

**Untersuchungen zur Expression der Gene,
die für die Fucoxanthin Chlorophyll *a/c*
bindenden lichtsammelnden Polypeptide
der centrischen Diatomee *Cyclotella cryptica*
codieren**

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der **Carl
von Ossietzky Universität Oldenburg** zur Erlangung des Grades und
Titels eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

angenommene Dissertation

von Herrn **Andreas Oeltjen**

geboren am 09.04.1973 in Oldenburg

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Erhard Rhiel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang E. Krumbein

Tag der Disputation: 15.12.2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungen	8
Kapitel 1 – Einleitung	9
1.1. Photosynthese	9
1.2. Photosynthetisch aktive Pigmente	10
1.3. Die Orte der Photosynthese	11
1.4. Die membranintrinsicen Antennensysteme	13
1.5. Chromophytische Algen	15
1.6. Genexpression und Genregulation von Genen, die Lichtsammlerproteine codieren	16
1.7. Chromophytische Algen	19
1.8. Zielsetzung der Experimente	20
Kapitel 2 – Material & Methoden	22
2.1. Stammkulturen und Wachstumsbedingungen	22
2.2. Anzucht und Beprobung für Lichtquantitäts-Experimente	24
2.3. Anzucht und Beprobung für Lichtqualitäts-Experimente	25
2.4. Anzucht und Beprobung für Weißlicht-Experimente zu diurnalen Expressionsmuster	26
2.5. Anzucht und Beprobung für Untersuchungen zur circadianen Expressionsrhythmik	27
2.6. Zellernte	27
2.7. Spektroskopie	28
2.7.1. in vivo-Absorptionsspektroskopie ganzer Zellen	28
2.7.2. Absorptionsspektroskopie von Pigmentextrakten	28
2.7.3. Tieftemperatur-Fluoreszenzspektroskopie ganzer Zellen	29
2.8. RNA Isolation	29
2.9. Quantifizierung der isolierten Gesamt RNA	30
2.10. Alternative Isolation der Gesamt RNA mit NucleoSpin RNA II	31
2.11. Agarose Gel Elektrophorese und denaturierende Formaldehyd- Agarose Gel Elektrophorese	31

2.12. Northern Blotting Experiment	32
2.13. Turboblotting	33
2.14. RNA Dot Blotting	34
2.15. Sondensynthese	35
2.16. Hybridisierung	38
2.17. RT-PCR Experimente	39
2.18. Quantifizierung der Hybridisierungssignale und DNA Banden	39
2.19. Bestimmung der Transkriptgröße	40
2.20. t-Test Analyse der Daten aus der Untersuchung der circadianen Expressionsmuster	41
Kapitel 3 – Ergebnisse	42
3.1. Spektroskopie	42
3.1.1. in vivo-Absorptionsspektroskopie ganzer Zellen	42
3.1.2. Absorptionsspektroskopie von Pigmentextrakten	45
3.1.3. Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektroskopie ganzer Zellen	48
3.2. RNA Ausbeute	52
3.2.1. Gesamt RNA Ausbeute bei Kulturen, die unter Starklicht und Schwachlicht kultiviert wurden	52
3.2.2. Gesamt RNA Ausbeute bei Kulturen, die unter Rot-, Blau-, bzw. Grünlicht angezogen wurden	54
3.2.3. Gesamt RNA Ausbeute bei Kulturen zur Untersuchung der diurnalen Rhythmik	55
3.2.4. Gesamt RNA Ausbeute bei Kulturen zur Untersuchung der circadianen Rhythmik	56
3.3.. Alternative Isolation der Gesamt RNA mit NucleoSpin RNA II	57
3.4.. Transkriptlängen	57
3.5. Einfluß von Lichtquantität auf die steady state fcp mRNA Konzentration	59
3.6. RT-PCR Experimente	61
3.7. Einfluß von Lichtqualität auf die steady state fcp mRNA Konzentration	62

3.8. Diurnales Expressionsmuster	65
3.8.1. Diurnales Expressionsmuster von <i>fcp2</i>	66
3.8.2. Invertiertes diurnales Expressionsmuster von <i>fcp2</i>	67
3.8.3. Diurnales Expressionsmuster von <i>fcp4</i>	68
3.8.4. Diurnales Expressionsmuster von <i>fcp6</i>	69
3.8.5. Diurnales Expressionsmuster von <i>fcp12</i>	69
3.9. Circadiane Expressionsmuster	71
Kapitel 4 – Diskussion	77
4.1. Spektroskopie	77
4.1.1. in vivo-Absorptionsspektroskopie ganzer Zellen	77
4.1.2. Absorptionsspektroskopie von Pigmentextrakten	79
4.1.3. Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektroskopie	80
4.2. RNA Ausbeute	81
4.3. Transkriptlängen	82
4.4. Effekte von Lichtquantität	84
4.5. Lichtqualitätsexperimente	86
4.6. RT-PCR Experimente	88
4.7. Diurnales Expressionsmuster	90
4.8. Circadianes Expressionsmuster	94
Kapitel 5 – Zusammenfassung	97
Datensammlung/Anhang	101
Literaturverzeichnis	109
Chemikalienverzeichnis	122
Geräteverzeichnis	124
Danksagung	125
Erklärung	126
Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang	127

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1.1. Struktur des Chlorophyll <i>a</i> und <i>b</i>	10
Abb.1.2. Strukturformeln verschiedener Carotine.....	11
Abb. 1.3: Strukturformeln zweier Phycobiline.....	12
Abb. 1.4. Detail des Chloroplastenaufbaus.....	12
Abb.1.5. Die photosynthetische Einheit und ihr assoziiertes Reaktionszentrum in oxygenen Phototrophen.....	13
Abb. 1.6. Schematische Darstellung des reifen Fcp2 Proteins von <i>Cy. cryptica</i>	15
Abb. 1.7. REM-Aufnahme von <i>Cyclotella cryptica</i>	19
Abb. 2.1.1. Exemplarische Darstellung der Wachstumskinetik. Zellzahl wurde zu Beginn und zum Ende des Experimentes bestimmt.....	23
Abb. 2.3.1. Absorptionsspektrum des Rotlicht-Filters.....	25
Abb. 2.3.2. Absorptionsspektrum des Blaulicht-Filters.....	25
Abb. 2.3.3. Absorptionsspektrum des Grünlicht-Filters.....	26
Abb. 2.13.1. Zusammensetzung der Turboblotting-Anlage.....	33
Abb. 2.15.1. Schematische Darstellung der <i>fcp</i> Gene und Nomenklatur, Nucleotidsequenzen, Positionen und Orientierungen der genutzten Primer.....	35
Abb. 2.19.1. Eichgerade der RNA-Fragmentgrößen.....	40
Abb. 3.1.1.1. <i>in vivo</i> Absorptionsspektrum einer Kultur nach Anzucht unter Rotlicht-Regime.....	42
Abb. 3.1.1.2. <i>in vivo</i> Absorptionsspektrum einer Kultur nach Anzucht unter Blaulicht-Regime.....	43
Abb. 3.1.1.3. <i>in vivo</i> Absorptionsspektrum einer Kultur nach Anzucht unter Grünlicht-Regime.....	43
Abb. 3.1.1.4. <i>in vivo</i> Absorptionsspektrum einer Kultur nach Anzucht unter Schwachlicht-Regime.....	44
Abb. 3.1.2.1. Absorptionsspektrum eines Pigmentextraktes einer Kultur, die unter Rotlicht angezogen wurde.....	45
Abb. 3.1.2.2. Absorptionsspektrum eines Pigmentextraktes einer Kultur, die unter Blaulicht angezogen wurde.....	46
Abb. 3.1.2.3. Absorptionsspektrum eines Pigmentextraktes einer Kultur, die unter Grünlicht angezogen wurde.....	46

Abb. 3.1.2.4. Absorptionsspektrum eines Pigmentextraktes einer Kultur, die unter Schwachlicht angezogen wurde.....	47
Abb. 3.1.3.1. Tieftemperatur-Fluoreszenzspektrum einer <i>C.c.</i> Kultur, die unter Rotlicht-Regime angezogen wurde.....	49
Abb. 3.1.3.2. Tieftemperatur-Fluoreszenzspektrum einer <i>C.c.</i> Kultur, die unter Blaulicht-Regime angezogen wurde.....	49
Abb. 3.1.3.3. Tieftemperatur-Fluoreszenzspektrum einer <i>C.c.</i> Kultur, die unter Grünlicht-Regime angezogen wurde.....	50
Abb. 3.1.3.4. Tieftemperatur-Fluoreszenzspektrum einer <i>C.c.</i> Kultur, die unter Schwachlicht-Regime angezogen wurde.....	51
Abb. 3.2.1.1. Spektroskopische Auswertung zur Quantifizierung der Gesamt RNA aus einer unter Starklicht angezogenen <i>Cy. cryptica</i> Kultur.....	52
Abb. 3.2.1.2. Spektroskopische Auswertung zur Quantifizierung der Gesamt RNA aus einer unter Starklicht angezogenen <i>Cy. cryptica</i> Kultur.....	53
Abb. 3.2.2.1. Spektroskopische Auswertung zur Quantifizierung der Gesamt RNA aus einer unter rotem Licht (RL) angezogenen <i>Cy. cryptica</i> Kultur.....	54
Abb. 3.2.2.2. Spektroskopische Auswertung zur Quantifizierung der Gesamt RNA aus einer unter blauem Licht (BL) angezogenen <i>Cy. cryptica</i> Kultur.....	54
Abb. 3.2.2.3. Spektroskopische Auswertung zur Quantifizierung der Gesamt RNA aus einer unter grünem Licht (GL) angezogenen <i>Cy. cryptica</i> Kultur.....	55
Abb. 3.2.3.1. Spektroskopische Auswertung zur Quantifizierung der Gesamt RNA aus einer Schwachlicht 12h Licht: 12 h Dunkel Umgebung (LL) angezogenen <i>Cy. cryptica</i> Kultur; 09:00 Uhr Beprobung.....	55
Abb. 3.2.4.1. Spektroskopische Auswertung zur Quantifizierung der Gesamt RNA aus einer Probe aus einer <i>Cy. cryptica</i> Kultur zu Untersuchungen zur circadianen Expressionsmuster der <i>fcp</i> Gene; 20:00 Uhr, erster Versuchstag.....	56
Abb. 3.4.1. Northern Blot Analyse, welche die Transkriptlängen der verschiedenen <i>fcp</i> mRNA von <i>Cy. cryptica</i> zeigen.....	57
Abb. 3.4.2. Northern Blot Analyse, welche die Transkript-längen der verschiedenen <i>fcp</i> mRNA von <i>Cy. cryptica</i> zeigen bei längerer Exposition.....	58
Abb. 3.5.1. Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente der RNA Dot Blots. Blots von Starklicht(HL) und Schwachlicht (LL) Anzuchten.....	59
Abb. 3.5.2. Säulendiagramm der steady state mRNA Konzentrationen von <i>fcp2</i> und <i>fcp4</i> unter HL und LL Bedingungen.....	60

Abb. 3.5.3. Säulendiagramm der steady state mRNA Konzentrationen von <i>fcp6</i> und <i>fcp12</i> unter HL und LL Bedingungen.....	60
Abb. 3.6.1.: Ergebnisse der RT PCR Experimente.....	61
Abb. 3.6.2. Spektroskopische Auswertung zur Quantifizierung der poly(A) ⁺ RNA aus einer Probe aus einer unter Schwachlicht angezogenen <i>Cy. cryptica</i> Kultur.....	62
Abb. 3.7.1. Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente der RNA Dot Blots der Lichtqualitätsexperimente.....	63
Abb. 3.7.2. Säulendiagramm der steady state mRNA Konzentrationen von <i>fcp2</i> , <i>fcp4</i> , <i>fcp6</i> und <i>fcp12</i> unter RL, GL und BL Bedingungen.....	64
Abb. 3.8.1. Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente der RNA Dot Blots aus diurnalen Expressionsmuster-Experimenten.....	65
Abb. 3.8.1.1. Säulendiagramm der steady state mRNA Konzentrationen von <i>fcp2</i> über den Zeitraum von 24 h in einem LL- 12h Licht: 12h Dunkel Regime.....	66
Abb. 3.8.2.1.: Säulendiagramm der steady state mRNA Konzentrationen von <i>fcp2</i> über den Zeitraum von 24 h in einem LL- 12h Licht: 12h Dunkel Regime mit invertierter Licht-/Dunkelphase.....	67
Abb. 3.8.3.1. Säulendiagramm der steady state mRNA Konzentrationen von <i>fcp4</i> über den Zeitraum von 24 h in einem LL- 12h Licht: 12h Dunkel Regime.....	68
Abb. 3.8.4.1 Säulendiagramm der steady state mRNA Konzentrationen von <i>fcp6</i> über den Zeitraum von 24 h in einem LL- 12h Licht: 12h Dunkel Regime.....	69
Abb. 3.8.5.1. Säulendiagramm der steady state mRNA Konzentrationen von <i>fcp12</i> über den Zeitraum von 24 h in einem LL- 12h Licht: 12h Dunkel Regime.....	70
Abb. 3.9.1. Hybridisierungssignale der Dot Blot Experimente zur circadianen Expressionsrhythmik. Exemplarische Darstellung der mit <i>fcp2</i> und <i>fcp6</i> Gensonden hybridisierten Dot Blots, sowie der 18S rDNA hybridisierten Signale.....	71
Abb. 3.9.2. Säulendiagramm der <i>fcp2</i> Signalintensitäten, normiert auf 18S rRNA Signalintensität, 14:00 Uhr des ersten Tages als 100%.....	72
Abb. 3.9.3. Säulendiagramm der <i>fcp6</i> Signalintensitäten, normiert auf 18S rRNA Signalintensität, 14:00 Uhr des ersten Tages als 100%.....	72
Abb. 3.9.4. Säulendiagramm der <i>fcp4</i> Signalintensitäten, normiert auf 18S rRNA Signalintensität.....	73
Abb. 3.9.5. Säulendiagramm der <i>fcp12</i> Signalintensitäten, normiert auf 18S rRNA Signalintensität.....	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.1.: Wachstumskinetik: Zellzahlen der <i>Cyclotella</i> -Kultur vom Anzuchtbeginn und Anzuchtende des Experiments zur diurnalen Rhythmik.....	24
Tabelle 2.1.2.: Wachstumskinetik: Zellzahlen der <i>Cyclotella</i> -Kultur vom Anzuchtbeginn und Anzuchtende des Experiments über einen Zeitraum von 21 Tagen.....	24
Tabelle 2.13.1.: Primerkombinationen für die in den verschiedenen Versuchen eingesetzten genspezifischen Sonden.....	36
Tabelle 3.1.2.1. Verhältnis von <i>Chl a</i> zu <i>Chl c₁ + c₂</i> für <i>Cy. cryptica</i> -Kulturen, die unter Schwachlicht, Rotlicht, Blaulicht und Grünlicht angezogen wurden.....	47
Tabelle 3.1.2.2. Quotienten der <i>Chl a</i> : Carotinoid Peaks und <i>Chl c</i> : Carotinoid Peaks der Absorptionsspektren der Pigmentextrakten der Rotlicht-, Blaulicht-, Grünlicht- und Schwachlichtanzuchten.....	48
Tabelle 3.4.1.: Berechneter Durchschnitt an Basenanzahl der Transkriptlängen der untersuchten <i>fcp</i> Genen.....	58
Tabelle 3.5.1. Relative Signalintensitäten der Dot Blots der Lichtqualitäts-Experimente.....	59
Tabelle 3.7.1. Relative Signalintensitäten der Dot Blots.....	63
Tabelle 3.9.1. p-Werte der t-Test Analyse.....	75

Abkürzungen

Cab	Chlorophyll <i>a/b</i> bindendes Protein
<i>cab</i> Gen	Gen eines Chlorophyll <i>a/b</i> bindenden Proteins
CSPD	3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1.1. ^{3,7}]decan)-4-yl) phenyl phosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuclease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fcp	Fucoxanthin/Chlorophyll <i>a/c</i> bindendes Protein
<i>fcp</i> Gen	Gen eines Fucoxanthin/Chlorophyll <i>a/c</i> bindenden Proteins
LHC	Light-harvesting-complex (Lichtsammlerkomplex)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
RT PCR	Reverse Transkription Polymerase Chain Reaction (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion)
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
BL	Blaulicht
RL	Rotlicht
GL	Grünlicht
LL	Schwaches Weißlicht
HL	Starkes Weißlicht

1. Einleitung

1.1. Photosynthese

Licht ist die Primärenergie und die Photosynthese der treibende Prozeß des Lebens auf unserer Erde. Die Energiemengen, die von der Sonne zu uns gelangen, sind gewaltig, wobei die globale Sonneneinstrahlung mit ca. 1,35 Watt pro m² und Jahr etwa 1000mal so groß wie der derzeitige Energieverbrauch der Menschen ist. Photosynthetische Organismen haben sich daher mit Lichtenergie eine nahezu unbegrenzte und im biologischen Zeitmaßstab unerschöpfliche Energiequelle erschlossen (Scheer 1999). Fast alle Lebensformen beruhen somit direkt oder indirekt auf der Energiegewinnung durch die Umwandlung von solarer Strahlungsenergie in chemische Energie (Häder 1999).

In dem als „Photosynthese“ bezeichneten Gesamtprozeß wird Lichtenergie der Sonne von Höheren Pflanzen, Algen und photosynthetisch aktiven Bakterien in chemisch gebundene Energie umgewandelt. Einzelne Lichtquanten werden dabei von Antennenpigmenten absorbiert und zu den sogenannten Reaktionszentren weitergeleitet. In den Reaktionszentren findet eine photoinduzierte Ladungstrennung statt, wobei pro absorbiertem Lichtquant maximal ein Elektron über die Photosynthesemembran (s.u.) transportiert werden kann. Der Elektronentransport ist meistens mit einem Protonentransport über diese Membranen gekoppelt. Auf diese Weise wird ein photochemisch erzeugtes elektrochemisches Potential über diese Membranen aufgebaut, das in einer Serie von nachgeschalteten Dunkelreaktionen in Redoxäquivalente (NADP-H + H⁺) und chemische Energie in Form von ATP überführt wird. In weiteren Dunkelreaktionen entstehen stabile chemische Verbindungen. Der hier global beschriebene Prozeß der Photosynthese besteht jedoch aus einer Vielzahl komplexer Einzelreaktionen (Holzwarth 1999).

Redoxäquivalente und ATP sind in nachgeschalteten Dunkelreaktionen für die Entstehung stabiler chemischer Verbindungen in Form von Kohlenhydraten aus CO₂ und Wasser unentbehrlich (Holzwarth 1999). Die Bilanz der Photosynthese läßt sich in folgender Gleichung ausdrücken, wobei A für einen beliebigen Wasserstoff- bzw. Elektronendonator, wie z.B. H₂O oder H₂S steht (Nultsch 1986):



1.2. Photosynthetisch aktive Pigmente

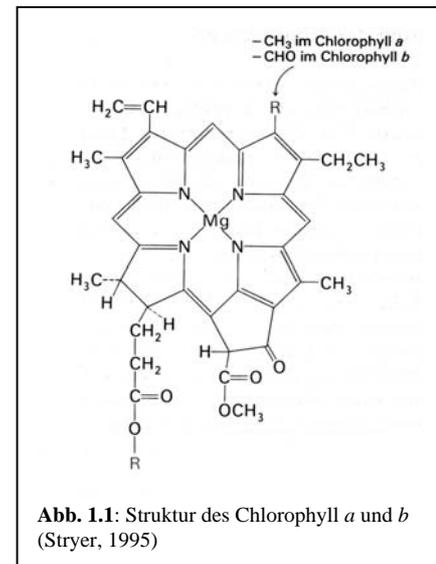
Als Pigmente fungieren in der Photosynthese Chromophoren, die Licht im Wellenlängenbereich von ca. 400 – 700 nm absorbieren. Alle Chromophoren sind durch Proteine organisiert und mit ihnen assoziiert. Einzelne Pigment-Protein-Komplexe wiederum sind in Überstrukturen zusammengefaßt, die einen Ferntransport der Anregungsenergie möglich machen (Scheer, 1999). Generell können die Pigmente in die Chlorophylle und Carotinoide und Phycobiline unterteilt werden.

