Lehrach H (1992): Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome* Vol. 3, 609-619.
- Grimm R, Rüdiger W (1986): A simple and rapid method for isolation of 124kDa oat phytochrome. *Z. Naturforsch.* 41c: 988-992.
- Guo H, Yang H, Mockler TC, Lin C (1998): Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* Vol. 279, 1360-1363.
- Guo H, Duong H, Ma N, Lin C (1999): The *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post transcriptional mechanism. *Plant J.* Vol. 19, 279-287.



- Guo H, Mockler T, Duong H, Lin C (2001): SUB1, an Arabidopsis  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science* Vol. 291, 487-489.
- Halliday KJ, Hudson M, Ni M, Qin M, Quail PH (1999): poc1: An Arabidopsis mutant perturbed in phytochrome signaling because of a tDNA insertion in the promoter of PIF3, a gene encoding a phytochrome-interacting bHLH protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, 5832-5837.
- Hanks SK, Hunter T. (1995): Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* Vol. 9(8), 576-96.
- Hardtke CS, Deng XW (2000): The cell biology of the COP/DET/FUS proteins. Regulating Proteolysis in Photomorphogenesis and beyond? *Plant Physiol.* Vol. 124, 1548-1557.
- Hartmann KM (1966): A general hypothesis to interpret "high energy phenomena" of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochem. Photobiol.* Vol. 5, 349-366.
- Heim B, Schäfer E (1984): The effect of red and far-red light in the high irradiance reaction of phytochrome (hypocotyl growth in dark-grown *Sinapis alba* L.). *Plant Cell Environ.* Vol. 7, 39-44.
- Heim MA, Jacoby M, Werber M, Martin C, Weishaar, Bailey PC (2003): The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* Vol. 20(5), 735-747.
- Hennig L, Stoddart WM, Dieterle M, Whitelam GC, Schäfer E (2002): Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis. *Plant Physiol.* Vol. 128, 194-200.
- Hicks K, Millar A, Carr I, Somers D, Straume M, Meeks-Wagner DR, Kay SA (1996): Conditional circadian dysfunction of the Arabidopsis early flowering 3 mutant. *Science* Vol. 274, 790-792.
- Hoecker U, Xu Y, Quail PH (1998): SPA1: a new genetic locus involved in phytochrome A specific signal transduction. *Plant Cell* Vol. 10, 19-33.
- Hoecker U, Tepperman JM, Quail PH (1999): SPA1, a WD-repeat protein specific to phytochrome A signal transduction. *Science* Vol. 284, 496-499.
- Hoecker U, Quail PH (2001): The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in Arabidopsis. *J Biol Chem.* Vol. 276 (41), 38173-38178.
- van der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno SI, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker APM, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JHJ, Yasui A (1999): Mammalian CRY1 and CRY2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* Vol. 398, 627-630.
- Hsieh HL, Okamoto H, Wang M, Ang LH, Matsui M, Goodman H, Deng XW (2000): FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. *Genes Dev.* Vol. 14, 1958-1970.
- Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han IS, Larsen E, Briggs WR (1997): Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* Vol. 278, 2120-2123.
- Hubank M, Schatz DG (1994): Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acid Res.* Vol. 22(25), 5640-5648.
- Hudson M, Ringli C, Boylan MT, Quail PH (1999): The far1 locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling. *Genes Dev.* Vol. 13, 2017-2027.