1.2.1. Chlorophylle

Chlorophylle sind zyklische Tetrapyrrole mit einem charakteristischen isozyklischen Porphyrinring (Scheer, 1999) (Abb. 1.1.). Sie enthalten Magnesium als Zentralatom. Die Propionsäureseitenkette ist bei den Chlorophyllen *a* und *b*, den typischen Chlorophyllen von Höheren Pflanzen und Grünalgen, mit einem langkettigen lipophilen Alkohol, dem Phytol verestert. Dieser Phytolrest fehlt dem Chlorophyll *c*, dem für chromophytische Algen typischen Chlorophyll.

Die Chlorophylle stellen sehr wirksame Photorezeptoren dar. Generell nutzen Chlorophylle den blauen und den

roten Bereich des Spektrums des sichtbaren Lichtes sehr effizient, verwerten aber Licht im Wellenlängenbereich von ca. 500 – 620 nm kaum. Diese „Grünlücke“ wird durch Hilfspigmente, speziell Carotinoide und Phycobiline geschlossen (Sitte *et al.*, 1998). Die Absorptionsspektren der Chlorophylle *a*, *b* und *c* unterscheiden sich in ihren Absorptionsmaxima, so daß sie sich bei der Absorption des einfallenden Lichtes ergänzen (Stryer *et al.*, 1995).



1.2.2. Carotinoide

Die am weitesten verbreiteten akzessorischen Pigmente sind die Carotinoide (Abb.1.2.) (Brock *et al.*, 1994). Sie sind infolge zahlreicher konjugierter Doppelbindungen gelb, orange oder rot gefärbte, lipophile Farbstoffe (Lipochrome). Carotinoide unterteilen sich generell in Carotine und Xanthophylle. Carotine sind reine Kohlenwasserstoffe, Xanthophylle hingegen sauerstoffhaltige Derivate der Carotine, z.B. das bei Höheren Pflanzen und Grünalgen dominierende Lutein und das Fucoxanthin, das den Braunalgen und Diatomeen die charakteristische braune Färbung verleiht.

Die Carotinoide absorbieren im blauen und teilweise im grünen Bereich des Spektrums. Allerdings sind sie bei den meisten Arten wenig effektive Energieüberträger. Setzt man die maximale Effektivität von Chlorophyll gleich 100%, so variiert die von Carotinoiden bei verschiedenen Pflanzen zwischen 20% und 50%; das Xanthophyll Fucoxanthin der Braunalgen und Diatomeen soll aber etwa 80% erreichen (Sitte *et al.* 1999).

Carotinoide sind eng mit den Chlorophyllen in der Photosynthesemembran assoziiert, agieren aber nicht direkt in der Photophosphorylierung (s.u.), sondern übertragen die absorbierte Strahlungsenergie zu den Reaktionszentren.

Zusätzlich fungieren sie als Lichtschutzpigmente. Extrem hohe Lichtintensitäten können die Zellen schädigen, da sie verschiedene photooxidative Reaktionen auslösen, die zur Zerstörung der Chlorophylle und letztendlich des gesamten Photosyntheseapparates selbst führen können. Carotinoide absorbieren viel von dem schädlichen Licht und stellen ein Schild für die lichtempfindlichen Chlorophylle dar, indem sie die überschüssige absorbierte Lichtenergie in Form von Wärme abgeben und so den Photosyntheseapparat entlasten. (Brock *et al.*, 1994).

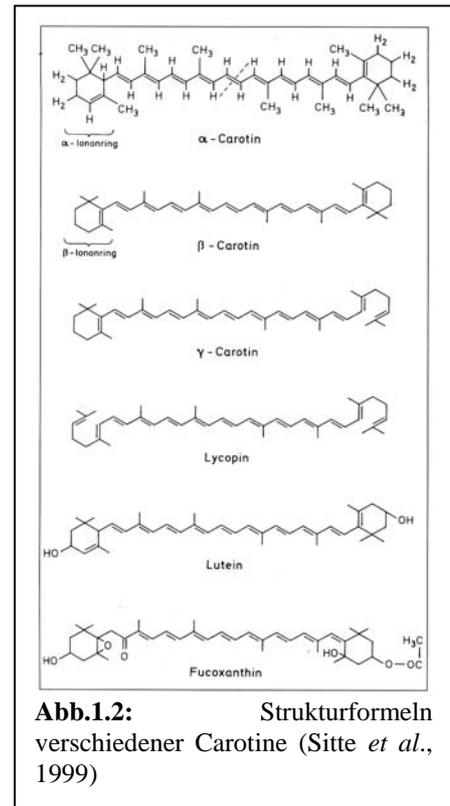
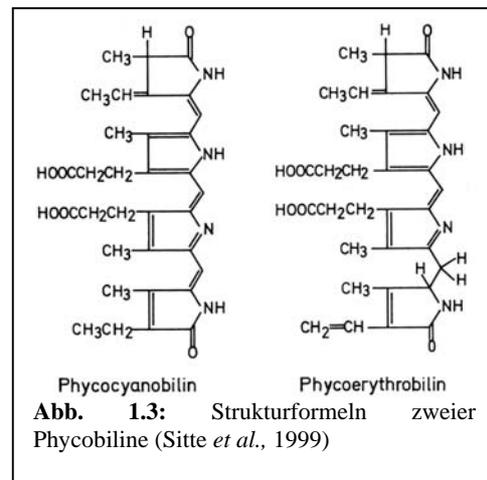


Abb.1.2: Strukturformeln verschiedener Carotene (Sitte *et al.*, 1999)

1.2.3. Phycobiliproteide

Neben den Carotinoiden existieren noch die Phycobiline (sh. Abb.1.3) als akzessorische Pigment-Proteinkomplexe. Die eigentlichen Pigmente, die Phycoerythrobiline, die Phycocyanobiline und die Phycourobiline, sind hierbei kovalent an ihre Polypeptide gebunden. Generell werden Phycocyanine (blau), Phycoerythrine (rot) und das türkis erscheinende Allophycocyanin unterschieden. Sie kommen in wechselnden Mengenverhältnissen

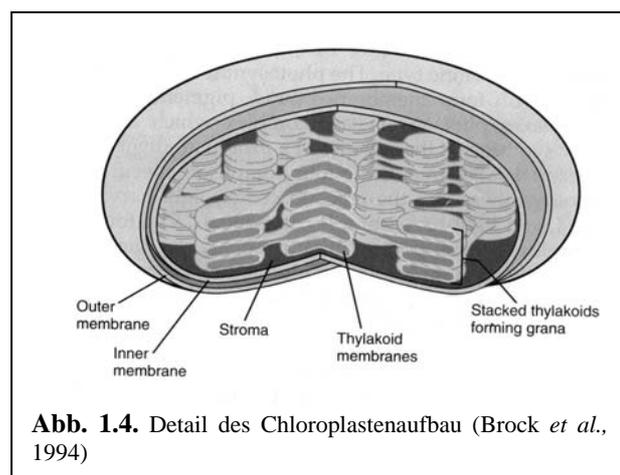


bei Cyanobakterien und Rotalgen vor. Cryptophyceen enthalten, abweichend von den Cyanobakterien und Rotalgen, entweder nur Phycocyanin oder nur Phycoerythrin. Mit Absorptionsmaxima von ca. 550 nm (Phycoerythrine), 620 nm (Phycocyanine) und 650 nm (Allophycocyanine) schließen sie weitestgehend die „Grünlücke“ der Chlorophyll-Absorption je nach dem vorhandenen Sortiment an Phycobiliproteiden (Richter 1996).

Phycobiliproteinen sind membran-extrinsischen Antennen und sitzen bei Cyanobakterien und Rotalgen als supramolekulare Komplexe, Phycobilisome genannt, den Thylakoiden stromaseitig auf. Bei den Cryptophyceen sind sie in den Thylakoidlumina lokalisiert.

1.3. Die Orte der Photosynthese

Die Photosynthesepigmente und alle anderen Komponenten des Photosyntheseapparates sind in speziellen Membransystemen, den Photosynthetischen Membranen, lokalisiert. Diese werden als Thylakoide bezeichnet. Die Position der Thylakoide innerhalb der Zellen unterscheidet sich bei prokaryotischen und eukaryotischen Mikroorganismen.



In prokaryotischen Zellen sind die Thylakoidmembranen nicht weiter vom

Cytoplasma abgegrenzt. In Eukaryoten hingegen sind sie in speziellen Organellen, den sogenannten Chloroplasten lokalisiert (Brock *et al.* 1994) (sh. Abb.1.4.). Die Thylakoide sind so angeordnet, daß der Chloroplast in zwei Kompartimente aufgeteilt wird, den Matrixraum (Stroma), welcher die Thylakoide umgibt, und den Thylakoidinnenraum (Lumen). Diese

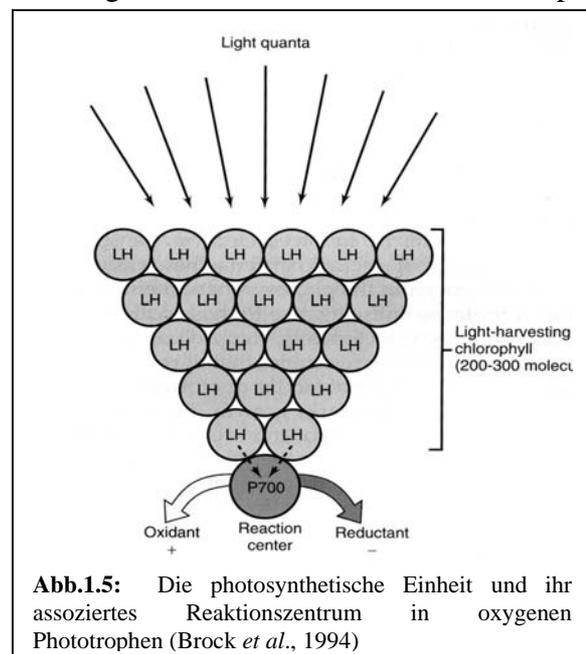
Anordnung macht den Aufbau eines lichtgetriebenen pH Gradienten eigentlich erst möglich. (Richter 1996; Mörschel 1999).

Die Thylakoidmembranen können einzeln im Stroma liegen, typisch für die Chloroplasten von Rotalgen, oder zu zweit oder zu dritt assoziiert auftreten (Dinophyceen, chromophytische Algen). In den Chloroplasten von Höheren Pflanzen und Grünalgen sind die Thylakoide oft in gestapelte (Grana-)thylakoide und ungestapelte (Stroma-)thylakoide differenzierbar (sh. Abb.1.4.) (Richter 1996; Mörschel 1999).

Die einzelnen integralen Komplexe des Photosyntheseapparates Höherer Pflanzen sind hierbei unterschiedlich in den Stroma- und Granathylakoiden arrangiert: das Photosystem I und der CF_1/CF_0 -Komplex (ATP-Synthase) finden sich fast ausschließlich in den ungestapelten Stromathylakoiden, während das Photosystem II größtenteils in den Granathylakoiden lokalisiert ist; der Cytochrom b_6/f -Komplex hingegen ist auf beide Thylakoidtypen gleichmäßig verteilt (Link 1999).

1.4. Die membranintrinsicischen Antennensysteme

In der auf Chlorophyllen basierenden Photosynthese gibt es bei den Lichtreaktionen eine Arbeitsteilung: Antennensysteme, die in Komplexen angeordnet als lichtsammelnde Komplexe (engl.: light harvesting complexes, LHCs) bezeichnet werden, absorbieren die Strahlungsenergie und leiten sie z.T. über beträchtliche Entfernungen zu den Reaktionszentren weiter (Green and Durnford 1996; Grossman *et al.*, 1995; Jansson 1994). In den Reaktionszentren findet die eigentliche Energiekonversion statt. Die LHCs der Grünen Pflanzen enthalten Chlorophyll *a*, Chlorophyll *b* und Lutein als wesentliches Carotinoid und werden als Cab (engl.: chlorophyll *a/b* binding protein) oder als Lhc Proteine bezeichnet (Grossman *et al.*, 1995; Jansson *et al.*, 1992).



Die Vorteile dieser funktionellen Arbeitsteilung in eigentliche Reaktionszentren und Lichtsammler- (Antennen-)systeme sind 1) eine flexible Anpassung an die Lichtbedingungen durch Variationen der Antennen, unter Beibehaltung nur weniger, hocheffizienter Typen von Reaktionszentren und 2) eine wesentlich geringere Investition in Protein pro absorbierenden

Chromophor (Scheer 1999). Dementsprechend enthalten die Antennen den überwiegenden Teil (>95%) der Photosynthesepigmente. Dies hat weitere Vorteile: Einmal ist eine flexible Anpassung des Photosyntheseapparates an sehr unterschiedliche Lichtbedingungen möglich. Zweitens erhöhen die Antennen den Absorptionsquerschnitt der Reaktionszentren um ein Vielfaches. Antennensysteme erfüllen letztendlich also zwei Aufgaben: zum einen fangen sie, auf die jeweiligen unterschiedlichen Lichtbedingungen angepaßt, Lichtquanten ein, andererseits schützen sie vor photooxidativen Reaktionen (siehe Kap. 1.2.2.: Carotinoide).

Bei Höheren Pflanzen sind die Lichtsammlerproteine durch eine auffällige Differenzierung in verschiedene Subpopulationen charakterisiert. Man kann zwischen Photosystem I – und Photosystem II – spezifischen Antennen und hier wiederum zwischen „inneren“ und „äußeren“ Antennenkomplexen unterscheiden. Im Photosystem I sind die Chlorophyllmoleküle der inneren Antenne direkt an die eigentlichen Reaktionszentren-Polypeptide gebunden, während bei Photosystem II das Reaktionszentrum von zwei Chlorophyll-tragenden Proteinen als innere Antenne umgeben ist. Sie werden aufgrund ihres Molekulargewichtes als CP 43 und CP 47 bezeichnet. Um dieses Assoziat aus innerer Antenne und Reaktionszentrum gruppieren sich bei Photosystem II mehrere kleine Antennenkomplexe, die sich in ihrem Molekulargewicht und ihrer Pigmentzusammensetzung unterscheiden. Diese werden als LHC II a bis LHC II d bezeichnet. Mengenmäßig am wichtigsten ist der LHC II b, der etwa 50% des Gesamtchlorophylls einer Pflanze bindet (Wilhelm 1999).

Die Antennenproteine von Photosystem I werden von den *Lhca* 1-4 Genen codiert, wobei die Lhca Proteine in den Komplexen als Dimere angeordnet sind (Jansson et al. 1997). Die internen Antennen und das Reaktionszentrum sind zusammen in Photosystem I in einem Chl-Komplex kombiniert. Das Chl-Carotinoid Protein des Komplexes besteht aus zwei hydrophoben Polypeptiden, welche zusätzlich zu den Chl *a* Dimer (P700) und den Elektronenakkzeptoren A₀, A₁ und A₂ auch Chl *a* und β -Carotin Moleküle binden. Dabei übernehmen die Chl *a* Moleküle dieselbe Rolle wie die separaten Antennekomplexe CP 47 und CP 43 von Photosystem II (Green and Durnford 1996).

Von allen bislang auch molekularbiologisch untersuchten Lichtsammlerkomplexen terrestrischer Pflanzen und Grünalgen weiß man, daß ihre konstituierenden Polypeptide von einer Multigen-Familie im Kerngenom codiert (Green *et al.*, 1991, Chitnis and Thornber 1988) und im Zytoplasma der Zelle als Precursor mit einer zusätzlichen Basenpräsequenz von 3-5 kDa synthetisiert werden. Diese Präsequenz wird als Transitpeptid bezeichnet und ist notwendig, um das Protein durch die beiden Hüllmembranen des Chloroplasten zu transportieren (Schmidt and Mishkind 1986; Keegstra 1989; DeBoer and Weisbeek 1991).

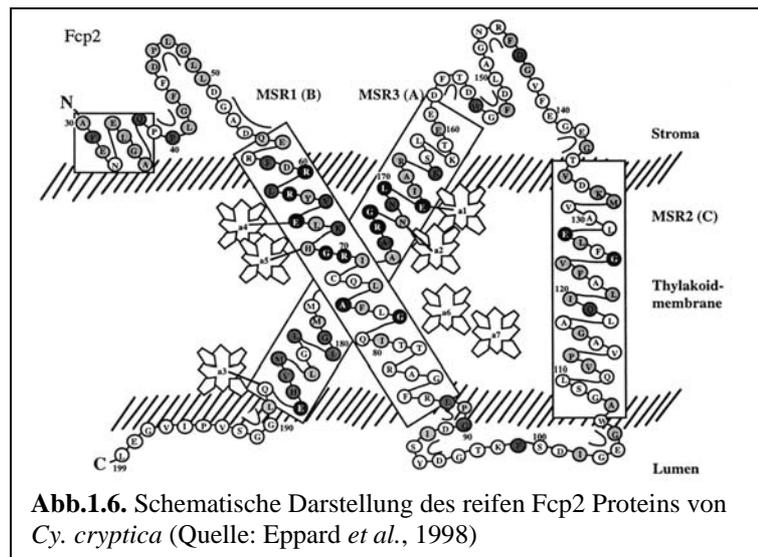
1.5. Die membranintrinsicischen Lichtsammlerkomplexe der chromophytischen Algen

Schon beim bloßen Anschauen unterscheiden sich viele Algen von den grünen Blättern Höherer Pflanzen durch ihre abweichende Farbe, wie schon aus ihren Namen wie z.B. Rotalgen, Braunalgen oder Goldalgen erkenntlich wird. Ursache hierfür sind die von den Höheren Pflanzen abweichenden Pigmentzusammensetzungen, die fast allesamt in den photosynthetischen Antennenkomplexen lokalisiert sind.

Die LHC Untereinheiten der meisten chromophytischen Algen enthalten Chlorophyll *a*, Chlorophyll *c* und Fucoxanthin als wesentliches Carotinoid und werden als Fcp (engl.: fucoxanthin chlorophyll *a/c* binding protein, dt.: Fucoxanthin Chlorophyll *a/c* bindende Proteine) oder als Cac (Chlorophyll *a/c* bindende) Proteine bezeichnet (Grossman *et al.*, 1995; Jansson *et al.*, 1992). Die Fucoxanthin-haltigen Antennen der chromophytischen Algen schließen mit einem vergleichsweise geringen Proteinaufwand die Grünücke relativ gut. Gerade im aquatischen Milieu stellt der grüne Spektralbereich in großen Tiefen die mengenmäßig wichtigste Energiequelle dar, so daß es nicht verwunderlich ist, daß in tieferen Wasserschichten entweder die Antenne mit Phycobilinen oder die mit „braunen“ Xanthophyllen vorherrscht (Wilhelm 1999). Daher sind Untersuchungen an Antennen dieser Art von großem Interesse.

Die Pigmente Fucoxanthin und Chlorophyll *a* und *c* sind hierbei in Analogie zu den Pigmenten der Chl *a/b* LHCs Höherer Pflanzen und Grünalgen (Berkaloff *et al.*, 1981; Duval *et al.*, 1983; Peyriere *et al.*, 1984; Caron *et al.*, 1988; Katoh *et al.*, 1989; Berkaloff *et al.* 1990; Mimuro *et al.*, 1990; Passaquet *et al.*, 1991) und anderen chromophytischen Algen (Grevby and Sundqvist 1992) nicht kovalent an die Apoproteine gebunden.

Weiterhin ist die Struktur der Fcp Polypeptide jener der LHC II Polypeptide der Höheren Pflanzen sehr ähnlich. Dem in Stroma lokalisierten N-Terminus folgen drei die Thylakoid-



membran durchziehende α -Helices und ein C-Terminus, der im Lumen liegt. Die Pigmentbindungsregion wird analog zum LHC II b, dem Hauptantennenprotein-Komplexes bei Höheren Pflanzen, in den hydrophoben, transmembranen Proteinsegmenten vermutet. Soweit

bislang untersucht, liegen die Membran-intrinsischen LHCs *in vivo* trimerisiert oder noch höher aggregiert vor (Abb. 1.6.) (Häder, D.P., 1999, Büchel 2003).

Soweit dies bisher untersucht wurde, besitzen chromophytische Algen die gleichen inneren lichtsammelnden Komplexe (äquivalent zu CP 43 & CP 47) wie die Höheren Pflanzen auch; die Variabilität bezieht sich ausschließlich auf die peripheren Lichtsammler. Auch die klare Differenzierung in LHCs, die spezifisch mit den jeweiligen Photosystemen assoziiert sind, ist bei den Chlorophyll *c*-haltigen Algen entweder fehlend oder zumindest nicht so klar ausgeprägt wie bei den Höheren Pflanzen und Grünalgen. Über die räumliche Verteilung der verschiedenen Subpopulationen ist bei vielen Algenthylakoiden wenig bekannt (Häder *et al.* 1999). Bei Höheren Pflanzen sind die Lichtantennenproteine durch eine auffällige Differenzierung in verschiedene Subpopulationen charakterisiert. Man kann zwischen „inneren“ und „äußeren“ und zwischen PS I- und PS II-spezifischen Antennen unterscheiden (Wilhelm, 1999).

1.6. Expression und Genregulation von Genen, die Lichtsammlerproteine codieren

1.6.1. Expression und Genregulation der LHC Untereinheiten

Die Synthese der LHC Untereinheiten und die Regulation der Expression ihrer Gene (*lhc* Gene codieren LHC Untereinheiten, *fcps* Gene codieren Fcps) ist intensiv bei Grünen Pflanzen untersucht worden. Es hat sich gezeigt, daß sowohl die Lichtqualität als auch die Lichtquantität einen Einfluß auf die Expression der *lhc* Gene hat. Die Interpretation der Daten wird dadurch kompliziert, daß die Gene der LHC Polypeptide mit Genen co-reguliert werden, die Enzyme codieren, welche in der Chlorophyll-Synthese benötigt werden (Grossman *et al.*, 1995). Generell läßt sich sagen, daß die Lichtqualität und –quantität einen signifikanten Einfluß auf die Gene hat, welche für die LHCs codieren. Sowohl die Gene der verwandten Pigmente als auch Proteine werden in ihrer Expression beeinflusst. Weiterhin ist die *lhc* Genaktivität an eine biologische Uhr gebunden und die Expression der Gene oszilliert circadian (Piechulla 1999).

1.6.2. Regulation proteincodierende Gene

Am besten ist wohl die Regulation der lichtsammelnden Pigment-Protein-Komplexe bei den Höheren Pflanzen untersucht (Horton *et al.*, 1996).

Allgemein führen hohe Lichtintensitäten zu einer Repression der mRNA Akkumulation multipler *lhc* Gene. Es scheint, als würde die Expression der *lhc* Gene koordiniert unterdrückt

werden, wenn der Energie-Input durch das Antennensystem die Anforderungen der CO₂ – Assimilation übersteigt (Teramoto *et al.*, 2002). Vermutlich dienen Redoxsignale über an der Photosynthese beteiligten Elektronencarrier der Genregulation. Diese Art der Kontrolle wird bei vielen photosynthetisch aktiven Organismen vermutet (Melis *et al.*, 1985; Kindle 1987; LaRoche *et al.*, 1991).

Für den Großteil der *lhc* Gene gilt, daß die mRNA Mengen unter Starklicht höher sind als unter Schwachlicht (Teramoto *et al.*, 2002).

In Grünen Pflanzen wird die lichtregulierte Transkription der *cab* Gene via Phytochrome vermittelt; Response/Antwort/Reaktions-Elemente sind in den Promotoren der *cab* Gene identifiziert worden (Terzaghi and Cashmore, 1995). Allerdings wurden Phytochrome nur in Chlorophyten festgestellt, was impliziert, daß die Regulation der Synthese der lichtsammelnden Proteine in anderen Algen über alternative Mechanismen erreicht wird. In Chrysophyten wird die Synthese der Chlorophyll *a/c* Proteine auf der Ebene der Transkription lichtreguliert (Passaquet and Lichtle, 1995) wohingegen in *Euglena gracilis* die LHC Synthese anscheinend posttranskriptional reguliert wird (Houlne and Schanz, 1993). Wie diese Effekte bei der Abwesenheit des Phytochromsystems funktionieren, ist zur Zeit unbekannt.

Es hat sich gezeigt, daß auch die Lichtqualität einen starken Einfluß auf die Expression der benannten Gene hat. So hat sich für viele Gene gezeigt, daß die mRNA Mengen der respektiven Gene unter verschiedenen Lichtregimen unterschiedlich groß sind. Die geringsten Werte für mRNA einzelner Gene werden bei Organismen unter blauem Licht beobachtet, wobei die Konzentrationen der mRNA des gleichen Gens unter rotem Licht von gleichen Lichtintensitäten signifikant höher ist (Apt *et al.*, 1995).

Die großen Veränderungen, die in den Transkriptmengen unter blauem Licht beobachtet werden konnten, lassen vermuten, daß es noch eine andere Stufe der Kontrolle neben der Energiebalance gibt. Dies kann man vermuten, da hochintensives Rotlicht nicht so effektiv bei der Unterdrückung des Transkriptes ist, wie hochintensives blaues Licht (Apt *et al.*, 1995; Passaquet and Lichtle, 1995).

Die Methylierung verschiedener Motive innerhalb der Gene scheint für die Regulation der Genexpression in Reaktion auf Lichtveränderungen ebenfalls wichtig zu sein. Bei Dinoflagellaten z.B. wird die Lichtabsorption über zwei Hauptklassen von Proteinen ausgeführt, die Peridinin Chlorophyll *a* Proteine (PCPs) und die intrinsischen *a/c*-beinhaltenden lichtsammelnden Proteine (LHCs). Die Erhöhung der Transkriptmengen wird von der Abnahme der Methylierung der Motive innerhalb oder nahe der PCP- und LHC-codierenden Regionen begleitet (ten Lohuis and Miller 1998).

1.6.3. Biologische Rhythmen und biologische Zeitmessung

Sowohl Pflanzen als auch Tiere kennen die Uhrzeit auch ohne Armbanduhren (Sweeney, 1987). Dies kommt durch das universelle Phänomen der endogenen Uhr. Abhängig von der natürlichen Umgebungs-Periodizität zeigen Organismen eine Bandbreite von biologischen Rhythmen. Ein Rhythmus wird als selbsterhaltendes wiederholendes Fluktuationmuster definiert. Die Zeit, um einen Zyklus zu beenden, wird Periode genannt. Man klassifiziert verschiedene biologische Rhythmen: ultradian, circadian, infradian, circannual, etc (Piechulla, 1993).

Die Fähigkeit, kommende Ereignisse vorherzusehen, besonders sich wiederholende Änderungen mit 24 h oder jährlichen Perioden, ist anscheinend von Vorteil für das Überleben in einem natürlichen Umfeld, da der Mechanismus es den Organismen erlaubt, diese Veränderungen „vorherzusehen“. Endogene Rhythmen sind deshalb während der Evolution erhalten geblieben. Einer der zahlreichen Prozesse, der präzise endogen auf tägliches Timing bei Pflanzen kontrolliert werden muß, ist die Photosynthese (Piechulla *et al.*, 1998). Es ist daher nicht verwunderlich, daß die *Lhc* Genaktivität an eine biologische Uhr gebunden ist und einer circadianen Oszillation unterliegt (Piechulla 1999).

Untersuchungen zu diurnalen und/oder circadianen Expressionsmuster der LH Untereinheiten codierenden Gene sind für chromophytischen Algen selten und beschränken sich fast ausschließlich auf Daten über *Lhca* und *Lhcb* Gene der Höheren Pflanzen und Grünalgen.

Mittlerweile existieren einige Untersuchungen über die Expression von LHC I und LHC II der Höheren Pflanzen (Piechulla, 1993) und die diurnalen und circadianen LHC *a/b* mRNA Akkumulationsmuster bei Angiospermen sind gut dokumentiert (Prioul and Reys, 1987, Sheen, 1990).

1.7. Chromophytische Algen

1.7.1. Die Chromophyta (Heterokontophyta)

Im Angelsächsischen (chromophytes) wie auch im Deutschen ist der Oberbegriff Chromophyten bzw. Chromophyta als Sammelbezeichnung geläufig, unter der mehrere Algenklassen zusammengefaßt werden, welche offiziell zur Abteilung der Heterokontophyta gerechnet werden. In diesem Sinne werden die Begriffe Chromophyta und Heterokontophyta synonym verwendet. Ihren Namen verdankt die Abteilung der heterokonten Begeißelung ihrer Mitglieder. Die Abteilung enthält mindestens 9 Algenklassen. Eine von ihnen sind die Diatomeen (van den Hoek *et al.* 1993).

1.7.2. Die Bacillariophyceae (Diatomeen)

Die Diatomeen sind mit über 100.000 Arten in 200 Gattungen eine Gruppe äußerst formenreicher, mitunter zu Bändern oder Fächern vereinigter kokkaler Einzeller. Eine Sonderstellung nehmen sie durch den Besitz zweier innerhalb der äußeren Plasmamembranen abgelagerten Silikatschalen ein, von denen eine (Epitheca) wie der Deckel einer Schachtel über die untere Hälfte (Hypotheca) greift. Die Bacillariophyceae werden in zwei Ordnungen unterteilt: den Pennales und den Centrales (van den Hoek *et al.* 1993).

Die Chloroplasten der Diatomeen sind, typisch für chromophytische Algen, von vier Membranen umgeben und goldbraun gefärbt, weil die Chlorophylle *a* und *c* durch Fucoxanthin maskiert werden. Neben diesem Xanthophyll besitzen Kieselalgen noch Neofucoxanthin, Diadinoxanthin und Diatoxanthin. Charakteristisch sind auch die Dreierstapel der Thylakoide, wobei ein

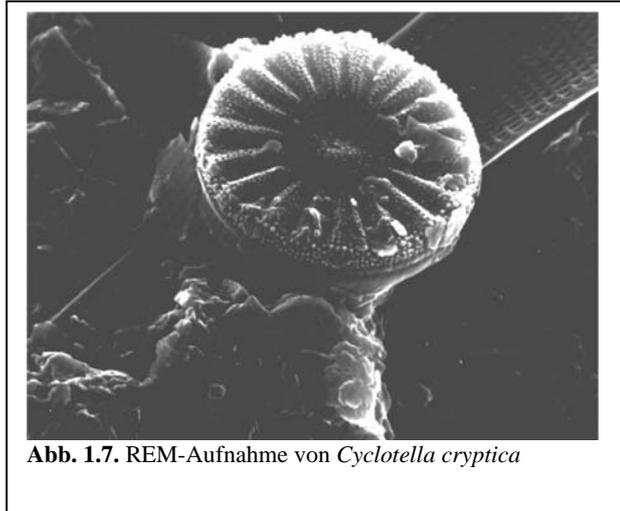


Abb. 1.7. REM-Aufnahme von *Cyclotella cryptica*

Dreierstapel in Form einer Gürtellamelle alle übrigen Dreierstapel umschließt (van den Hoek *et al.* 1993). *Cyclotella cryptica* (Abb. 1.7.) gehört zur Gruppe der Centrales.

1.7.3. Stand der Forschung über die Fcps von *Cyclotella cryptica*

In vorausgehenden Studien wurde festgestellt, daß sie mindestens 21 Gene (*fcp* Gene) enthält, die Fucoxanthin Chl *a/c* bindende Polypeptide (Fcps) codieren. Acht dieser Gene wurden kloniert und im Detail analysiert (Eppard and Rhiel, 1998; Eppard *et al.*, 1999, Eppard *et al.*, 1997). Die Existenz eines komplexen und heterogenen Antennensystems, ähnlich dem der Höheren Pflanzen, wurde durch eine phylogenetische Analyse von Lichtsammelproteinen bzw. deren Genen in *Cy. cryptica* gemacht (Eppard and Rhiel, 1998; Eppard *et al.*, 2000, Eppard *et al.*, 1997). Allerdings wurden bislang zu der Expression der *fcp* Gene bisher keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

1.8. Zielsetzung der Experimente

1.8.1. Charakterisierung der Transkriptgrößen der *fcp2*, *fcp4*, *fcp6* und *fcp12*

Zur genaueren Charakterisierung der untersuchten *fcp* Gene werden die unterschiedlichen Längen der Transkripte der *fcp* Gene der verschiedenen Cluster mittels Northern Blotting Experimenten ermittelt.

Um die Transkriptlängen der verschiedenen *fcp* Gene zu bestimmen, wird auf die Hybridisierungssignale der jeweiligen PCR amplifizierten Genfragmente der untersuchten Gene zurückgegriffen, die für die genspezifischen Sonden in der Hybridisierung der Blots genutzt werden. Durch den Einsatz der Sonden kann man bei der Hybridisierung von Northern Blots unterschiedliche Signale in den respektiven Bahnen beobachten, so daß im Zusammenspiel mit einem bekannten RNA Marker sich die jeweilige Transkriptgröße des von der Sonde angezeigten *fcp* Gens ungefähr bestimmen läßt. Ein Vergleich mit Ergebnissen von cDNA Klonen aus früheren Untersuchungen (Eppard *et al.*, 2000) wird Aufschluß über die Genauigkeit der Ergebnisse geben.

Das Charakterisieren der Transkriptgrößen liefert die ungefähre Basenanzahl der vier Gencluster, welche für Lichtsammelproteine kodieren: *fcp2*, *fcp4*, *fcp6* und *fcp12*.

1.8.2. Untersuchung des Einflusses der Lichtqualität und –quantität auf die Genexpression der *fcp* Gene *fcp2*, *fcp4*, *fcp6* und *fcp12*

Wie zuvor beschrieben hat das Licht einen signifikanten Einfluß auf die Expression der *Lhc* Gene der Höheren Pflanzen. Im Gegensatz zu den hierbei gewonnenen Erkenntnissen stehen nur wenige Informationen über den Einfluss von Licht auf die Expression von Genen, die für lichtsammelnde Proteine der chromophytischen Algen codieren, gegenüber.

Eine genauere Charakterisierung des Expressionsmusters der Gene *fcp1/2/3/5*, *fcp4*, *fcp6/7* und *fcp12* von *Cyclotella cryptica* könnte stellvertretend für die chromophytischen Algen darauf Hinweise geben, ob es ähnlich komplex verläuft wie das der Höheren Pflanzen.

Hierzu werden Kulturen unter verschiedenen Lichtregimen angezogen und aus ihnen mRNA isoliert.

Die Quantifizierung der steady state *fcp* mRNA Konzentrationen der jeweiligen Anzucht-Proben mit für die *fcp* Gene genspezifischen Sonden lassen dann Rückschlüsse auf die Expression der respektiven Gene zu.

Ähnlich wird bei Untersuchungen über den Einfluss der Lichtqualität/spektralen Zusammensetzung auf die Expression lichtsammelnder Polypeptide verfahren. Bei vielen

Arbeiten zu den Lhcs der Höheren Pflanzen hat sich gezeigt, daß die Proteine je nach Beleuchtung unterschiedlich stark ausgebildet werden. Die Lichtart, d.h. der Wellenlängenbereich scheint von entscheidender Bedeutung für die Zusammensetzung des Antennenkomplexes des Photosyntheseapparates zu sein. Neuere Forschungen lassen den Schluß zu, daß auch bei den Diatomeen die Fcps von dem eingestrahlt Licht in der Zusammensetzung der Antennenkomplexe beeinflußt werden. Daher werden Versuchskulturen unter Rot-, Grün- und Blaulicht im Vergleich mit Weißlicht-Kulturen angezogen.

1.8.3. Bestimmung der Expressionsrhythmen der *fcp* Gene *fcp2*, *fcp4*, *fcp6* und *fcp12*

Da sich ein Einfluß sowohl der Lichtqualität als auch der –quantität bei der Expression der untersuchten Gene beobachten läßt, liegt die Vermutung nahe, daß die Expression der Gene, die für die lichtsammelnden Proteine codieren, ähnlich wie bei den Höheren Pflanzen einem endogenen Rhythmus unterliegt.

Die Konzentration der mRNA der untersuchten Gene wird bei den Untersuchungen zur Lichtqualität und –quantität zum gleichen Tageszeitpunkt bestimmt und läßt sich daher vergleichen. Ob allerdings die mRNA Konzentration über den Tagesverlauf Schwankungen unterliegt, wird aus dem zuvorbeschriebenen Untersuchungen nicht deutlich. Daher wird die Aufnahme der mRNA Konzentrationen durch Beprobung über den gesamten Tagesablauf ausgeweitet.

Es ist zu vermuten, daß ähnlich wie bei den Photosynthese-Genen der Höheren Pflanzen, bei den *fcp* Genen von *Cyclotella cryptica* sich ein schwankendes/oszillierendes Muster der mRNA Konzentration über den Tagesverlauf einstellt und somit eine diurnale Expression auch der respektiven Gene bei *Cyclotella cryptica*.

2. Material & Methoden

2. Material und Methoden

Soweit nicht anders beschrieben, waren alle Reagenzien von analytischer Qualität und wurden von verschiedenen Quellen bezogen.

2.1. Stammkulturen und Wachstumsbedingungen:

Als Versuchsobjekt wurde die Diatomee *Cyclotella cryptica* verwendet, die als Reinkultur auf Schrägagar von der Stammsammlung für Algenkulturen (SAG: Strain no. 1070-1, Schlösser, 1994) in Göttingen erworben wurde. Die Anzucht der Stammkulturen erfolgte in einem beleuchteten und gekühlten *Gallenkamp Orbital Inkubator* unter einem 12 h Licht: 12 h Dunkelheit Regime bei 19°C entweder in Glasröhren (45 cm Länge, 4 cm Durchmesser, 400 ml Kulturvolumen) oder in Erlenmeyer Kolben (400-3000 ml Kulturvolumen). Die Lichtintensität betrug für die Stammkulturen 30 μM Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Lichtintensitäten wurden mit einem *Li-Cor LI-185B Quantum/Radiometer/Photometer* ausgerüstet mit einem *LI-192SB Underwater Quantum Sensor* gemessen und die Werte in μM Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angegeben. Als Medium wurde das *Cyclotella*-Medium verwendet. Das *Cyclotella*-Medium wurde nach Werner (1969) angesetzt und enthielt folgende Salze:

Salz	Stammlösung	ml/l
CaCl₂	0,055 mol/l	10
FeSO₄ x 7 H₂O + EDTA	0,25 mol/l	1
KNO₃	1 mol/l	10
MgSO₄ x 7H₂O	0,055 mol/l	10
NaCl	3,56 mol/l	14
NaH₂PO₂ x H₂O + Na₂HPO₂, x H₂O	51,7 + 3,72 g/l	10
NaSiO₃ x H₂O	1g/l	10
Spurenelementlg I SE I	Die Zusammensetzungen dieser Lösungen finden sich im Chemikalienverzeichnis	1
Spurenelementlg II SE II		1
Vitaminlösung		0,2



Gallenkamp Orbital Inkubator mit *Cyclotella cryptica* Flüssigkulturen in den Glasröhren

Die Stammkulturen von *Cyclotella cryptica* wurden mit einer Aquariumpumpe mit gefilterter Luft versorgt (Luftfilter *Satorius AG Midisart 2000 Venting Filter sterile-EO, non pv, PIFE-membrane, Porengröße 0,2 µm*). Die Luftfilter wurden mit jedem neuen Ansatz ausgetauscht. Um Auswirkungen durch Effekte wie Nährstoffmangel zu vermeiden, wurden die Kulturen innerhalb von zwei Wochen nach dem letzten Überimpfen in frisches Medium gerettet und aufgearbeitet. Diese Kulturen befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase, was durch Zellzahlbestimmung bestätigt werden konnte (**Abb. 2.1.1.**).