- Hudson ME (2000): The genetics of phytochrome signalling in Arabidopsis. *Semin Cell Dev Biol* Vol. 11, 475-483.
- Hughes J, Mittmann F, Wilde A, Gärtner W, Börner T, Hartmann E, Lamparter T (1997): A prokaryotic phytochrome. *Nature* Vol. 386, 663.
- Hunt RE, Pratt LH (1981) Phycochemical differences between the red- and the far-red-absorbing forms of phytochrome. *Biochemistry* Vol. 20, 941-5
- Huq E, Quail PH (2002): PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signalling in Arabidopsis. *EMBO J.* Vol. 21, 2441-2450.
- Ito T, Kito K, Adati N, Mitsui Y, Hagiwara H, Sakaki Y (1994): Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS* Vol. 351, 231-236.
- Jackson JA, Jenkins GI (1995): Extension-growth responses and expression of flavonoid biosynthesis genes in the Arabidopsis hy4 mutant. *Planta* Vol. 197, 233-239.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Lasar W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002): bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* Vol. 7 (3), 106-111.
- Jang JC, Leon P, Zhou L, Sheen J (1997): Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* Vol. 9, 5-19.
- Jansson S (1999): A guide to the Lhc genes and their relatives. *Trends Plant Sci.* Vol. 4, 236-240.
- Jarillo JA, Ahmad M, Cashmore AR (1998): NPL1 (accession No. AF053941): A second member of the NPH serine/threonine kinase family of Arabidopsis (PGR98-100). *Plant Physiol.* Vol. 117, 719
- Jiang ZY, Swem LR, Rushing BG, Devanathan S, Tollin G, Bauer CE (1999): Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science* Vol. 285, 406-409.
- Jordan BR (1996): The effects of UV-B radiation on plants: a molecular perspective. *Advan. Bot. Res.* Vol. 22, 97-162.
- Jordan ET, Marita JM, Clough RC, Vierstra RD (1997): Characterization of regions within the N-terminal 6-kDa Domain of phytochrome A that modulate its biological activity. *Plant Physiol.* Vol. 115, 693-704.
- Jorns MS, Sancar GB, Sancar A (1984): Identification of a neutral flavin radical and characterization of a second chromophore in Escherichia coli DNA photolyase. *Biochemistry* Vol. 23(12), 2673-2679.
- Johnson JL, Hamm-Alvarez S, Payne G, Sancar GB, Rajagopalan KV, Sancar A (1988): Identification of the second chromophore of Escherichia coli and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 85, 2046-2050.
- Jürgens G, Mayer U, Torres Ruiz RA, Berleth T, Misera S (1991): Genetic analysis of pattern formation in the Arabidopsis embryo. *Dev. Suppl.* Vol. 1, 27-38.
- Kaiser T, Emmler K, Kretsch T, Weisshaar B, Schäfer E, Batschauer A (1995): Promotor elements of the mustard CHS1 gene are sufficient for light regulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* Vol. 28, 219-229.
- Kanegae T, Wada M (1998): Isolation and characterization of homologues of plant blue light photoreceptor (cryptochrome) genes from the fern Adiantum capillus-veneris. *Mol. Gen Genet.* Vol. 259, 345-353.
- Karniol B, Malec P, Chamovitz DA (1999): Arabidopsis FUSCA5 encodes a novel phosphoprotein that is a component of the COP9 complex. *Plant Cell* Vol. 11(5), 839-848.

Kehoe DM, Grossman AR (1996): Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* Vol. 273, 1409-1412.

Kendrick RE, Kronenberg GHM eds. (1994). *Photomorphogenesis in plants*. Kluwer Dordrecht.

Kidd DG, Lagarias JC (1990): Phytochrome from the green alga *Mesotaenium caldariorum*. Purification and preliminary characterization. *J Biol Chem* Vol. 265(12), 7029-7035.

Kim BC, Tennessen DJ, Last RL (1998): UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* Vol. 15(5), 667-674.

Kircher S, Kozma-Bognar L, Kim L, Adam E, Harter K, Schäfer E, Nagy F (1999): Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* Vol. 11, 1445-1456

Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N, Masuda M, Yokota A, Lagarias JC (2001): The *Arabidopsis* HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell* Vol. 13, 425-436.

Koornneef M, Rolff E, Spruit CJP (1980): Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 100, 147-160.

Kuno N, Muramatsu T, Hamazato F, Furuya M (2000): Identification by large-scale screening of phytochrome-regulated genes in etiolated seedlings of *Arabidopsis* using a fluorescent differential display technique. *Plant Physiol.* Vol. 122, 15-24.

Kusnetsov V, Landsberger M, Meurer J, Oelmüller R (1999): The assembly of the CAAT-box binding complex at a photosynthesis gene promoter is regulated by light, cytokinin and the stage of the plastids. *J. Biol. Chem.* Vol. 274, 36009-36014.

Kwok SF, Piekos B, Misera M, Deng XW (1996): A complement of ten essential and pleiotropic *Arabidopsis* COP/DET/FUS genes are necessary for repression of photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol.* Vol. 110(3), 731-742.

Lagarias JC, Rapaport H (1980): Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the P<sub>R</sub> form of the phytochrome chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 102, 4821-4828.

Lagarias DM, Wu SH, Lagarias JC (1995): Atypical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Mol. Biol.* Vol. 29, 1127-1142.

Lennon GG, Lehrach H. (1991): Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends Genet.* Vol. 7(10), 314-317.

Leutwiler LS, Meyerowitz EM, Tobin EM (1986): Structure and expression of three light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein genes in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* Vol 14 (10), 4051-4064.

Liang P, Pardee AB (1992): Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* Vol. 257, 967-971.

Lin C, Robertson DE, Ahmad M, Raibekas AA, Schuman Jorns M, Dutton PL, Cashmore AR (1995): Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1. *Science* Vol. 269, 968-970.

Lin C, Yang H, Guo H, Mockler T, Chen J, Cashmore AR (1998): Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95(5), 2686-2690.

Liscum E, Hangarter RP (1993): Genetic evidence that the red-absorbing form of phytochrome B modulates gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* Vol. 103, 15-19.

- Liscum E, Briggs WR (1995): Mutations in the Nph1 locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* Vol. 7, 473-485.
- Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M (1993): Cloning the differences between two complex genomes. *Science* Vol. 259, 946-951.
- Littlewood, Evan (1998): Basic helix-loop-helix transcription factors. Oxford University Press, New York.
- Liu XL, Covington MF, Fankhauser C, Chory J, Wagner DR (2001): Elf3 encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an Arabidopsis phyB signal transduction pathway. *Plant Cell* Vol. 13, 1293-1304.
- Lueking A, Horn M, Eickhoff H, Büsow K, Lehrach H, Walter G (1999): Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Anal. Biochem.* Vol. 270, 103-111.
- Ma L, Li J, Qu L, Hager J, Chen Z, Zhao H, Deng XW (2001): Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* Vol. 13, 2589-2607.
- Ma L, Zhao H, Deng XW (2003): Analysis of the multifunctional effects of the COP/DET/FUS loci on genome expression profiles reveals their overlapping yet not identical roles in regulating Arabidopsis seedling development. *Development* Vol. 130, 969-981.
- Malhotra K, Kim ST, Batschauer A, Dawut L, Sancar A (1995): Putative Blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry* Vol. 34, 6892-6899.
- Malkin R, Niyogi K (2000): Photosynthesis. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* ed. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, Courier Companies.
- Mancinelli (1994): The physiology of phytochrome action. In Kendrick und Kronenberg (1994), 211-270.
- Mandoli DF, Briggs WR (1981): Phytochrome control of two low-irradiance response in etiolated oat seedlings. *Plant Physiol.* Vol. 67, 733-739.
- Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hansmann S, Hasegawa M, Kowallik KV (1998): Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* Vol. 393, 162-165.
- Martinez-Garcia JF, Huq E, Quail PH (2000): Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* Vol. 288, 859-863.
- Mathews S, Sharrock RA (1997): Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ.* Vol. 20, 666-671.
- Mathews CK, van Holde KE (ed, 1990): *Biochemistry*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. Redwood City.
- Matsui M, Stoop CD, von Arnim AG, Wei N, Deng XW (1995): Arabidopsis COP1 protein specifically interacts in vitro with a cytoskeleton-associated protein CIP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 92, 4239-4243.
- Mazella MA, Alconoda Magliano TM, Casal JJ (1997): Dual effect of phytochrome A on hypocotyl growth under continuous red light. *Plant Cell Environ.* Vol. 20, 261-267.
- McCormac AC, Whitlam GC, Boylan MT, Quail PH, Smith H (1992): Contrasting responses of etiolated and light adapted seedlings to red:far-red ratio: a comparison of wild-type, mutant, and transgenic plants has revealed differential functions of members of the phytochrome family. *J. Plant Physiol.* Vol. 140, 707-714.

- Misera S, Müller AJ, Weiland-Heidecker U, Jürgens G (1994): The FUSCA genes of Arabidopsis: negative regulators of light responses. *Mol. Gen Genet.* Vol. 244, 242-252.
- Mockler TC, Guo H, Yang H, Duong H, Lin C (1999): Antagonistic actions of Arabidopsis cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* Vol. 126, 2073-2082.
- Mohr H (1972): Lectures on photomorphogenesis, Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag
- Mohr H (1994): Coaction between pigment systems. In Kendrick und Kronenberg (1994), 353-373.
- Möller SG, Kunkel T, Chua NH (2001): A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling. *Genes Dev.* Vol. 15, 90-103
- Müller AJ, Heidecker U (1968): Lebensfähige und letale fusca Mutanten bei *Arabidopsis thaliana*. *Arabid. Inf. Serv.* Vol. 5, 54-55.
- Muramoto T, Kohchi T, Yokota A, Hwang I, Goodman HM (1999): The Arabidopsis Photomorphogenic mutant *hy1* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid Heme Oxygenase. *Plant Cell* Vol. 11, 335-347.
- Murashige T, Skoog F (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* Vol. 15, 473-497
- Nagatani A, Reed JW, Chory J (1993): Isolation and initial characterization of Arabidopsis mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiol.* Vol. 102, 269-277.
- Nagy F, Schäfer E (2000): Nuclear and cytosolic events of light induced, phytochrome-regulated signaling in higher plants. *EMBO J.* Vol. 19, 157-163.
- Nagy F, Schäfer E (2002): Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* Vol. 53, 329-55.
- Neff MM, van Volkenburgh E (1994): Light stimulated cotyledon expansion in Arabidopsis seedlings: the role of phytochrome B. *Plant Physiol.* Vol. 104, 1027-1032
- Neff MM, Chory J (1998): Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B and cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant Physiol.* Vol. 118, 27-36.
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH (1998): PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* Vol. 95, 657-667.
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH (1999): Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner *pif3* is reversibly induced by light. *Nature* Vol. 400, 781-783.
- Orozco BM, Ogren WL (1993): Localization of light-inducible and tissue-specific regions of the spinach ribulose biphosphat carboxylase/oxygenase (rubisco) activase promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* Vol. 23, 1129-1138.
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW (2000): Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* Vol. 405, 462-466.
- Oyama, T, Shimura Y, Okada K (1997): The Arabidopsis *hy5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.* Vol. 11, 2983-2995.