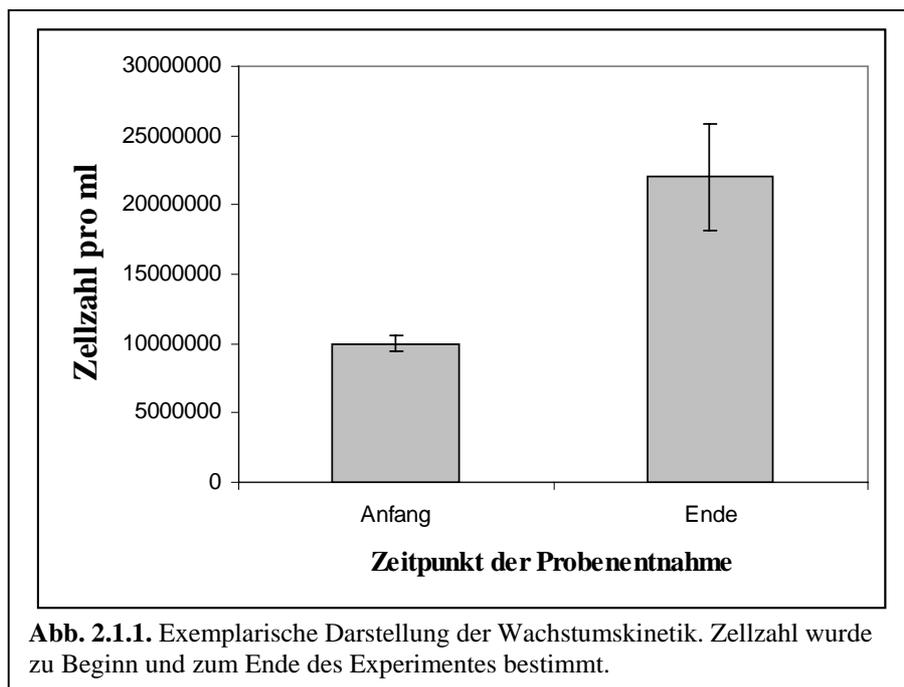


Tabelle 2.1.1.

	<i>Versuchsbeginn</i>	<i>Versuchsende</i>
Zellzahl (+/- Standardabw.)	11 x 10 ⁶ +/- 0,59 x 10 ⁶	22 x 10 ⁶ +/- 3,9 x 10 ⁶

Diese Daten stammen aus den Experimenten zur diurnalen Rhythmik. (sh. 2.4.). Die Zellzahl verdoppelte sich im Verlauf dieses Experimentes von 1,1 x 10⁷ Zellen/ml auf 2,2 x 10⁷ Zellen/ml (Abb. 2.1.1.). Diese Zunahme der Zelldichte war im Hinblick auf unerwünschte Nebeneffekte wie Wachstumslimitierung durch Nährstoffmangel zu vernachlässigen. In fast allen Versuchen zeigte sich nur eine geringe Zunahme der Zellzahl über die jeweilige Versuchsdauer, bzw. ein leichter Rückgang der Zellzahl bei den Untersuchungen zur circadianen Rhythmik. Bei einer weiteren Untersuchung der Gesamtzellzahlen über einen Zeitraum von 21 Tagen zeigte sich eine Verringerung der Zellzahlen (Tab. 2.1.2.).

Tabelle 2.1.2.

	<i>Versuchsbeginn</i>	<i>Versuchsende</i>
Zellzahl (+/- Standardabw.)	10,1 x 10 ⁶ +/- 0,12 x 10 ⁶	7,6 x 10 ⁶ +/- 0,49 x 10 ⁶

Diese Abnahme der Zellzahl war allerdings sehr gering und fiel nicht ins Gewicht. Im Gegenteil: diese Daten zeigten, daß die Organismen im Kulturansatz sich hier in der stationären Phase ihres Vermehrungszyklusses befanden und auch bei diesem Versuch ein Vergleich der Expressionraten möglich war.

2.2. Anzucht und Beprobung für Lichtquantitäts-Experimente

In den Lichtintensitäts-Experimenten wurden die Zellen 7-14 Tage lang in einem 12 h Licht: 12 h Dunkelheit Regime entweder unter schwachem Weißlicht (LL) oder starkem Weißlicht (HL) kultiviert. Die Lichtintensität betrug für LL 30 µM Photonen m⁻² s⁻¹ und 200 µM Photonen m⁻² s⁻¹ für HL Bedingungen.

2.3. Anzucht und Beprobung für Lichtqualitäts-Experimente

In den Lichtqualitäts-Experimenten wurden die Kulturen in Glassröhren (400 ml Kulturvolumen), die mit Kunststoff-Farbfolien abgedeckt waren, angezogen. Die spektralen Charakteristiken der Farbfiler wurden durch Aufnahme von Absorptionsspektren zwischen 340 nm und 740 nm mit einem *Hitachi U3000 Spektrophotometer* bestimmt. Ihre Absorptionsspektren sind in den Abbildungen 2.3.1., 2.3.2. und 2.3.3 dargestellt..



Abb. 2.3.1. Absorptionsspektrum des Rotlicht-Filters

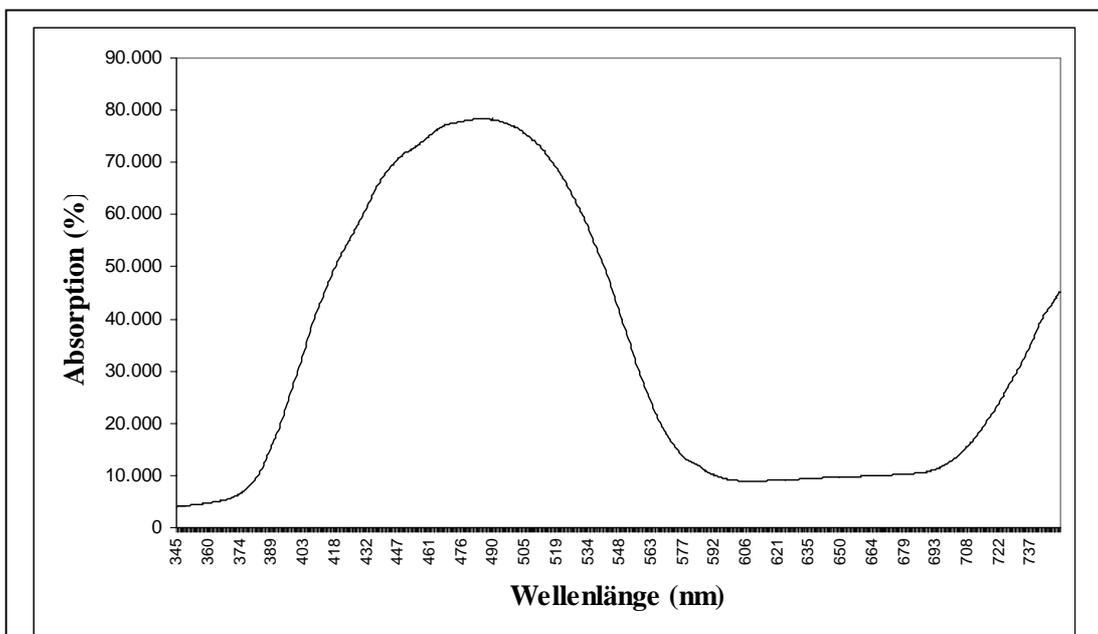


Abb. 2.3.2. Absorptionsspektrum des Blaulicht-Filters

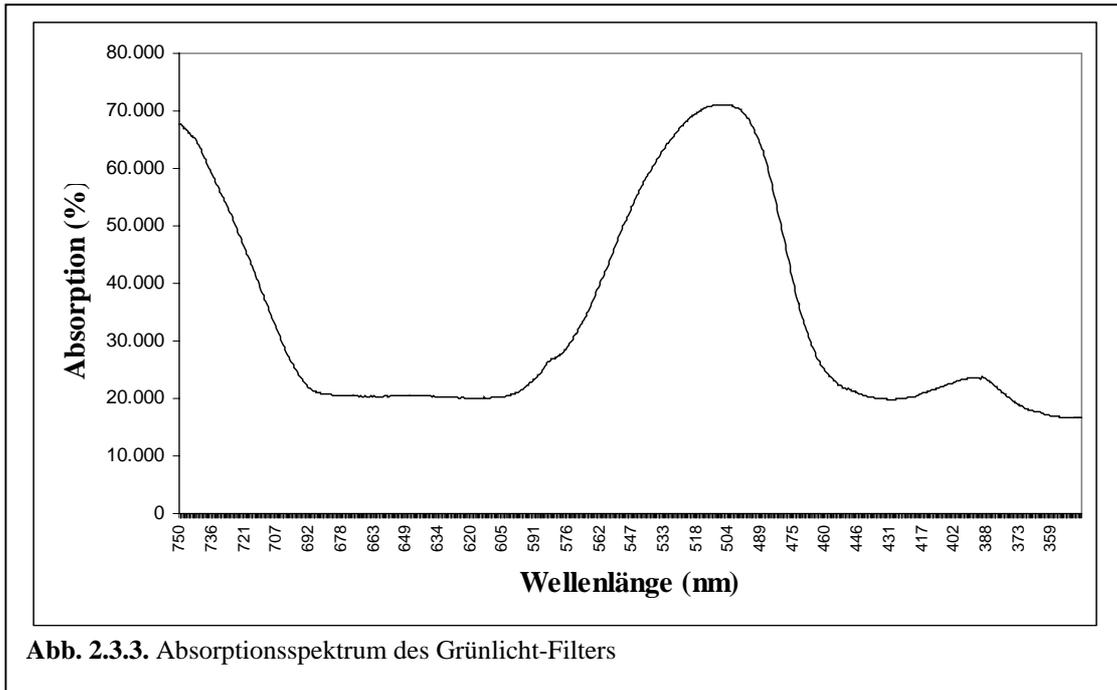


Abb. 2.3.3. Absorptionsspektrum des Grünlicht-Filters

Die Lichtintensität für die Rotlicht-, Blaulicht- und Grünlicht-Anzuchten von *Cyclotella cryptica* wurde bei allen Experimenten auf das gleiche Niveau von $30 \mu\text{M Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gesetzt. Ein 12 h Licht: 12 h Dunkelheit Regime wurde angewendet. Zur Kontrolle wurden einige Kulturen unter schwachem Weißlicht ($30 \mu\text{M Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogen. Nach 7 Tagen wurden die Zellen am achten Tag ca. 5 Stunden nach Beginn der Beleuchtung geerntet und aus ihnen Gesamt-RNA isoliert.

2.4. Anzucht und Beprobung für Weißlicht-Experimente zu diurnalen Expressionsmuster

Im ersten Satz der Weißlicht Experimente wurde das diurnale Expressionsmuster des *fcp2* Gens untersucht. Die Kulturen wurden in Erlenmeyer Kolben (3000 ml Kulturvolumen) unter einem Licht : Dunkel Regime von 12 h : 12 h angezogen. Die Lichtintensität betrug $30 \mu\text{M Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Kulturen wurden von 9:00 Uhr bis 21:00 Uhr beleuchtet und von 21:00 Uhr bis 9:00 Uhr im Dunkeln angezogen. Proben (jede 400 ml Kulturvolumen) wurden um 8:00, 9:00, 12:00, 14:00, 20:00, 21:00 und 3:00 Uhr entnommen, die Zellen durch Zentrifugation geerntet, und anschließend bei -70°C gelagert. In weiteren Experimenten wurde der Licht-Dunkel Zyklus invertiert, d.h. die Kulturen wurden von 21:00 bis 9:00 Uhr beleuchtet und lagen von 09:00 bis 21:00 Uhr im Dunkeln.

2.5. Anzucht und Beprobung für Untersuchungen zur circadianen Expressionsrhythmik

Bei den Untersuchungen zur Expressionsrhythmik wurde *Cyclotella cryptica* in den zuvor beschriebenen Glasröhren unter einem 12 h Licht: 12 h Dunkelrhythmus angezogen, entsprechend der Bedingungen zu den Experimenten zum diurnalen Expressionsmuster. Die Lichtintensität betrug $30 \mu\text{M Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für die Untersuchung der Expression von *fcp2* und *fcp4* und ungefähr $250 \mu\text{M Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für die Expressions-Experimente von *fcp6/7* und *fcp12*. Die Kulturen wurden von 9:00 Uhr bis 21:00 Uhr beleuchtet und lagen von 21:00 Uhr bis 9:00 Uhr im Dunkeln. Die Kulturen wurden 7 Tage lang unter diesen Bedingungen vorkultiviert. Am Ende des ersten Probenentnahme-Tages wurden die Kulturen für weitere drei Tage unter einem Dauer-Dunkel Regime weiter angezogen. Proben von je 150ml Kulturvolumen wurden um 7:00, 9:00, 14:00, 19:00, 21:00 und 2:00 Uhr über den Zeitraum von drei Tagen entnommen. Am vierten Tag unter Dauerdunkel wurden die letzten Proben um 7:00, 9:00, 14:00 und 19:00 Uhr entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, und anschließend bei -70°C gelagert.

2.6. Zellernte

Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einer *Sorvall RC5B Kühlzentrifuge* unter Verwendung eines *Sorvall A6/14 Rotors* geerntet. Zur RNA-Isolation wurden je nach Versuchsansatz 150 – 300 ml Kultur entnommen und sofort 20 Minuten bei 13.000 rpm in der Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in einem verringerten Volumen des Mediums resuspendiert, in ein Falconröhrchen überführt und nochmal 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die verbleibenden jeweiligen Zellpellets wurden entweder sofort zur RNA Isolation aufgearbeitet oder bei -70°C eingefroren. Im allgemeinen wurden die Versuche jeweils in drei Ansätzen bei gleichen Bedingungen gemacht und wenigstens einmal mit neuem Kulturmaterial wiederholt.

2.7. Spektroskopie

Die Untersuchung der Expressionsraten der Gen-Familie von *fcp1*, *fcp2*, *fcp3* und *fcp5* auf RNA-Ebene würde sehr komplexe und komplizierte Prozesse beinhalten. Es stellte sich die Frage, ob schon mit einfacheren Methoden Unterschiede in den Pigmentkonzentrationen der Anzuchten zu erkennen waren und diese Rückschlüsse auf die Expressionsraten der jeweiligen Anzucht zuließen. Dazu diente die Aufnahme von Absorptionsspektren. Absorptionsspektren von Kulturen mit ungefähr gleicher Zelldichte (OD), die unter unterschiedlichen Beleuchtungsbedingungen angezogen worden waren, wurden mit einem *Hitachi U-3000* Spektrophotometer aufgenommen. Anhand der Maxima in den Spektren konnten Rückschlüsse auf die mengenmäßige Verteilung an *Chl a*, *Chl c* und Carotinoiden gezogen werden (Hust, 1999).

Die spektrometrische Untersuchungen wurden an Proben aus der Anzucht unter Rotlicht/Blaulicht/Grünlicht/schwachem Weißlicht (RL/BL/GL/LL) vor der RNA-Isolation (2.8.) am Ende der Anzucht durchgeführt.

2.7.1. in vivo-Absorptionsspektroskopie ganzer Zellen

Einige ml *Cyclotella*-Kultur wurden aus den Rotlicht-, Blaulicht-, Grünlicht- und Schwachlicht-Anzuchten vor der RNA-Isolation am Ende der Kultivierung entnommen. 1 ml der Proben wurde unbehandelt für die Aufnahme von Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 340 nm bis 740 nm (*Hitachi U-3000 Spectrophotometer*) (3.1.1.) eingesetzt. Die Bandbreite war auf 2 nm gesetzt und die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 300 nm/min. Als Referenz diente *Cyclotella*-Medium.

2.7.2. Absorptionsspektroskopie von Pigmentextrakten

Pigmentextrakte sollten nach der Aufnahme der Absorptionsspektren ganzer Zellen ein genaueres Bild über die mengenmäßige Verteilung der Pigmente liefern. Dazu wurden Proben von je 5 ml aus den Kulturen entnommen und die Zellen durch Zentrifugation bei 13.000 upm für 5 Minuten geerntet. Anschließend wurden die Zellpellets mit Aceton versetzt, um die Zellhülle zu zerstören und den Zellinhalt freizusetzen, und zentrifugiert. Dadurch wurden die Pigmente der Zellen freigesetzt. Die Absorptionsspektren der Acetonextrakte sind im Ergebnisteil zu finden (3.1.2.).

Absorptionsspektren der Pigmentextrakte wurden im Bereich von 340 bis 740 nm mit einem *Hitachi U-3000 Spektrophotometer* aufgenommen. Die Bandbreite war auf 2 nm gesetzt und

die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 300 nm/min. Die Referenzküvette enthielt 90% Aceton. Bei der Auswertung der Spektren wurden außerdem die Verhältnisse von Chlorophyll *a* zu Chlorophyll *c*₁+*c*₂ zueinander bei den verschiedenen Anzuchten über die Gleichungen von Jeffrey & Humphrey (1975) bestimmt:

$$c[Chla] = 11,47 \cdot (E_{664} - E_{720}) - 0,4 \cdot (E_{620} - E_{720})$$

$$c[Chlc] = 24,36 \cdot (E_{630} - E_{720}) - 3,73 \cdot (E_{664} - E_{720})$$

E Extinktion bei der jeweiligen Wellenlänge

Anhand dieser Werte kann man erkennen, ob sich bei den unterschiedlichen Anzuchten die Pigmentverhältnisse unterscheiden.

2.7.3. Tieftemperatur-Fluoreszenzspektroskopie ganzer Zellen

Proben von je 1 ml Volumen wurden bei Abschluß der Anzucht von *Cyclotella cryptica* unter Rotlicht, Blaulicht, Grünlicht (sh. 2.5.), sowie einer Schwachlicht bestrahlten Kultur (sh. 2.4.), den Kulturen entnommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Danach wurden die tiefgefrorenen Proben an dem Lichtleiter eines *Fluoreszenzphotometers Hitachi F-4500* platziert. So präparierte Proben wurden mit drei verschiedenen Anregungs-Wellenlängen (440 nm, 460 nm, 500 nm) bestrahlt und die jeweiligen Emissionsspektren aufgenommen. Die Emission wurde in einem Bereich von 650 nm bis 750 nm gemessen. Die sich ergebenden Spektren sind im Ergebnisteil zu finden (3.1.3.).

2.8. RNA Isolation

Die RNA-Isolation aus den abzentrifugierten Zellen wurde in Anlehnung an das Protokoll von Sambrook *et al.* (1989) ausgeführt.

Die eingefrorenen Zellpellets wurden in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser überführt und mit je 2 ml Guanidiumthiocyanat-Lösung (4 M Guanidiniumthiocyanat, 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,5 % Sodium Lauryl Sarcosinat, 0,1 % DEPC (Diethylpyrocarbonat)) und 20 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Die Pellets wurden zermahlen, und in Abständen mit flüssigem Stickstoff übergossen. Die Proben wurden mit der Pistille solange gemahlen, bis sie die Konsistenz einer „feinen Staubschicht“ hatten. Danach wurden noch einmal 8 ml Guanidiumthiocyanat und 80 µl β-Mercaptoethanol hinzugegeben.