- Qin M, Kuhn R, Moran S, Quail PH (1997): Overexpressed phytochrome C has a similar photosensory specificity to phytochrome B but a distinctive capacity to enhance primary leaf expansion. *Plant J.* Vol. 12(5), 1163-1172.
- Parker MW, Hendrick SB, Borthwick HA, Went FW (1949): Spectral sensitivities for leaf and stem growth of etiolated pea seedlings and their similarity to action spectra for photoperiodism. *Am J Bot.* Vol. 36, 194-204.
- Parks BM, Quail PH (1991): Phytochrome-deficient *hy1* and *hy2* long hypocotyl mutants of *Arabidopsis* are defective in phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell* Vol. 3, 1177-1186.
- Pepper AE, Delaney T, Washburn T, Poole D, Chory J (1994): *Det1*, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in *Arabidopsis*, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell* Vol. 78, 109-116.
- Pepper AE, Chory J (1997): Extragenic suppressors of the *Arabidopsis det1* mutant identify elements of the flowering-time and light-response regulatory pathways. *Genetics* Vol. 145: 1125-1137.
- Potokina E, Sreenivasulu N, Altschmied L, Michalek W, Graner A (2002): Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L). *Funct. Integr. Genomics* 2: 28-39.
- Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J (1993): Mutations in the gene for the red/far red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* Vol. 5, 147- 157.
- Reed JW, Nagatani A, Elich TD, Fagan M, Chory J (1994): Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* Vol. 104, 1139-1149.
- Ruan Y, Gilmore J, Conner T (1998): Towards *Arabidopsis* genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *Plant J.* Vol. 15(6), 821-833.
- Saghai-Maroo MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984): Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Vol. 81, 8014-8018.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular Cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sancar A (1994): Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* Vol. 33, 2-9.
- Schäfer E, Lassig TU, Schopfer P (1982): Phytochrome-controlled extension growth of *Avena sativa* L. seedlings. II. Fluence rate response relationships and action spectra of mesocotyl and coleoptile responses. *Planta* Vol. 154, 231-240.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* Vol. 270, 467-470.
- Schena M (1996): Genome analysis with gene expression microarrays. *BioEssays* Vol. 18(5), 427-431.
- Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW (1998): Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.* Vol. 16, 301-306
- Schneider-Poetsch HA (1992): Signal transduction by phytochrome: phytochromes have a module related to the transmitter modules of bacterial sensor proteins. *Photochem. Photobiol.* Vol. 56, 839-846.
- Schröder DF, Gahrtz M, Maxwell BB, Cook RK, Kan JM, Alonso JM, Ecker JR, Chory J (2002): De-etiolated1 (DET1) and damaged DNA binding protein 1 (DDB1) interact to regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Curr. Biol.* Vol. 12, 1462-1472.

- Serino G, Tsuge T, Kwok SF, Matsui M, Deng XW (1999): *Arabidopsis cop8* and *fus4* mutations define the same gene that encodes subunit 4 of the COP9 signalosome. *Plant Cell* Vol. 11, 1967-1980.
- Sharrock RA, Quail PH (1989): Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* Vol. 3, 1745-1757
- Shinomura T, Nagatani A, Chory J, Furuya M (1994): The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A. *Plant Physiol.* Vol. 104, 363-371.
- Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M (1996): Action spectra for phyA- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93, 8129-8133.
- Shinomura T, Uchida K, Furuya M (2000): Elementary process of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* Vol. 122, 147-156.
- Short TW, Briggs WR (1994): The transduction of blue light signals in higher plants. *annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 45, 143-171.
- Siberil Y, Doireau P, Gantet P (2001): Plant bZIP G-Box binding factors. Modular structure and activation mechanism. *Eur. J. Biochem.* Vol. 268, 5655-5666.
- Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA (1995): An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acid Res.* Vol. 23(6), 1087-1088.
- Small GD, Min B, Lefebvre PA (1995): Characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* gene encoding a protein of the DNA photolyase/blue light photoreceptor family. *Plant Mol. Biol.* Vol. 28, 443-454.
- Smith H (1975): *Phytochrome and photomorphogenesis*. London. McGraw-Hill
- Soh MS, Hong SH, Hanzawa H, Furuya M, Nam HG (1998): Genetic identification of FIN2, a far red light-specific signaling component of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* Vol. 16(4), 411-419.
- Soh MS, Kim YM, Han SJ, Song PS (2000): REP1, a basic helix-loop-helix protein, is required for a branch pathway of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* Vol. 12, 2061-2073.
- Song PS (1999): Inter-domain signal transmission within the phytochromes. *J. Biochem. Mol. Biol.* 32: 215-225.
- Spiegelman JJ, Mindrinos MN, Fankhauser C, Richards D, Lutes J, Chory J, Oefner PJ (2000): Cloning of the *Arabidopsis* RSF1 gene by using a mapping strategy based on high-density arrays and denaturing high-performance liquid chromatography. *Plant Cell* Vol. 12, 2485-2498.
- Sreenivasulu N, Altschmied L, Panitz R, Hähnel U, Michalek W, Weschke W, Wobus U (2002): Identification of genes specifically expressed in maternal and filial tissues of barley caryopses: a cDNA array analysis. *Mol. Genet. Genomics* 266: 758-767.
- Stockhaus J, Nagatani A, Halfter U, Kay S, Furuya M, Chua NH (1992): Serine to alanine substitutions at the amino-terminal region of phytochrome A result in an increase in biological activity. *Genes Dev.* Vol. 6, 2364-2372.
- Stoebe B, Martin W, Kowallik KV (1998): Distribution and nomenclature of protein-coding genes in 12 sequenced chloroplast genomes. *Plant Mol. Biol. Reporter* Vol. 16, 243-255.
- Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J (2003): Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* Vol. 421, 79-83.