Die Extrakte wurden nun in 10 ml Spritzen mit Kanülen aufgezogen und die DNA geschert. Die Lysate wurden in neue Falcon-Röhrchen überführt und 6 Minuten bei 5000 upm in einer *Beckman Model TJ-6 Centrifuge* zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Falcon-Röhrchen überführt und erneut 6 Minuten bei 5000 upm zentrifugiert. Diese Überstände wurden bei der anschließenden Ultrazentrifugation eingesetzt. Zuerst wurden die Ultrazentrifugenröhrchen mit 3,5ml CsCl-Lösung (96 g CsCl auf 90 ml 0,01 M EDTA pH 7,5, 0,1% DEPC) beladen, danach mit den Probenlysaten überschichtet. Die Röhrchen wurden austariert, in einen SW-40 Rotor gehängt und in einer *Beckman L8-M Ultracentrifuge* 24 Stunden bei 32.000 upm und 4°C zentrifugiert (Isopyknische Ultrazentrifugation im CsCl-Dichtegradienten).

Nach der Zentrifugation wurden die Überstände der Röhrchen mit einer sterilen Pipette entfernt, bzw. abgegossen und die RNA-Pellets zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,1% DEPC) mit 0,1% SDS gelöst und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Böden der Ultrazentrifugenröhrchen wurden mit 200 µl TE-Puffer ohne SDS gespült und diese anschließend mit dem zuvor gewonnenen 200 µl RNA-Isolaten vereinigt. Zum Fällen der RNA wurden zu den RNA-Isolaten jeweils 30 µl 3 M Natrium-Acetat und 0,9 ml eisgekühlter Ethanol (reinst.) hinzugefügt. Die RNA-Isolate wurden bei -20°C über Nacht aufbewahrt.

Am folgenden Tag wurden die RNA-Isolate für 10 Minuten bei 13.000 upm bei 4°C zentrifugiert. Die resultierenden RNA-Pellets wurden zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und dann in der *Speed Vac* getrocknet. Die getrockneten RNA-Pellets wurden in je 400µl DEPC-Wasser gelöst.

2.9. Quantifizierung der isolierten Gesamt RNA

Die Konzentration an isolierter RNA wurde mit einem *Hitachi U-3000 Spectrophotometer* durch Absorptionsmessung in einem Bereich von 240 bis 340 nm bestimmt. Hierbei sind die Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm für die Bestimmung der Konzentration am Wichtigsten. Der Wert bei 260 nm erlaubt die Berechnung der Konzentration der Nukleinsäure, wobei eine Extinktion von 1 (260 nm) \approx 40 µg RNA/ml entspricht. Das Verhältnis der Werte: Extinktion (260 nm) und Extinktion (280 nm) erlaubt eine grobe Schätzung über die Reinheit der Nukleinsäuren. Reine Aufarbeitungen von RNA haben eine OD_{260}/OD_{280} von ungefähr 2,0 (Sambrock *et al.*, 1989). Wenn die Aufarbeitung durch Proteine oder Phenol verunreinigt ist, wird der OD_{260}/OD_{280} Wert signifikant geringer ausfallen und eine Quantifizierung der Gesamt-RNA unmöglich machen. Um eine hohe

Reinheit der Aufarbeitungen zu garantieren, wurden Aliquots der Aufarbeitungen in Formaldehydagarose Gelen qualifiziert und alternative Methoden der RNA Isolation wurden außerdem angewandt, um den Grad der Reinheit zu erhöhen (sh. **2.10.**). Darüber hinaus wurde die Reinheit einiger Proben noch über RT-PCR Amplifizierung überprüft (sh. **2.17.**)

Die isolierte RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.10. Alternative Isolation der Gesamt RNA mit NucleoSpin RNA II

Da die Isolation der Gesamt RNA mittels CsCl Dichtegradienten Zentrifugation nach Sambrook (1989) sehr material- und zeitaufwendig ist, wurde über eine alternative Methode zur RNA Isolation nachgedacht. Eine Möglichkeit bot hier die Benutzung von Kits mit Fertiglösungen und speziellen Filtersystemen/Silikatmembranen. In dieser Untersuchung wurde auf das *NucleoSpin RNA II Kit* (Macherey, Nagel, Düren, Germany) zurückgegriffen. Hier werden die geernteten Zellen durch Inkubation in einer Lösung mit großen Mengen chaotropischen Ionen lysiert. Dies spart das mühevoll Mörsern der Zellpellets von geernteten Zellen. Bei dieser Art der Aufarbeitung wurden 10 – 30 mg geerntete Zellmasse eingesetzt. Laut Hersteller waren etwa zwischen 15 bis 20 μg Gesamt-RNA in einem Volumen von etwa 40 μl Lösung zu erwarten. Die Konzentration der hier isolierten RNA wurde wie nach **2.9.** bestimmt.

2.11. Agarose Gel Elektrophorese und denaturierende Formaldehyd-Agarose Gel Elektrophorese

Aliquots von PCR-Ansätzen (Sondensynthese, siehe **2.15.**) und RT-PCR Reaktionen (**2.17.**) wurden über 1.5% (w/v) Agarose Gele in TAE Puffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH 8) überprüft. Die Aliquots wurden mit einem halben Volumen Ladepuffer (10% Glycerin, 250 $\mu\text{g/ml}$ Xylencyanol, 250 $\mu\text{g/ml}$ Bromphenolblau) versetzt. Als Größenmarker wurde mit der Restriktions-Endonuklease PstI geschnittene λ -DNA eingesetzt. Die Elektrophoresen dauerten ca. 2 Stunden bei 6 V/cm. Anschließend wurden die Gele für 30 Minuten in TAE-Puffer mit Ethidiumbromid (10 μl einer 10 mg/ml Lösung zu 300 ml TAE Puffer) auf einem Schüttler gefärbt. Die Gele wurden abschließend auf einem UV-Illuminator ausgewertet.

Bei den denaturierenden Formaldehyd Gelen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) verfahren. Ein Gel setzte sich aus 1,5% Agarose (3,75 g), 5 ml 10x HEPES/EDTA (500 mM HEPES, 0,5 mM EDTA), 37 ml dH_2O und 8 ml 37% Formaldehyd zusammen. Die Lösung wurde erhitzt und dann im Wasserbad auf 65°C abgekühlt. Der Laufpuffer für die Gelelektrophorese

bestand aus 40 ml 10x HEPES/EDTA, 64 ml Formaldehyd (37%) und 296 dH₂O. Als Marker dienten 2 µl RNA Marker der Firma SIGMA (Product No. R7644), der mit 3 µl Proben-Puffer (50% Formamide (500 µl), 16% Formaldehyd (min. 37%) (160 µl), 10% HEPES/EDTA (100 µl), 10% Glycerol (100 µl), Xylencyanol (Stammlsg.: 10 mg/ml) (25 µl), Bromphenolblau (Stammlsg.: 10 mg/ml) (25 µl), Ethidiumbromid (Stammlsg.: 10 mg/ml) (10 µl) und 80 µl dest. Wasser) versetzt wurde. Die Gele wurden abschließend auf einem UV-Illuminator ausgewertet.

2.12. Northern Blotting Experiment

Northern Blotting beschreibt den Prozeß, bei dem RNA aus einem Formaldehydgel auf eine Nitrocellulose- oder Nylon-Membran übertragen wird. In den folgenden Experimenten wurde *PALL BIODYNE® PLUS MEMBRANE (Rating .45µ)*-Nylon-Membran (Pall Gelman Laboratory, USA) verwendet. Ursprünglich wurde für die weitere Bearbeitung der Gele, bzw. der Übertragung der RNA auf eine Nylon-Membran, eine Membran vom Typ *Qiabrane Nylon Membran* der Firma Qiagen verwandt. In Versuchen von Hust (1999) zeigte sich, daß die Verwendung der PALL-Membran bei der Hybridisierung von *Cyclotella*-RNA zu zufriedenstellenden Ergebnissen führte. Daher wurden die PALL-Membranen auch bei den hier beschriebenen Versuchen verwandt. Hierbei wurden RNA-Proben von 5-10 µg in einem Formaldehydgel aufgetrennt. Dieses Gel wurde dann in eine Eigenbau-Northern Blotting Anlage eingebracht. Das Northern Blotting begann mit der Reinigung der Anlage. Die Northern Blottingkammer wurde vor Benutzung mit 200 ml 0,5% SDS-Lösung gespült. Anschließend wurde die Kammer mit dH₂O nachgespült. Dann wurden 300ml 3% H₂O₂ Lösung in die Kammer gegeben und 10 Minuten einwirken gelassen. Abschließend wurde die Kammer mit 0,1% DEPC-Wasser nachgespült. Währenddessen wurde das Gel zweimal kurz mit destilliertem Wasser und zweimal für 20 Minuten in 20X SSC (3 M NaCl, 300 mM NaCitrat, pH 7,0) gespült. Das Gel selbst wurde markiert, indem man ein Stück der unteren rechten Ecke des Gels mit einem Skalpell abtrennte. Dies geschah, damit die Seiten des Gels später nicht verwechselt wurden. Danach wurde der Plastikblock der Anlage auf den Boden der Kammer gelegt. Ein großes GB-002 Papier (Schleicher & Schuell) wurde über den Block gelegt und die Enden des Papiers abgeknickt, so daß sie später in den SSC-Puffer eintauchten, der in die Wanne gefüllt wurde. Auf dieses GB-002 Papier wurde ein weiteres gelegt, welches von seinem Ausmaße etwas größer als das zu untersuchende Gel war. Parafilmstreifen wurden so auf das Papier gelegt, daß die Ränder abgedeckt waren. Dies sollte verhindern, daß der Puffer am Gel vorbeigesaugt wurde. Das Gel wurde auf dem GB-002-Papier plaziert, mit den

Rändern auf dem Parafilm. Darauf wurde die Nylon-Membran gelegt. Es wurde darauf geachtet, daß keine Luftblasen zwischen Gel und Membran auftraten. Darüber wurden dann noch einmal zwei GB-002-Papiere von der Größe der Membran gelegt. Auf diesen soweit fertigen Block wurde eine etwa 8 cm dicke Lage von saugfähigem Papier gelegt. Hierfür wurden Papiertücher verwendet. Der Deckel der Anlage wurde aufgelegt und dieser mit einem 2 kg schwerem Gewicht beschwert. Abschließend wurde die Wanne der Anlage mit 400 ml 20x SSC-Puffer gefüllt. Die Anlage wurde zwischen 15-18 Stunden in diesem Zustand belassen. Danach wurde die Nylon-Membran mit Kugelschreiber markiert, damit Ober- und Unterseite nicht verwechselt werden konnte. Die Membran wurde zwischen zwei GB-002-Papieren luftgetrocknet und anschließend die transferierte RNA durch Backen über 2 Stunden bei 80°C an der Membran fixiert. Diese Methode erwies sich im Verlauf der Arbeit als die unzuverlässigste der Blotting-Methoden. Die Ergebnisse waren nur selten auszuwerten.

2.13. Turboblotting

Das Turboblotting stellt eine alternative Methode zum herkömmlichen Southern und Northern Blotting dar. Das Turboblotting wurde nach der Anleitung für *TURBOBLOTTER Rapid Downward Transfer Systems (Schleicher & Schüll)* durchgeführt.

Im Gegensatz zum Northern Blotting wurde beim Turboblotting das Gel nicht mit einem zusätzlichen Gewicht belastet und somit nicht mit Gewalt auf die Membran gepreßt. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde die Turboblotanlage vorbereitet. Die Anlage wurde zuerst mit 200 ml 0,5% SDS-Lösung gespült. Anschließend wurde die Kammer mit dH₂O nachgespült und mit Ethanol getrocknet. Nach dem Trocknen wurde 300ml 3% H₂O₂ Lösung für 10 Minuten in die Anlage gegeben. Abschließend wurde die Kammer mit 0,1% DEPC-Wasser nachgespült.

Das Gel wurde vor dem Einbringen in die Anlage zweimal 5 Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen, um eine niedrige ionische Bedingung beizubehalten. Als nächste wurde die Nylon-Membran in 20x SSC Transferpuffer für 5 Minuten voreingeweicht. Das 'Stack Tray' wurde auf der Arbeitsfläche positioniert und 20

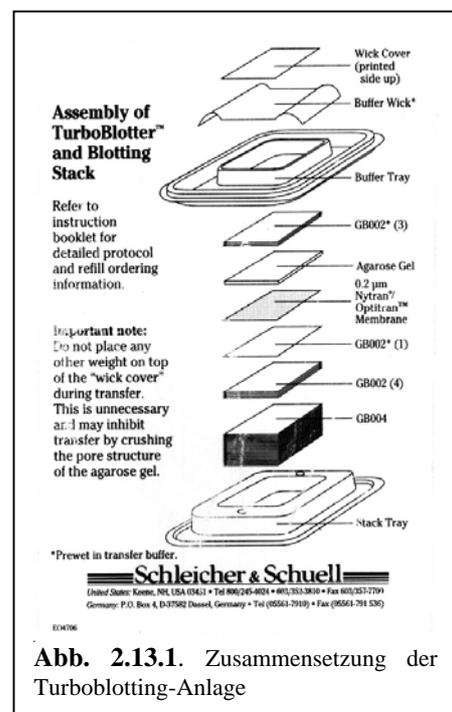


Abb. 2.13.1. Zusammensetzung der Turboblotting-Anlage

Stück GB004-Papiere auf die Basisplatte gelegt. Darauf wurden 4 GB002-Papiere gelegt. Ein GB002-Papier wurde dann in 20X SSC angefeuchtet und anschließend auf den Stapel gelegt. Auf den Stapel wurde die Nylon-Membran positioniert. Hierauf wurde das Gel mit den RNA-Proben gelegt. Abschließend wurden 3 in 20x SSC getauchte GB002-Papiere auf den Stapel gelegt. Das obere Teil der Anlage wurde auf die soweit fertige Anlage gestellt und das Buffer Wick (ebenfalls mit dem Transferpuffer getränkt) bildete das letzte Papier, das auf den Stapel gelegt wurde. Als Gewicht diente das Wick Cover. 125 ml 20X SSC Transferpuffer wurden als letzter Schritt in die Anlage eingefüllt. Der Transfer begann mit diesem Schritt und dauerte 2-3 Stunden. Nach der Anleitung darf diese Prozedur auch kürzer gehalten werden (30 Minuten Minimum), je nach Dicke des Gels, doch zur Sicherheit wurden die Gele länger aufgelegt, um einen ausreichenden Transfer zu gewährleisten. Danach wurde die Nylon-Membran neutralisiert (vorsichtig 5 Minuten in 2X SSC Transferpuffer gewaschen) und abschließend 2 Stunden bei 80°C zur Fixierung der RNA gebacken. Die fertige Nylon-Membran konnte mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Diese Methode war wesentlich verlässlicher und schneller als das Northern Blotting (2.12.). Die Ergebnisse waren eindeutiger und besser auszuwerten als die des Northern Blottings.

2.14. RNA Dot Blotting

Das Dot Blotting verläuft nach dem *DIG System User's Guide for filter Hybridization*, Boehringer Mannheim.

Für die RNA Dot Blotting Experimente wurden entweder 2 µg oder 5 µg der Gesamt RNA der verschiedenen RNA Proben genutzt. Die Proben wurden in 400 µl Formaldehyd Puffer (DEPC-treated H₂O: 20 x SSC [3 M Natrium Chlorid, 300 mM Natrium Citrat pH 7.0]: Formaldehyd, im Verhältnis 5:3:2) gelöst, auf 68°C für 10 min erhitzt, anschließend sofort mit Eis gekühlt und auf trockene Nylon Membran (*Biodyne Plus Nylon Membrane*, Pall Gelman Laboratory, USA) mit einem *Mini-fold I Dot-blot System* (Schleicher & Schnell, Dassel, Germany) mit *Eppendorf-Pipetierhilfen* (400µl Proben-Puffergemisch pro Dot) aufgetragen. Abschließend wurde die RNA durch das Backen der Membran für 2 h bei 80°C fixiert.

Das Dot Blotting hatte den Vorteil, daß es nur geringe Mengen an RNA-Material benötigte. So konnten gute Ergebnisse mit wenig Aufwand produziert werden. Darüber hinaus war der Prozeß des Dot Blottings der zeitsparendste der hier aufgeführten Blotting-Methoden.

2.15. Sondensynthese

Zur Herstellung genspezifischer Sonden wurden die cDNA Klone, welche die Gene *fcp2*, *fcp4*, *fcp6* und *fcp12* von *Cyclotella cryptica* beinhalten (EB1 genebank library accession numbers AJ000545 [*fcp2*], AJ005838 [*fcp4*], AJ000968 [*fcp6*] and AJ005839 [*fcp12*]), als Templates genutzt. Dabei wurden definierte DNA-Abschnitte mittels dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Boehringer Mannheim, Germany) nach den Angaben des Herstellers mit genspezifischen Primern amplifiziert.

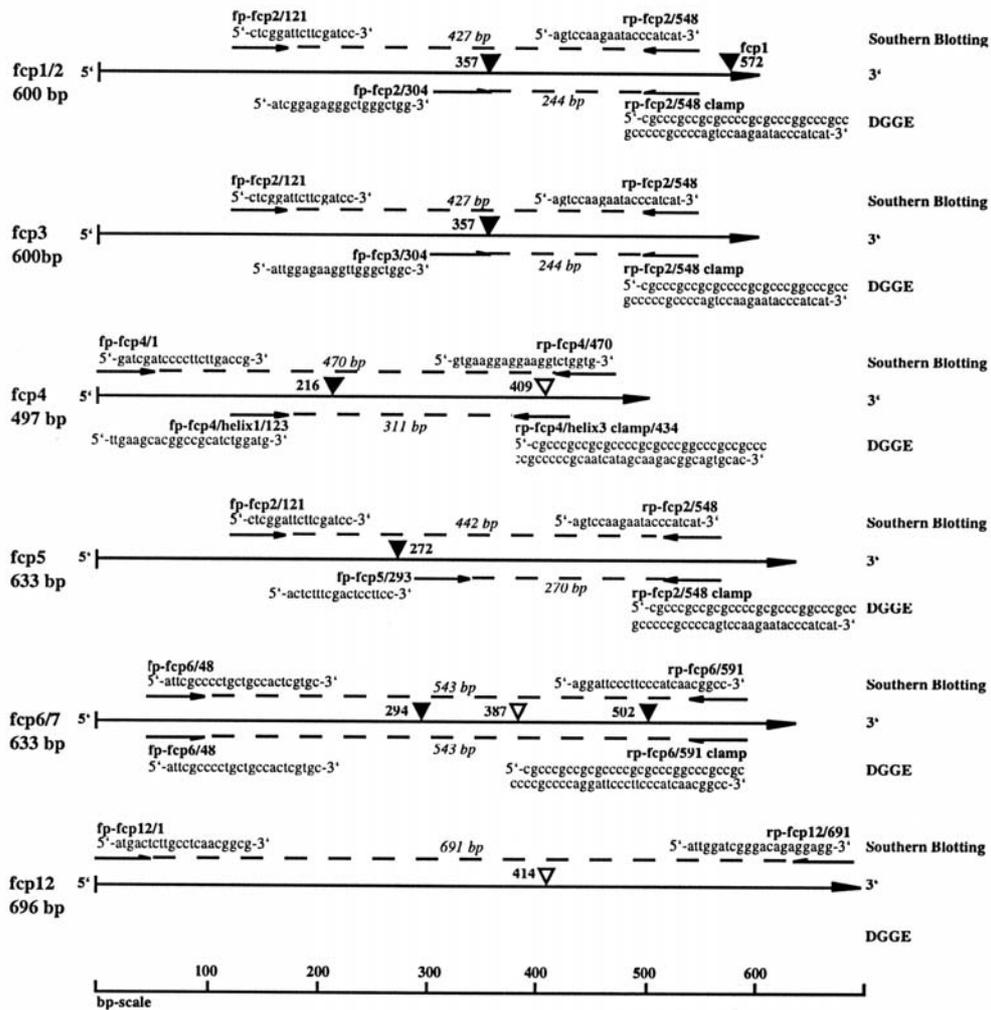
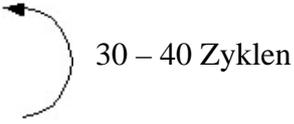


Abb. 2.15.1. Schematische Darstellung der *fcp* Gene und Nomenklatur, Nucleotidsequenzen, Positionen und Orientierungen der genutzten Primer. (Quelle Eppard and Rhiel, 2000)

Nachfolgend findet sich das PCR-Protokoll für die Herstellung der Sonden. Hierbei wurde den Empfehlungen des *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Boehringer Mannheim, Germany) gefolgt. Als Gerät wurde ein *Hybaid OmniGene PCR Cycler* genutzt:

- Denaturierung der DNA bei 95°C, 3:00 Minute
 - 95°C, 0:45 Minuten (Schmelzen)
 - *°C, 1:00 Minuten (Annealing der Primer)
 - 72°C, 1:30 Minuten (Synthese)
 - 95°C, 0:45 Minuten
 - *°C, 1:00 Minute
 - Restsynthese bei 72°C, 10 Minuten
- 

*jeweilige Annealing-Temperatur der eingesetzten Primerkombination

Die PCR-Ansätze dienen als Basis für die Sondenlösungen. Je 20 µl der PCR-Ansätze wurden in 20 ml *DIG Easy Hyb* gelöst. Anschließend wurde die Lösung 5 Minuten bei 95°C erhitzt und danach im Eisbad abgekühlt. Damit war die Herstellung der *fcp*-Sonden abgeschlossen. Die Sonden wurden bei -20°C aufbewahrt. Vor der Benutzung wurden die Sondenlösungen aufgetaut und 10 Minuten auf 68° erhitzt, um die DNA erneut zu denaturieren.