Suzuki G, Yanagawa Y, Kwok SF, Matsui M, Deng XW (2002): Arabidopsis COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 und COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes Dev.* Vol. 16, 554-559.

Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Bäurle I, Kudla J, Nagy F, Schäfer E, Harter K (2001): Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* Vol. 294, 1108-11

Taylor BL, Zhulin IB (1999): PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* Vol. 63(2), 479-506.

Tepperman JM, Zhu T, Chang HS, Wang X, Quail PH (2001): Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 98, 9437-9442.

Terry MJ (1997): Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant Cell Environ.* Vol. 20, 740-745.

“The Arabidopsis Genome Initiative” (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* Vol. 408, 796-815.

Thümmler F, Beetz A, Rüdiger W (1990): Detection and partial sequence of a phytochrome gene in the moss *Ceratodon purpureus* using polymerase chain reaction. *FEBS* Vol. 275, 125-129.

Tobin EM, Silverthorne J (1985): Light regulation of gene expression in higher plants. *Ann. Re. Plant Physiol.* Vol. 36, 569-593.

Toth R, Kevei E, Hall A, Millar AJ, Nagy F, Kozma-Bognar L (2001): Circadian Clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* Vol. 127, 1607-1616.

Torii KU, Stoop-Myer CD, Okamoto H, Coleman JE, Matsui M, Deng XW (1999): The RING finger motif of photomorphogenic repressor COP1 specifically interacts with the RING-H2 motif of a novel Arabidopsis protein. *J Biol Chem.* Vol. 274(39), 27674-27681.

Tovar K, Hillen W (1991): Large-scale preparation of DNA fragments for physical studies of protein binding. *Methods Enzymol.* Vol. 208, 54-63.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995): Serial analysis of gene expression. *Science* Vol. 270, 484-486.

Vierstra RD, Quail PH (1983). Purification and initial characterization of 124 kDa phytochrome from *Avena*. *Biochemistry* Vol. 22, 2498-2505.

Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, Kieber JJ (1998): Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of Arabidopsis confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, 4766-4771.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* Vol. 23(21), 4407-4414.

Wade HK, Bibikova TN, Valentine WJ, Jenkins GI (2001): Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in Arabidopsis leaf tissue. *Plant J.* Vol. 25(6), 675-685.

Wagner D, Tepperman JM, Quail PH (1991): Overexpression of phytochrome B induces a short hypocotyl phenotype in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell* Vol. 3, 1275-1288.

Wagner D, Hoecker U, Quail PH (1997): RED1 is necessary for phytochrome B-mediated red light-specific signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* Vol. 9, 731-743.



- Wang H, Ma LG, Li JM, Zhao HY, Deng XW (2001): Direct interaction of Arabidopsis Cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* Vol. 294, 154-158.
- Weller JL, Beauchamp N, Huub L, Kerckhoffs J, Platten JD, Reid JB (2001): Interaction of phytochrome A and B in the control of de-etiolation and flowering in pea. *Plant J.* Vol. 26(3), 283-294.
- White TJ, Arnheim N, Ehrlich HA (1989): The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* Vol. 5, 185-189.
- Whitelam GC, Johnson E, Peng J, Carol P, Anderson ML, Cowl JS, Harberd NP (1993): Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wildtype phenotype in white light. *Plant Cell* Vol. 5, 757-768.
- Whitelam GC, Devlin PF (1997): Roles of different phytochromes in Arabidopsis photomorphogenesis. *Plant Cell Environ.* Vol. 20, 752-758.
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW(1989): Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* Vol. 17(9), 3469-3478.
- Wu SH, Lagarias JC (2000): Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry* Vol. 39(44), 13487-13495.
- Yamamoto YY, Matsui M, Ang LH, Deng XW (1998): Role of a COP1 interactive protein in mediating light-regulated gene expression in arabidopsis. *Plant Cell.* Vol. 10(7),1083-1094.
- Yamamoto YY, Deng XW, Matsui M (2001): CIP4, a new cop1 target, is a nucleus-localized positive regulator of Arabidopsis photomorphogenesis. *Plant Cell* Vol. 13, 399-411.
- Yamaguchi R, Nakamura M, Mochizuki N, Kay SA, Nagatani A (1999): Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleolus in transgenic Arabidopsis. *J Cell Biol.* Vol. 3, 437-445.
- Yang HQ, Wu YJ, Tang RH, Liu D, Liu Y, Cashmore AR (2000): The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* Vol. 103, 815-827.
- Yanovsky MJ, Casal JJ, Luppi JP (1997): The VLF loci, polymorphic between ecotypes Landsberg erecta and Columbia, dissect two branches of phytochrome A signal transduction that correspond to very-low-fluence and high irradiance responses. *Plant J.* Vol. 12(3), 659-667.
- Yeh KC, Wu SH, Murphy JT, Lagarias JC (1997): A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* Vol. 277, 1505-1508.
- Yeh KC, Lagarias JC (1998): Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, 13976-13981.
- Zagotta MT, Hicks KA, Jacobs CI, Youzng JC, Hangarter RP, Meeks-Wagner DR (1996): The Arabidopsis ELF3 gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *Plant J.* Vol. 10(4), 691-702.
- Zeidler M, Bolle C, Chua NH (2001): The phytochrome A specific signaling component PAT3 is a positive regulator of arabidopsis photomorphogenesis. *Plant Cell Physiol.* Vol. 42(11), 1193-1200.
- Zhu Y, Tepperman JM, Fairchild CD, Quail PH (2000): Phytochrome B binds with greater affinity than phytochrome A to the basic-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 97, 13419-13424.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. Lothar Altschmied für die interessante Themenstellung und sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken. Viele anregende Diskussionen und die gewährte Unterstützung trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Ulrich Wobus, Direktor des Instituts für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (IPK), für die materielle Förderung des Projektes sowie der Möglichkeit an diesem Institut zu arbeiten.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des IPK, insbesondere bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Expressionskartierung für die sehr freundliche Arbeitsatmosphäre und die geleistete Arbeit bedanken. Frau Dietlinde Fiedler half mir bei der gewissenhaften Durchführung von cDNA-Array-Experimenten und der Bereitschaft, anfallende Aufgaben schnell und unkompliziert zu erledigen. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Brigitte Fasshauer und Frau Sandra Drießlein, die mir zunehmend Kultivierung und Erhaltung der Pflanzen abnahmen. Ebenso danken möchte ich Frau Brigitte Schmidt, Frau Corinna Moritz und Frau Anita Czech.

Frau Heike Ernst und Frau Birgit Schäfer danke ich für die fotografischen Arbeiten. Frau Susanne König, Frau Bettina Brückner und Frau Angela Stegmann unterstützten mich durch zahlreiche DNA-Sequenzierungen.

Herrn Prof. Dr. Ralf Oelmüller und Herrn Dr. Klaus Appenroth, Universität Jena Institut für Pflanzenphysiologie, danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der spezifischen Rot- und Blaulichtexperimente als auch für die geleistete Hilfestellung und interessanten Diskussionsbeiträge.

Bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Hell und Frau Dr. Ricarda Jost bedanke ich mich für die Bereitstellung von cDNA-Fragmenten, ebenso bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Grimm und Herrn Dr. Helmut Bäumlein. Frau Dr. Winfriede Weschke und Herrn Dr. Helmut Bäumlein möchte ich für zahlreiche praktische Hinweise und Diskussionen danken. Herrn Dr. Klaus-Peter Pleisner verdanke ich die Vereinfachung einiger aufwendiger Computerarbeit durch Nutzung der von ihm geschriebenen "PERL"-Scripte.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie für Unterstützung und Ermöglichung dieser Arbeit danken. Mein Dank gilt auch allen hier nicht namentlich erwähnten für Rücksicht, Anteilnahme und tatkräftige Hilfe bei der Erstellung der Arbeit.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Gatersleben, Januar 2004

## Lebenslauf

Name: Urs Hähnel  
Geburtsdatum: 17. Januar 1968  
Geburtsort: Berlin  
Familienstand: ledig

1974 - 1984 Besuch der Allgemeinbildenden Polytechnischen Oberschule in Berlin mit Abschluss der 10.Klasse

1984 - 1987 Berufsschule, Ausbildung zum Maschinenbauer mit Abitur im VEB Getränkekombinat Berlin sowie im VEB Werkzeugmaschinenkombinat „7. Oktober“ Berlin

1987 -1990 Wehrdienst

1990 - 1993 Studium der Fachrichtung Biotechnologie an der Technischen Hochschule  
1993 - 1995 Köthen und an der Universität „Otto-von-Guericke“ Magdeburg

Okt. 1994-Sept. 1995 Diplomarbeit in der Serum-Werk Bernburg AG  
Thema: „Die Wirkprinzipien des Pyolysin-Kulturfiltrates und die Charakterisierung ihrer stofflichen Basis“

Jan. 1996- Aug. 1997 Botanisches Institut der LMU München

Sept. 1997- Anfertigung der Dissertation am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben unter Betreuung von Dr. L. Altschmied

Titel der Doktorarbeit: „Analyse zur Genexpression während der frühen Photomorphogenese von *Arabidopsis thaliana* mittels cDNA-Array-Technik“