Die Quantifizierung der steady state mRNA Mengen durch Northern Blotting oder RNA Dot Blots bedarf eines Vergleiches mit einer gleichen Ladung, z. B. mit rRNA oder Rehybridisierung mit einer rDNA Sonde oder mit einem anderen Gen, welches man als Standard nutzen kann. Daher wurde ein 750 bp Fragment der 18S rDNA Gene von *Cyclotella cryptica* aus chromosomaler DNA durch eine PCR unter Verwendung des forward primer **Uni1055F** (5'-GGT GGT GCA TGG CCG-3') und des reverse primer **Uni1750R** (5'-ATC CTT CTG CAG GTT CAC C-3') amplifiziert. Das Fragment wurde ebenfalls mit dem *PCR DIG Probe Synthesis Kit* hergestellt.

2.16. Hybridisierung

Zur Auswertung der auf die Nylon-Membran übertragenen RNA mußte diese noch hybridisiert werden. Bei diesem Prozeß galt es, eine entsprechende Sonde an die auf der Membran gebundenen RNA zu binden und diese Sonde mittels CSPD zu markieren. Das CSPD ist ein Chemilumineszenz-Farbstoff, dessen Leuchtintensität mit einem Röntgenfilm aufgenommen wurde und so ausgewertet werden konnte. Die Intensität des Leuchtens steht im direkten Verhältnis mit der von der RNA gebundenen Sondenmenge und dient so als Maß für die RNA-Menge.

Der Prozeß der Hybridisierung lief folgendermaßen ab:

Zuerst wurde die Prähybridisierungslösung auf 40°C vorgewärmt. Die Membran wurde mit der Schichtseite, an der die RNA gebunden hatte, nach innen in eine vorgeheizte *Biometra RollerTubes*-Glasröhre überführt. Dann wurden 20 ml Prähybridisierungslösung (DIG Easy Hyb) hinzugegeben und die Membran für 120 Minuten bei 40°C inkubiert. Die Inkubation fand in einem *Hybridisierungsofen Biometra OV 1* statt. Dabei wurden die Rollertubes schräg gestellt und im Ofen geschwenkt. Nach Ablauf der zwei Stunden wurde in das Roller Tube die zuvor erhitzte Sondenlösung eingefüllt.

Nun begann die eigentliche Hybridisierung, die über 12 bis 18 Stunden bei 40°C ausgeführt wurde. Anschließend wurde der Blot zweimal für je 5 Minuten bei 30°C mit 100 ml 2x SSC und 0,1% SDS und zweimal je 20 Minuten bei 50°C mit 100 ml 0,5x SSC und 0,1% SDS gewaschen.

Der Blot wurde in 10 ml 1xWasch-Puffer (*DIG Wash and Block Buffer Set*) für 5 Minuten bei 30°C äquilibriert. Im nächsten Schritt wurde der Blot 60 Minuten bei 30°C in 100 ml Blockierungs-Lösung (*DIG Wash and Block Buffer Set*) inkubiert. Der Antikörper wurde mittels 20minütiger Inkubation mit 20 ml Antikörper-Konjugat bei 30°C angefügt. Abschließend wurde der Blot zweimal mit 100 ml 1x Wasch-Puffer für 20 Minuten bei 30°C gewaschen und für 10 Minuten bei 30°C mit 10 ml 1x Detektionspuffer (*DIG Wash and Block Buffer Set*) äquilibriert.

Der Blot wurde auf eine Klarsicht-Frischhaltefolie gelegt und mit 0,5 ml Chemilumineszenz-Substrat-Lösung CSPD behandelt, in die Frischhaltefolie eingewickelt und 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert, um das CSPD beschleunigt zu aktivieren. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (*Lumi Film*, Boehringer Mannheim) auf den Blot gelegt. Je nach Qualität der Hybridisierung waren Expositionszeiten von 1-12 Stunden notwendig. Im Anschluß an die Exposition wurde der Röntgenfilm entwickelt. Die Expositionszeit des Röntgenfilms wurde auf 15 bis 30 min für die Hybridisierung mit 18S rDNA Sonde reduziert. Im allgemeinen

wurden die Hybridisierungsexperimente jeweils in drei Ansätzen bei gleichen Bedingungen gemacht und wenigstens einmal mit isolierter RNA aus neuen Kulturansätzen wiederholt.

2.17. RT-PCR Experimente

Die steady state mRNA Konzentrationen der *fcp* Gene wurden über Reverse Transkription - gefolgt von einer Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht und mit den Ergebnissen aus den Northern Blotting und RNA Dot Blotting Experimenten verglichen. Dazu wurde die Gesamt RNA von *Cyclotella cryptica* sowohl aus den Ansätzen von LL und HL Bedingungen in poly(A)⁻ and poly(A)⁺ angereicherte RNA Fraktionen aufgearbeitet unter Verwendung des *Oligotex poly(A) mRNA Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Germany). Die RT-PCR wurde mit dem *RobusT RT-PCR KIT* (Finnzymes, Biometra, Göttingen, Germany) nach den Empfehlungen des Herstellers ausgeführt, mit einem Endvolumen von 50 µl unter Verwendung von 100 ng poly(A)⁺ RNA als Template, 10pmol der upstream und downstream Primer, 1.5mM MgCl₂, 5U AMV Reverse Transcriptase und 2U DyNAzyme EXT DNA Polymerase. Genspezifische Primer wurden genutzt (sh. **Tab. 2.15.1.**). Der Erststrang cDNA Synthese Schritte wurden für 60 min bei 45°C für *fcp2* und *fcp4* und bei 60°C für *fcp6* und *fcp12* ausgeführt, während die folgende PCR Amplifikation der cDNA aus 40 Zyklen Denaturierung (94°C für 30s), Annealing (45°C für 30s für *fcp2* und *fcp4* und 60°C für *fcp6* und *fcp12*) und Extension (72°C für 1 min) bestand. Der letzte Schritt (Extension) dauerte 10 min bei 72°C. Die Bildung von RT-PCR Produkten wurden in Agarose-Gelen kontrolliert.

2.18. Quantifizierung der Hybridisierungssignale und DNA Banden

Die Röntgenfilme und Agarose Gele, welche mit Ethidiumbromid gefärbt wurden, wurden unter Verwendung einer *Herolab Easy CCD Kamera* (type 429h), einer *Herolab RH-3 Illumination Kammer* digitalisiert und gespeichert und mit Hilfe eines PCs mit *E.A.S.Y. Analysis System Software* (Herolab, Wiesloch, Germany) analysiert. Die Signalintensitäten der Hybridisierungssignale aus Northern Blots und RNA Dot Blots und die der Amplifikationsprodukte aus den RT-PCR wurden mit der *E.A.S.Y. Image Plus Software* berechnet. Die Signale von wenigstens drei bis vier DNA Banden der Agarose Gele und RT-PCR Experimente, RNA Fragmenten der Northern Blotting Experimente oder RNA Dots wurden für jede Probe quantifiziert.

2.19. Bestimmung der Transkriptgröße

Zur Bestimmung der Transkriptgrößen der *fcp*-Gene wurde RNA auf denaturierende Formaldehyd-Agarosegele aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

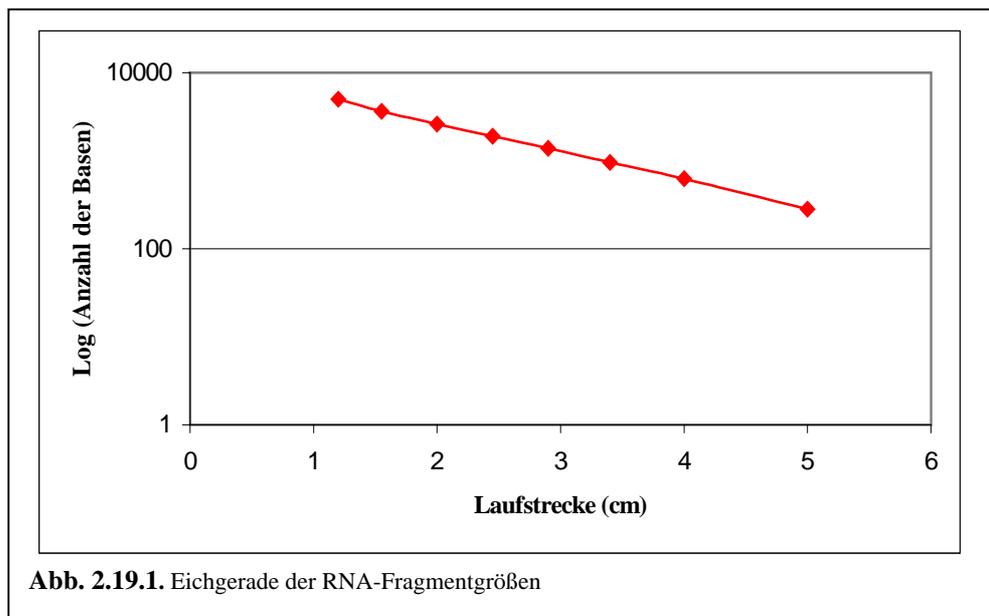
Zusätzlich zu den Proben wurde ein RNA-Marker (Sigma Marker, 0.28-6.6 KB) aufgegeben. Die Laufstrecken der einzelnen Fragmente des RNA-Marker konnte nach Anfärbung der Gele mit Ethidiumbromid bestimmt werden. Gemessen wurden die Abstände der Bande zu den Einfülltaschen. Die Auswertung der Gele erfolgte über einen Ausdruck des Gels, der von einer *Type 429h Easy CCD Camera, Herolab* gemacht wurde. Anhand des RNA-Markers konnte eine Eichgerade berechnet werden, mit der später die Transkriptlänge der *fcp*-mRNA berechnet werden konnte.

Von den Gelen wurden Turboblots (s.o.) hergestellt, mit den entsprechenden Gensonden hybridisiert und autoradiographisch auf Röntgenfilm festgehalten. Die Röntgenfilme zeigten, wie weit die *fcp*-mRNA auf dem Gel gewandert war. So konnte im Vergleich mit der Aufnahme vom Gel vor der Hybridisierung die Transkriptlänge bestimmt werden.

Die Fragmentgrößen des RNA-Markers waren wie folgt festgelegt:

Fragmentgrößen (Basen)

- 1) 6583
- 2) 4981
- 3) 3638
- 4) 2604
- 5) 1908
- 6) 1383
- 7) 955
- 8) 623
- 9) 281



Bei manchen Blots war für die Auswertung allerdings eine Reskalierung nötig, da der Ausdruck des Gels nicht maßstabsgetreu war und so nicht mit dem Röntgenfilm übereinstimmte. Letztendlich wurden die Mittelwerte aus den Ergebnissen berechnet.

2.20. t-Test Analyse der Daten aus der Untersuchung der circadianen Expressionsmuster

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der verschiedenen Messwerte aus den circadianen Expressionsmuster-Experimenten der *fcp* Gene von *Cyclotella cryptica* wurden die Differenzen der steady state mRNA Konzentrationen über t-Test Analyse überprüft. Dabei wurde die t-Test Analyse Option des *Jandel Scientific Sigma Plot for Windows Versions 3.02* Programms durchgeführt. Es wurde der Hauptaugenmerk auf die Differenz zwischen den wichtigsten Tageszeiten geworfen (07:00 zu 14:00 Uhr; 14:00 zu 21:00 Uhr). Hierbei wurden die p Werte des t-Tests für die Signifikanz herangezogen und Werte $< 0,1$ als signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

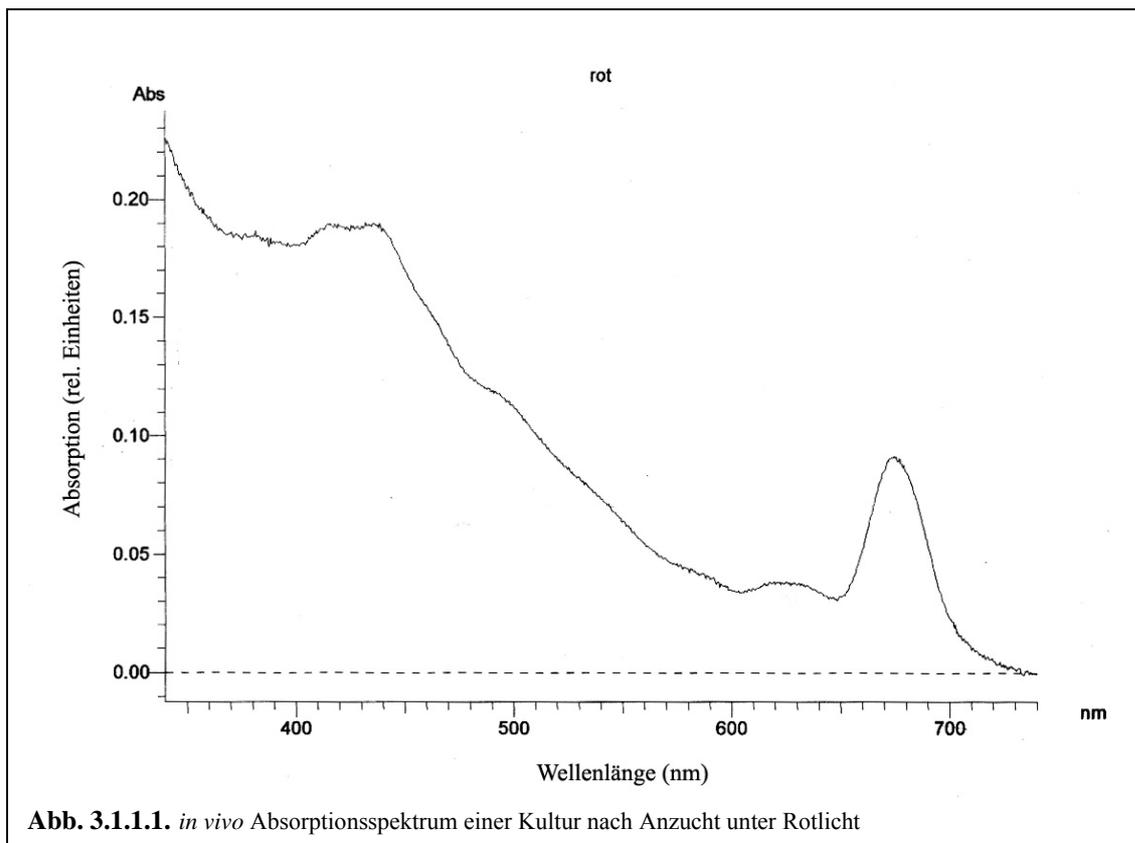
3. Ergebnisse

3.1. Spektroskopie

3.1.1. *in vivo*-Absorptionsspektroskopie ganzer Zellen

Um mit einfachen Mitteln einen allgemeinen Eindruck zu erhalten, ob und wie sich die Pigmentproduktion während der verschiedenen Anzuchten verändert hat, und um damit schon einen Hinweis auf mögliche Variationen in den Expressionsraten der *fcp*-Genfamilie zu erhalten, wurden mittels eines *Hitachi U-3000 Spectrophotometer* im Bereich von 340 bis 740 nm *in vivo* Absorptionsspektren aufgenommen.

Proben der Kulturen, die unter Rot-, Blau- und Grünlicht, bzw. unter schwachem Weißlicht angezogen worden waren, wurden kurz vor der RNA-Isolation (siehe **2.8.**) entnommen und von ihnen Absorptionsspektren aufgenommen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in den Abbildungen **3.1.1.1.** bis **3.1.1.4.** zu sehen.



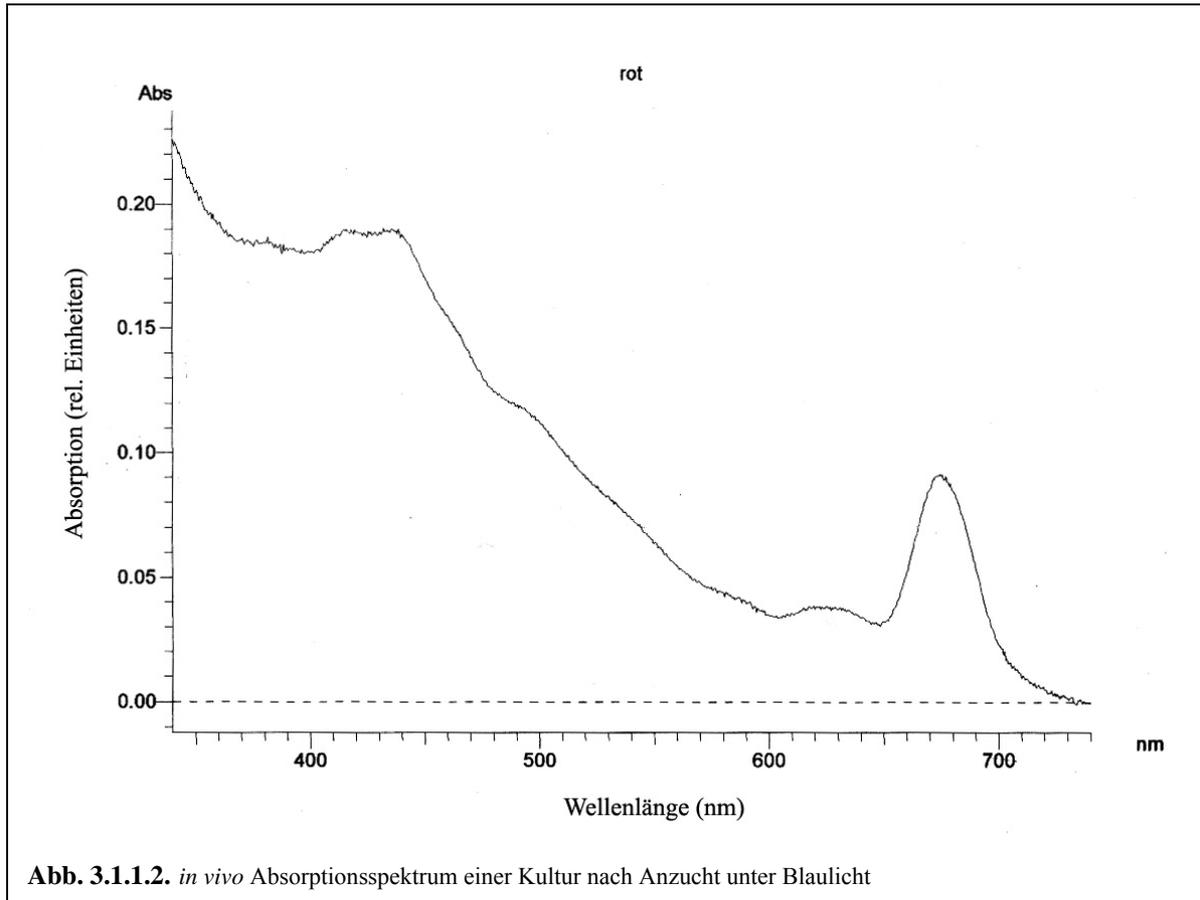


Abb. 3.1.1.2. *in vivo* Absorptionsspektrum einer Kultur nach Anzucht unter Blaulicht