**Analyse zur  
Genexpression während der frühen Photomorphogenese  
von *Arabidopsis thaliana*  
mittels cDNA-Array-Technik**

**Thesen zur Dissertation**

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Fachbereich Biologie

von Urs Hähnel  
aus Berlin

Gatersleben 2004

1. Sonnenlicht dient photoautotrophen Lebewesen als universelle Energiequelle. Sie vermögen die Energie des Sonnenlichts in chemische gebundene Energie durch die Photosynthese umzuwandeln. Entsprechend versuchen Pflanzen möglichst optimale Entwicklungsbedingungen zu erlangen, indem sie Licht in Dauer, Intensität, Richtung und Wellenlängen wahrnehmen. Als verantwortlich für die Lichtwahrnehmung konnten sogenannte Photorezeptoren, Phyto- und Cryptochrome, identifiziert werden. Die Signalweitergabe bzw. -verarbeitung zur Steuerung der durch Licht regulierten morphogenetischen Veränderungen ist nicht geklärt, da bisherige Untersuchungen zur Genexpression nur an einigen wenigen ausgewählten, lichtabhängig regulierten Genen erfolgten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist das Expressionsverhalten von etiolierten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen während der frühen Phase der Photomorphogenese in einem komplexen Experimentalsystem untersucht worden.

2. Für die Experimente sind Keimlinge der Wildtypen Col-0, Ler-0 und Ws-2 (*phyD*), der Phytochrommutanten *phyA*, *phyB* und *phyAB*, der Phytochromchromophormutanten *hyl1* und *hyl2*, der Cryptochrommutanten *cry1* und *cry2*, der transgenen *PHYB* überexprimierenden Linie und der Mutante *det1* ausgewählt worden.

3. Grundlage für die komplexe Analyse der Genexpression war die parallele Erfassung vieler Expressionsprofile. Für die Experimente wurden cDNA-Arrays, d.h. drei Membransätze mit unterschiedlicher Anzahl von cDNA-Fragmenten hergestellt..

4. Die Auswahl der cDNA-Klone erfolgte nach der möglichen lichtabhängigen Regulation der Gene. Aufgrund der lichtabhängigen Umwandlung von Etioplasten zu Chloroplasten waren insbesondere kernkodierte Gene von Proteinen des Photosyntheseapparates und anderer plastidenlokalisierter Proteine von Interesse.

5. Die Etablierung der cDNA-Array-Methode beinhaltete die Bestimmung biologischer und technischer Charakteristika. Als kritische Parameter wurden die Kreuzhybridisierung von Mitgliedern einer Genfamilie, das Verhältnis von Hybridisierungssignal und Hintergrundwert, das Verhältnis der Doppelspots als interne Hybridisierungskontrolle, die Detektionsgenauigkeit von Hybridisierungssignalen, der Überstrahlungseffekt benachbarter Hybridisierungs-

---

signale und die Reproduzierbarkeit der Experimente analysiert.

6. Die Möglichkeit der Kreuzhybridisierung von Genen mit ähnlicher Sequenz in cDNA-Array-Experimenten wurde anhand nahe verwandter Mitglieder der *LHC*-Genfamilie untersucht. Die Analyse zeigt, dass eine Kreuzhybridisierungsreaktion ab 75 % Sequenzidentität möglich und ab 85 % Sequenzidentität wahrscheinlich ist. Aus den Daten für Kreuzhybridisierungsereignisse ist keine eindeutige Korrelation zwischen Sequenzidentität und Ausmaß der Kreuzhybridisierung abzuleiten.

7. Zur Unterscheidung der Signalwerte von Hintergrundwerten wurde eine Reihe von analogen Experimenten mit etiolierten Keimlingen des Wildtyps Ler-0 analysiert. 96 % der Signalwerte liegen über dem zugehörigen individuellen Hintergrundwert. Weil Signalwerte durchschnittlich 16- bis 32fach höher als ihre zugehörigen individuellen Hintergrundwerte sind, wurde für die Unterscheidung von Signalwerten gegenüber Hintergrundwerten in der Analyse von cDNA-Array-Experimenten ein Sicherheitsfaktor von 10 als Kriterium eingesetzt, das in einem der betrachteten Experimente erfüllt sein mußte (1. Sicherheitskriterium).

8. Von jedem cDNA-Fragment wurden zwei Spots auf die Membran aufgetragen, um eine Kontrolle für Membranherstellung und Hybridisierung zu erhalten. Insbesondere Hybridisierungsartefakte sind durch diese interne Kontrolle auszuschließen. Für 92 % der zusammengehörigen Spots in der Reihe von analogen Experimenten ist das Verhältnis der gemessenen Signalintensitäten kleiner 1,5 und mußte in der Analyse der cDNA-Array-Experimente erfüllt sein (2. Sicherheitskriterium).

9. In der Wiederholung sind die cDNA-Array-Experimente reproduzierbar. Lediglich 7 % der Signalwerte weichen gegenüber dem Mittelwert der Signalwerte in den analogen Experimenten über einen Faktor von 2,24 ab, folglich gelten alle Signalwerte mit einem Faktor 5 zwischen den Experimenten als differentiell exprimiert (differentielles Kriterium).

10. Für die Untersuchung der Genexpression während der frühen Photomorphogenese sind in Anlehnung an ihre natürlichen Lichtbedingungen 5 Tage alte etiolierte Keimlinge der ausgewählten Wildtypen und Mutanten mit Weißlicht bestrahlt worden. Nach erfolgten

cDNA-Array-Experimenten und Normalisierung der Signalwerte ist unter Anwendung der Sicherheitskriterien und des differenziellen Kriteriums der Datensatz auf 71 Gene (88 cDNA-Fragmente) reduziert worden. Die wesentlichen Informationen der Weißlichtexperimente sind mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse zu bestimmen und bleiben bei der Reduktion erhalten.

11. Im wesentlichen unterliegt die Genexpression in den ersten zwei Stunden nach Beginn der Belichtung einer Veränderung.

12. Phytochrom- und Cryptochrommutanten sowie Phytochromchromophormutanten weisen unter den angewendeten Lichtbedingungen im Vergleich zu den Wildtypen eine ähnliche Genexpression auf. Folglich wären Phyto- und Cryptochrome entgegen der allgemeinen Annahme zur Steuerung der Photomorphogenese in der frühen Phase nicht an dieser beteiligt bzw. ihre Wirkung ist sekundär.

13. Die Mutante *det1* besitzt im etiolierten und belichteten Stadium der Entwicklung eine gegenüber den Wildtypen veränderte Genexpression. Da alle Phyto- und Cryptochrome vorhanden sein müßten, kann aus dem Vergleich entnommen werden, dass u.a. für die Gene des Photosyntheseapparates eine aktivierende Komponente fehlt. Ein weiterer Lichtfaktor ist zu postulieren.

14. Die Analyse verweist für DET1 auf aktivierende und repressive Wirkungen auf die Genexpression sowohl in Dunkelheit als auch in Licht. Demzufolge nimmt DET1 eine Schlüsselstellung in der frühen Photomorphogenese ein. Zwischen primären und sekundären Effekten auf die Genexpression kann auf der Basis der cDNA-Array-Experimente nicht entschieden werden.

15. Die transgene PHYB-überexprimierende Linie zeigt erst bei Belichtung eine von den Wildtypen abweichende Genexpression. Daraus ist zu schlussfolgern, dass erst photoaktiviertes Phytochrom zur Veränderung der Genexpression führt. Im Vergleich der Genexpression gegenüber den Wildtypen wirkt PHYB als Repressor, gegenüber der Mutante *det1* als Aktivator.



16. Die Verwendung der für die Photorezeptoren spezifischen Lichtquellen (Rotlicht, Rotlicht/Dunkelrotlicht, Blaulicht) in Belichtungsexperimenten mit dem Wildtyp Ler-0 lassen keinen Rückschluss auf den/die Genexpression induzierenden Photorezeptor/en zu.

17. Anhand ihrer Expression in den Belichtungsexperimenten können Gene in Gruppen zusammengefasst werden. Eine mögliche Ursache für die Ko-Expression der Gene könnten gemeinsame Promotorelemente sein.

18. Die Promotorelementanalyse weist eine G-Box (CCACGTGG) -ähnliche Sequenz als mögliches gemeinsames Promotorelement u.a. für die Gene von Proteinen des Photosyntheseapparates aus. Die G-Box-ähnliche Sequenz tritt in entsprechenden Promotoren von *Arabidopsis thaliana* signifikant häufiger im Bereich von -225 bis -150 (-100) bp vor dem Startkodon auf. Die Promotorelementanalyse zeigt im Zusammenhang mit der Genexpression während der frühen Photomorphogenese, dass dieses Promotorelement wahrscheinlich nicht allein für die Steuerung der Genexpression verantwortlich ist.

19. Neben dem G-Box-ähnlichen wurden zwei weitere Promotorelemente identifiziert. Eines entspricht einer CBF-Box (CCAAT) -ähnlichen Sequenz. Dieses Promotorelement ist im Bereich von -75 bis -50 bp vor dem Startkodon signifikant erhöht, während ein purinreiches Sequenzmotiv (PR-Motiv) unmittelbar vor dem ATG im Intervall von -50 bis -1 bp häufiger präsent ist. Alle drei Promotorelemente zusammen sind möglicherweise spezifisch notwendig für die Transkriptionsregulation von Genen, die für Proteine des Photosyntheseapparates kodieren.

20. Die Analyse der Genexpression verweist auch auf Gene, die spezifisch in den Keimlingen der einzelnen Wildtypen und Mutanten exprimiert werden. Zusammen mit der Analyse zur Ko-Expression von Genen und der Identifizierung von Promotorelementen eröffnet sich gleichzeitig die Chance, Gene mit bisher unbekannter Funktion in einen biologischen Zusammenhang zu stellen.