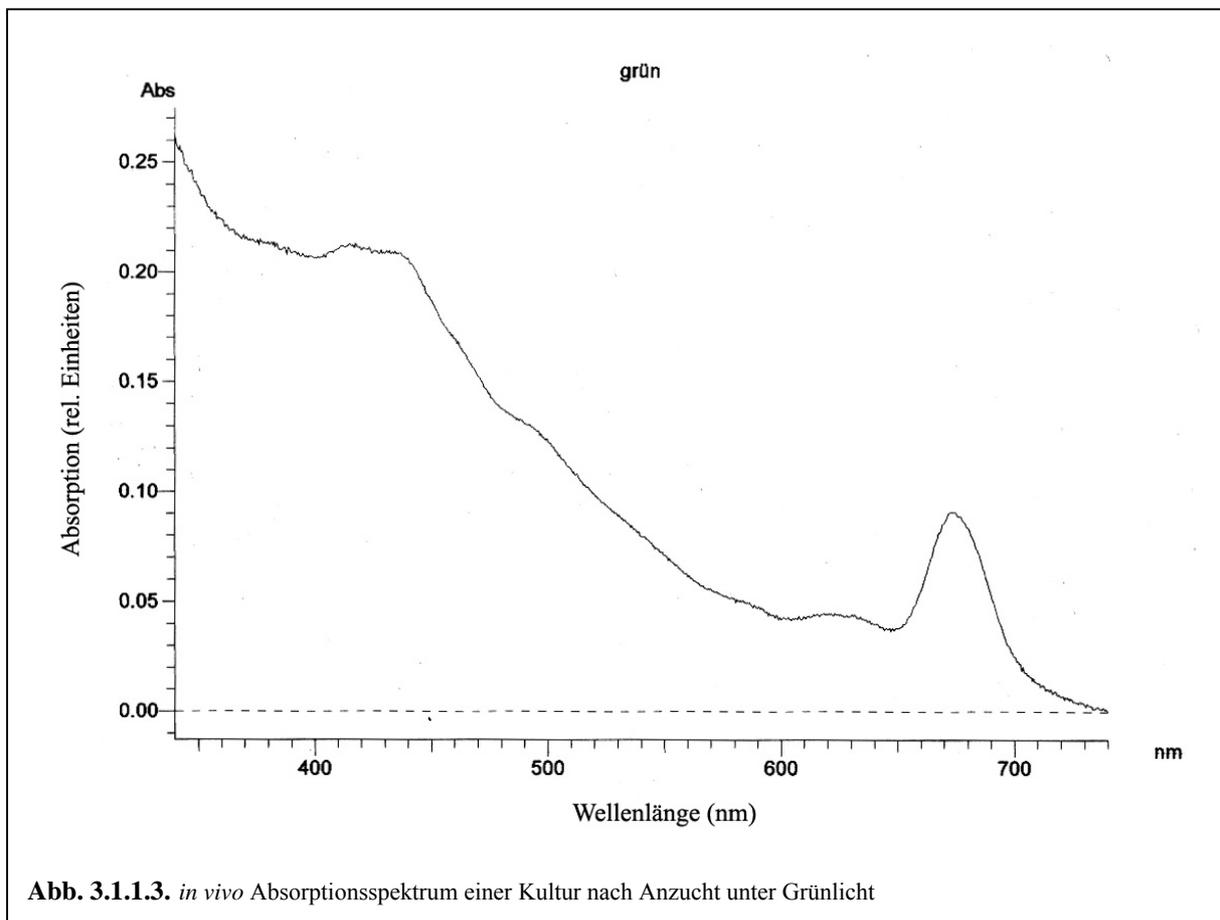
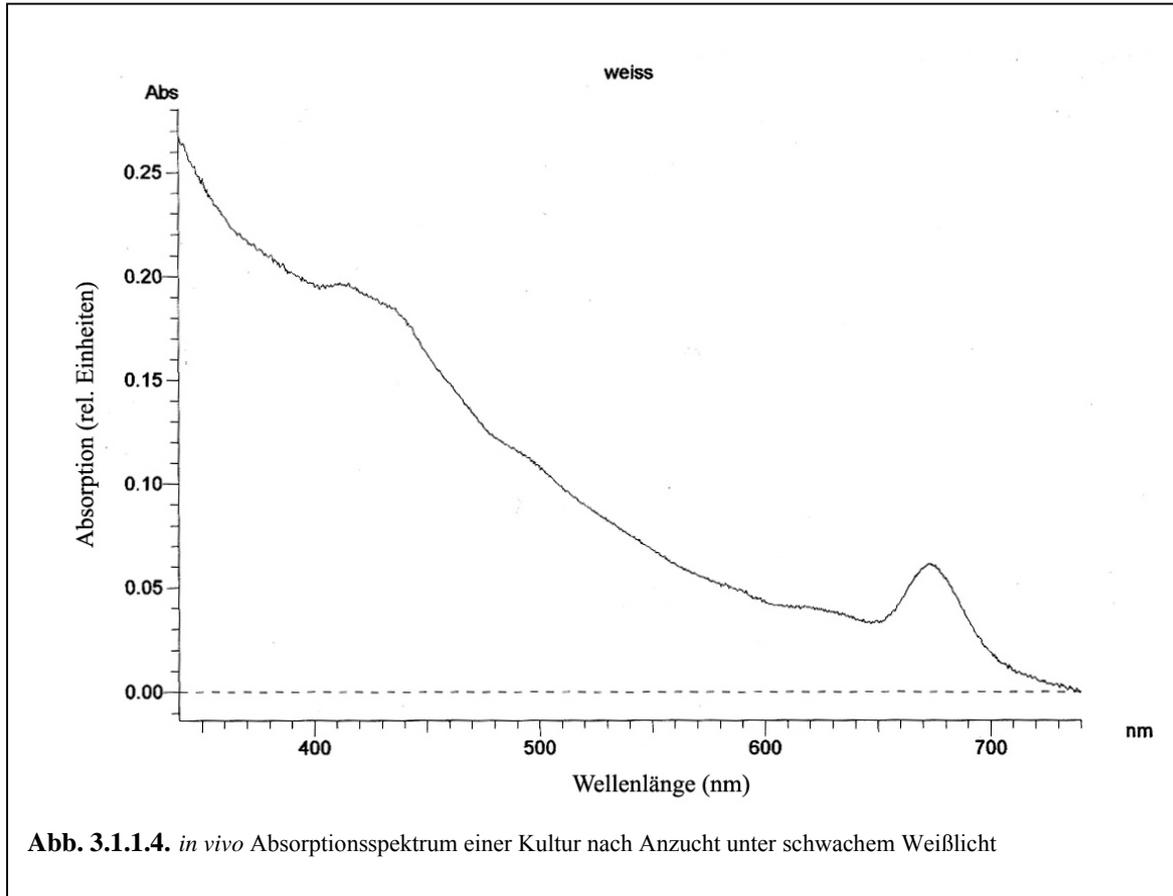


Abb. 3.1.1.3. *in vivo* Absorptionsspektrum einer Kultur nach Anzucht unter Grünlicht



Bei der Aufnahme der Absorptionsspektren ganzer Zellen zeigten sich Maxima bei 420 nm, 440 nm, 620 nm und 670 nm. Diese Messungen sind wichtig für die anschließende Analyse der Pigmente, denn die Absorption bei 460 nm und 620 nm geben Hinweise auf die Mengen von *Chl c*, die in ganzen Zellen von *Cyclotella* zu finden sind. Die Maxima bei 420 nm, 440 nm und 680 nm repräsentieren *Chl a*. Es zeigte sich, daß die Verhältnisse zwischen *Chl a* und *Chl c* bei den unterschiedlichen Anzuchten stark variierten. So zeigte sich bei der Auswertung der Probe aus der Schwachlicht-Anzucht nur geringe Unterschiede im Bereich von 420 und 440 nm, d.h. daß das Verhältnis der Chlorophylle *a* und *c* bei Schwachlicht deutlich anders war, als bei den anderen Anzuchten. Das Verhältnis der Absorptionsmaxima bei 420 und 440 nm von *Chl a* und *Chl c* ist bei Anzucht unter Rotlicht ungefähr gleich. Bei den Anzuchten unter Blaulicht und Grünlicht ist das Maximum für *Chl a* etwas höher als das von *Chl c*. Bei der Schwachlicht-Kultur ist die Menge an *Chl c* wesentlich niedriger als die *Chl a*-Menge. Darüber hinaus zeigten sich deutlich *Chl a* Maxima bei 670 nm bei allen Anzuchten. Der *Chl c* Peak bei 640 nm verschwindet bei Anzucht unter schwachem Weißlicht fast ganz. Das Absorptionmaximum bei 670 nm zeigt sich am deutlichsten bei Kulturen, die unter Rotlicht angezogen wurden, gefolgt von Grünlicht-Kulturen und Blaulicht-Kulturen. Am

schwächsten ist der Peak bei Kulturen, die unter einem schwachem Weißlicht wuchsen, ausgeprägt.

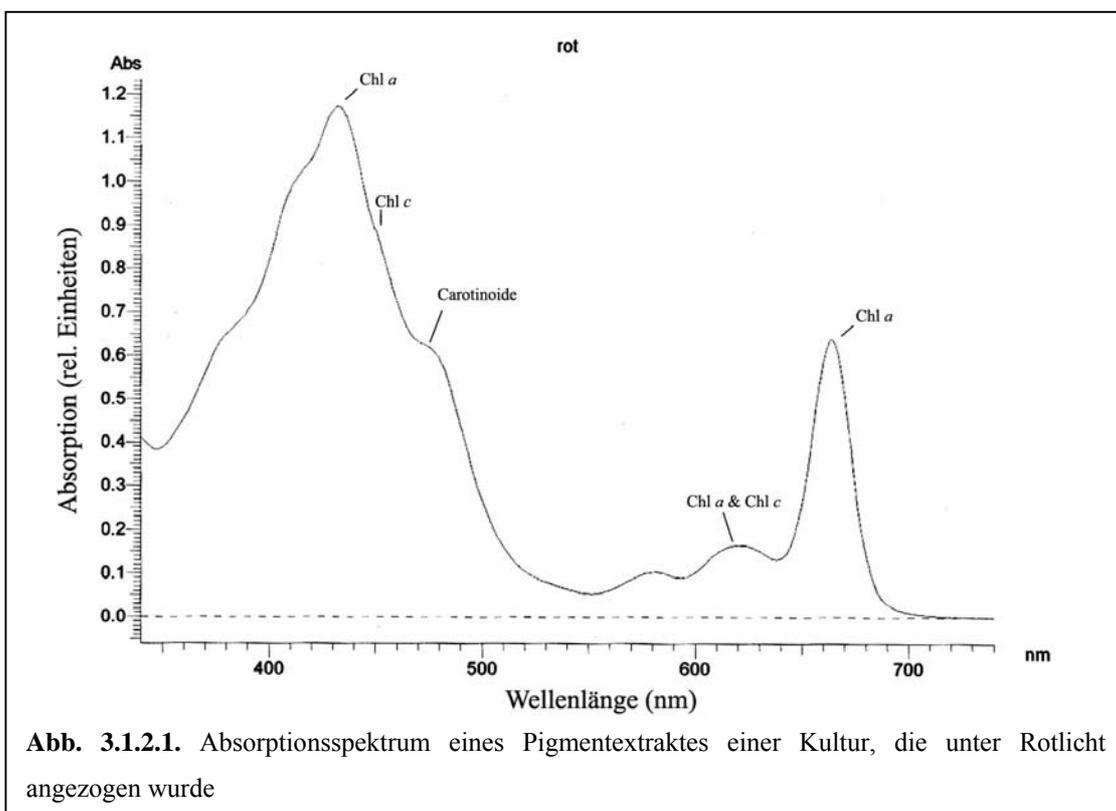
Daneben ist noch bei den Spektren aller Kulturen eine Schulter bei 500 nm zu sehen. Hierbei handelt es sich um Carotinoide. Die Werte sind bei den Grünlicht- und Blaulicht-Anzuchten am ausgeprägtesten, während beim Spektrum der Rotlicht-Anzucht die Schulter wesentlich schwächer ist, und bei den Kulturen, die unter schwachem Weißlicht wuchsen, ist der Peak fast nicht zu erkennen.

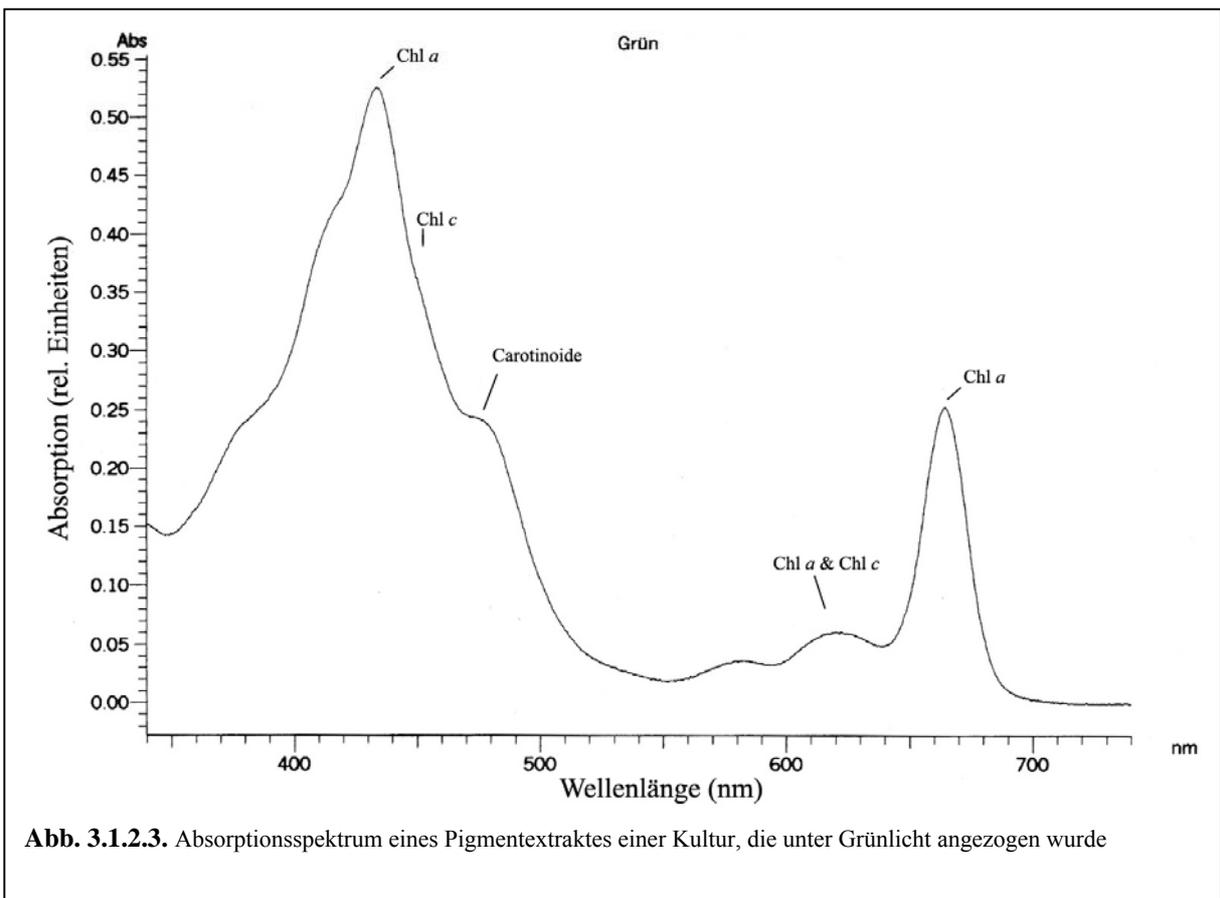
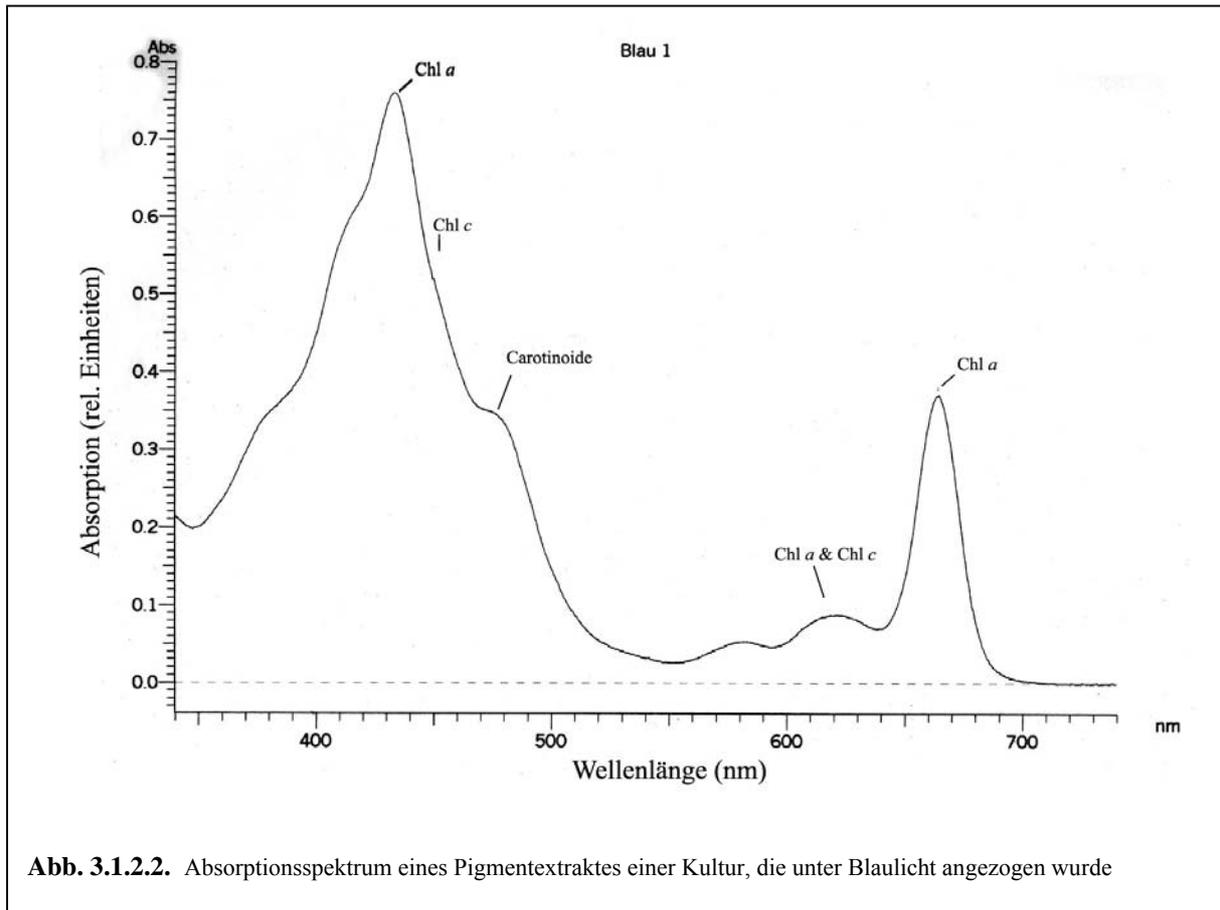
Dennoch sind diese Schlussfolgerungen nur bedingt zutreffend. Aufgrund der Vollständigkeit der Zellen sind die Streueffekte bei spektroskopischen Analyse recht groß und führen oft zu Verzerrungen im Spektrum. Die Absorptionsspektren von Pigmentextrakten eignen sich für die Analyse der Pigmentkonzentrationen viel besser.

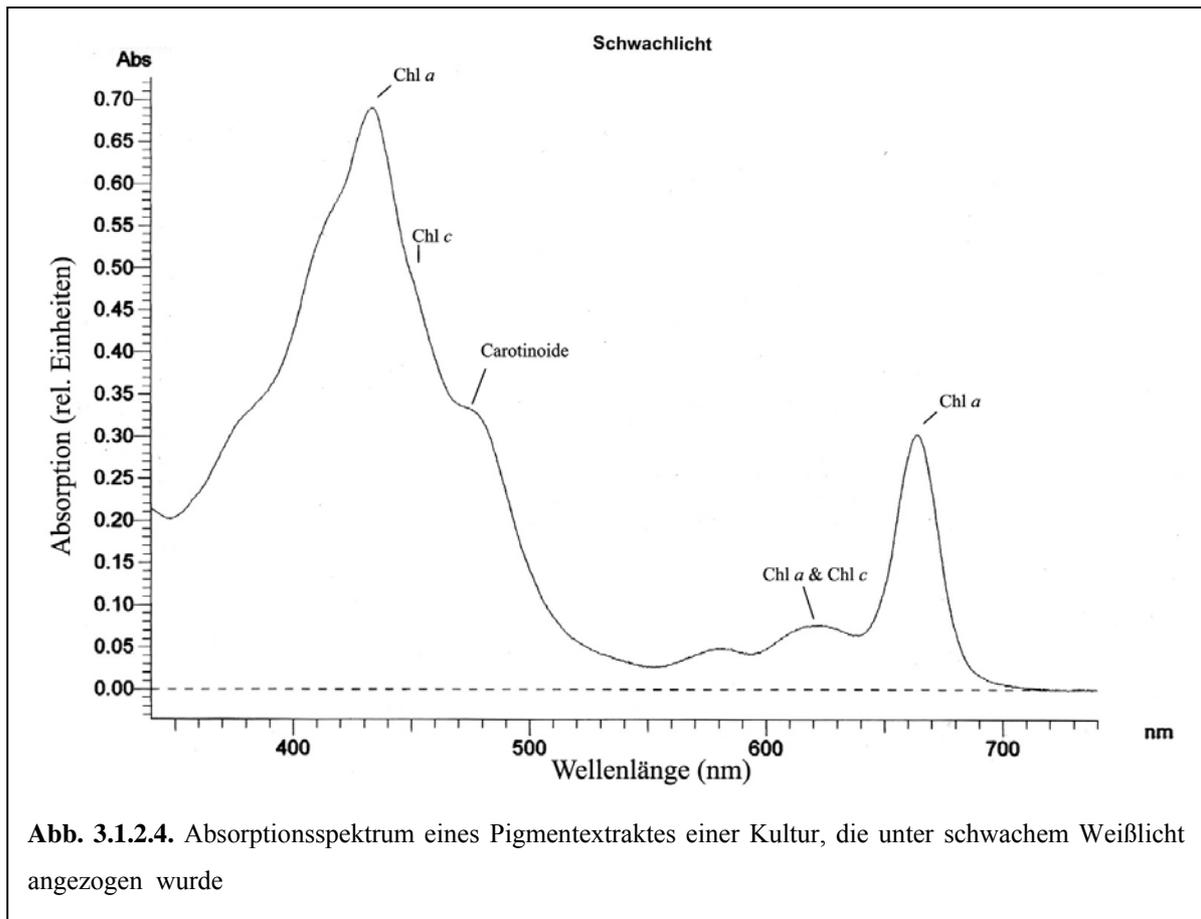
3.1.2. Absorptionsspektroskopie von Pigmentextrakten

Die Absorptionsspektren der Pigmentextrakte wurden ebenfalls mit dem *Hitachi U-3000* im Bereich von 340 nm bis 740 nm aufgenommen und sollten ein detaillierteres Bild von der Pigmentverteilung der Kulturen in den verschiedenen Anzuchten zeigen als es bei den Absorptionsspektren ganzer Zellen möglich war (Bathke *et al.* 1999).

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in den Abbildungen 3.1.2.1. bis 3.1.2.4. zu sehen







Bei den Auswertungen der Absorptionsspektren der Aceton-Extrakte zeigten sich im Gegensatz zu den *in vivo* Absorptionsspektren keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Anzuchten. So waren zwar bei 430 nm und 662 nm deutliche Maxima zu erkennen, sowie Nebenmaxima bei 580 nm und 620 nm und eine Schulter bei etwa 485 nm, doch unterschieden diese sich bei den unterschiedlichen Anzuchten nicht grundlegend.

Als eine weitere Untersuchung wurden die Verhältnisse der Chlorophylle bestimmt (Jeffrey & Humphrey, 1975). Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3.1.2.** dargestellt.

Lichtregime	<i>Chl a</i> : <i>Chl c</i> ₁ + <i>c</i> ₂
Schwachlicht	5,58 : 1
Rotlicht	5,45 : 1
Blaulicht	5,25 : 1
Grünlicht	5,68 : 1

Tabelle 3.1.2.1. Verhältnis von *Chl a* zu *Chl c*₁ + *c*₂ für Kulturen von *Cyclotella cryptica*, die unter Schwachlicht, Rotlicht, Blaulicht und Grünlicht angezogen wurden.

Bei den Anzuchten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Zwar ist das Verhältnis von *Chl a* zu *Chl c* bei Anzucht von *Cyclotella cryptica* unter Blaulicht am niedrigsten und bei Kulturen, die unter Grünlicht kultiviert wurden, am höchsten, doch sind die Unterschiede nur sehr gering. Insgesamt liegt das Verhältnis von *Chl a* zu *Chl c* ungefähr bei 5,5 : 1.

Ein weiterer Aspekt, der sich bei der Betrachtung der Absorptionsspektren der Pigmentextrakte aufdrängt, ist die Änderung der Pigmentzusammensetzung beim Verhältnis von Carotinoiden und Chlorophyllen. Ein Vergleich der Peaks von 662 nm (*Chl a*) zu 475 nm (Carotinoide) und von 630 nm (*Chl c*) zu 475 nm zeigte, daß bei den Pigmentextrakten der Anzuchten unter Rotlicht und Blaulicht die Konzentration sowohl von *Chl a* als auch von *Chl c* etwas ansteigt gegenüber den Werten aus den Anzuchten aus Schwachlicht und Grünlicht.

	Realtives Verhältnis von Chl c : Carotinoiden (630 nm : 475 nm)	Relatives Verhältnis von Chl a : Carotinoiden (662 nm : 475 nm)
RL	0,246	1,011
BL	0,243	0,973
GL	0,217	0,896
LL	0,216	0,889

Tabelle 3.1.2.2. Quotienten der Chl a : Carotinoide Peaks der Absorptionsspektren der Pigmentextrakten der Rotlicht-, Blaulicht-, Grünlicht- und Schwachlicht-Anzuchten

3.1.3. Tieftemperatur-Fluoreszenzmissionsspektroskopie ganzer Zellen

Als ein weiterer Schritt mögliche Veränderungen bei Kulturen von *Cyclotella cryptica* zu erkennen, die unter Rotlicht, Blaulicht, Grünlicht und schwachem Weißlicht angezogen wurden, wurden Tieftemperatur-Fluoreszenzmissionsspektren der Kulturen mit *einem Hitachi F-4500 Fluoreszenzphotometer* im Bereich von 650 nm bis 750 nm aufgenommen. Dabei wurden Licht der Wellenlängen 440 nm, 460 nm und 500 nm als Anregungswellenlängen benutzt.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in den folgenden Graphen zu sehen (**Abb.3.1.3.1. - 3.1.3.4.**)

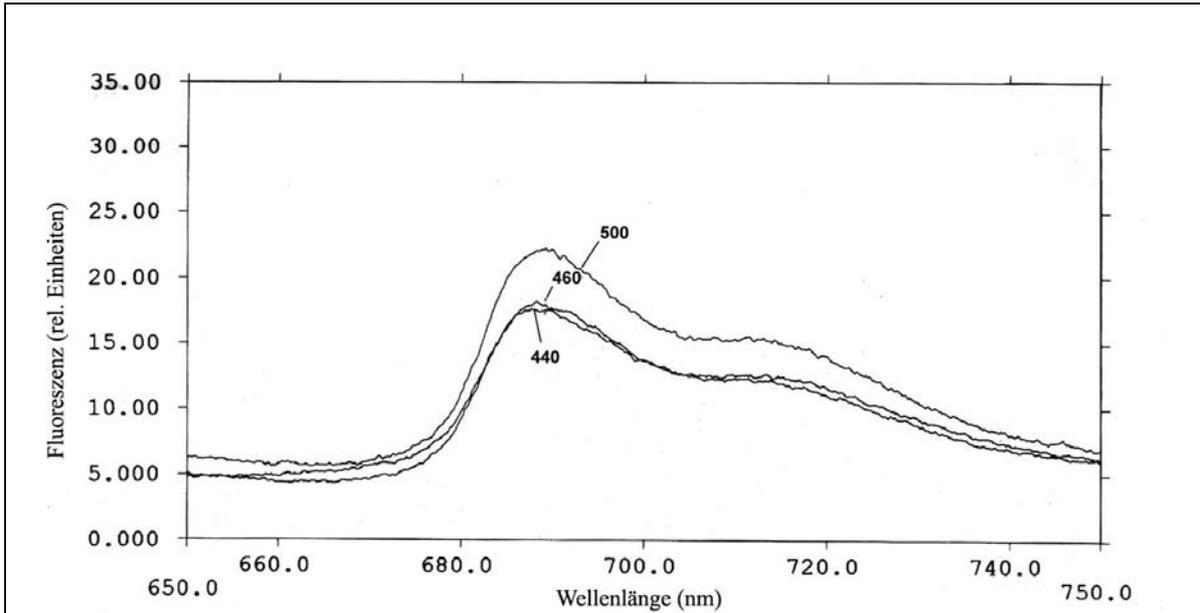


Abb. 3.1.3.1. Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektrum einer *Cyclorella* Kultur, die unter Rotlicht angezogen wurde

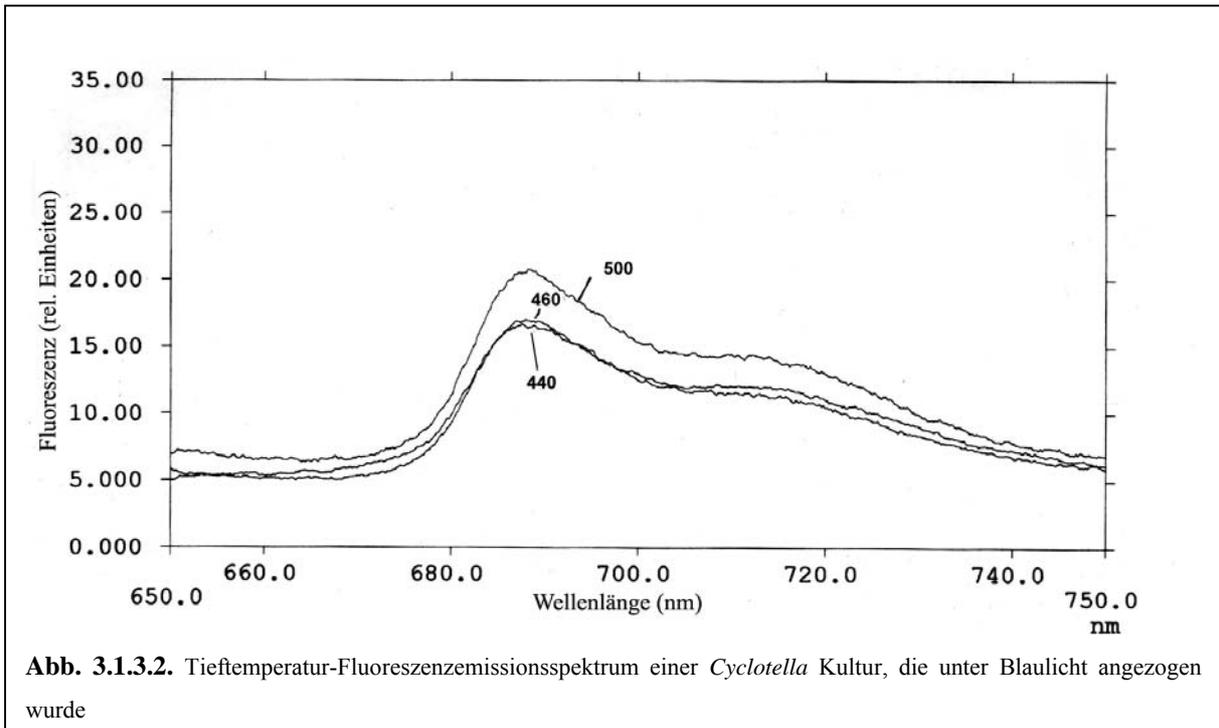
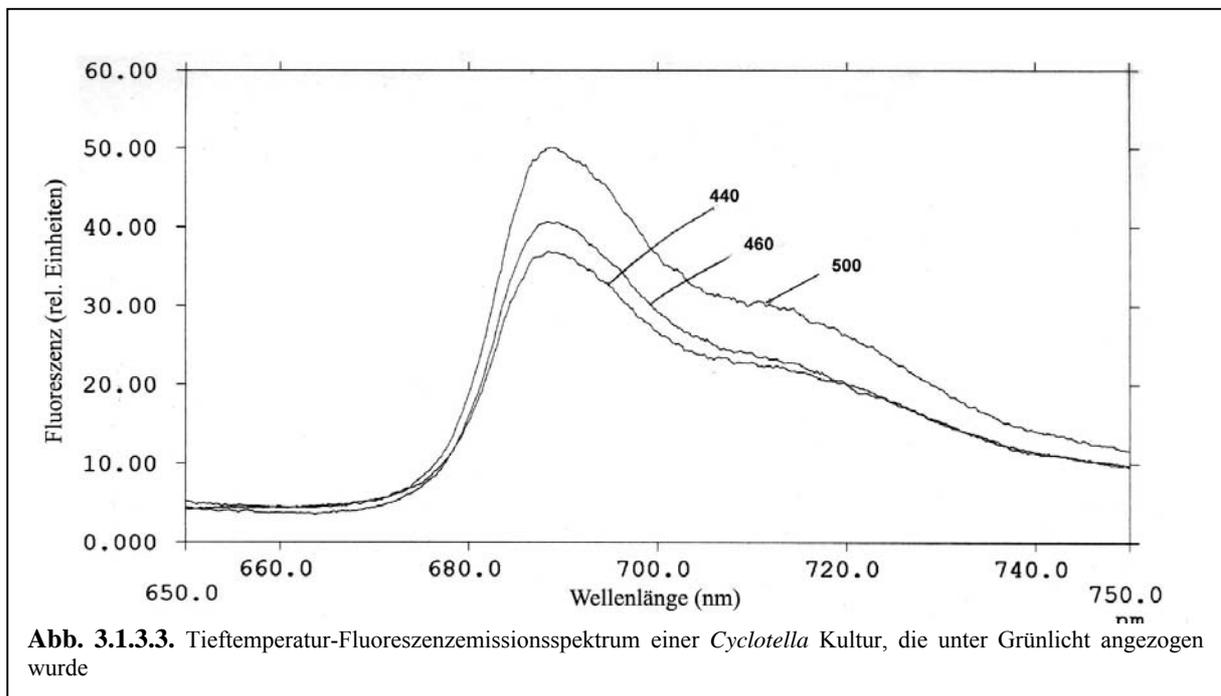
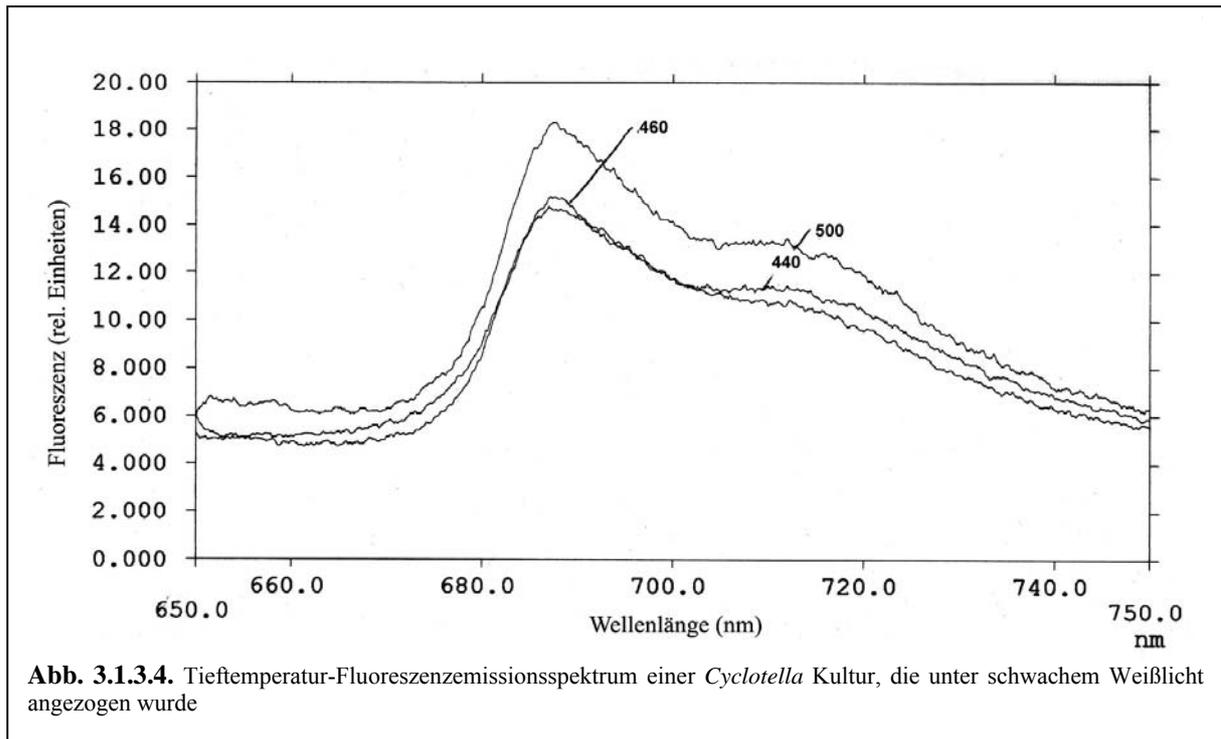


Abb. 3.1.3.2. Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektrum einer *Cyclorella* Kultur, die unter Blaulicht angezogen wurde

Der Verlauf der Spektren ist bei den Anzuchten unter Grünlicht und schwachem Weißlicht am ausgeprägtesten, wobei die Emissionsmaxima mit der Anregungswellenlänge 500 nm die höchsten Werte zeigen, gefolgt von 460 und 440 nm. Auch sind die Maxima der Spektren dieser beiden Versuchskulturen am ausgeprägtesten. Die Kurvenverläufe der aufgenommenen Spektren der Anregungswellenlänge sind unterschiedlich. So liegen die 440 nm und 460 nm Emissionsspektren der Kulturen, die unter Rotlicht, Blaulicht und schwachem Weißlicht angezogen wurden, relativ dicht zusammen, und überschneiden sich sogar, während die Emissionsspektren von *Cyclotella* Zellen aus den Grünlichtkulturen bei Anregung mit 440 nm und 460 nm im Bereich des Maximum (690 nm) deutlich voneinander getrennt verlaufen.



Die verschiedenen Anzuchten zeigten bei den Tieftemperatur Fluoreszenzmissionsspektren in einem engen Bereich ihr Maximum. So lagen die Maxima maximal 1 nm voneinander entfernt.

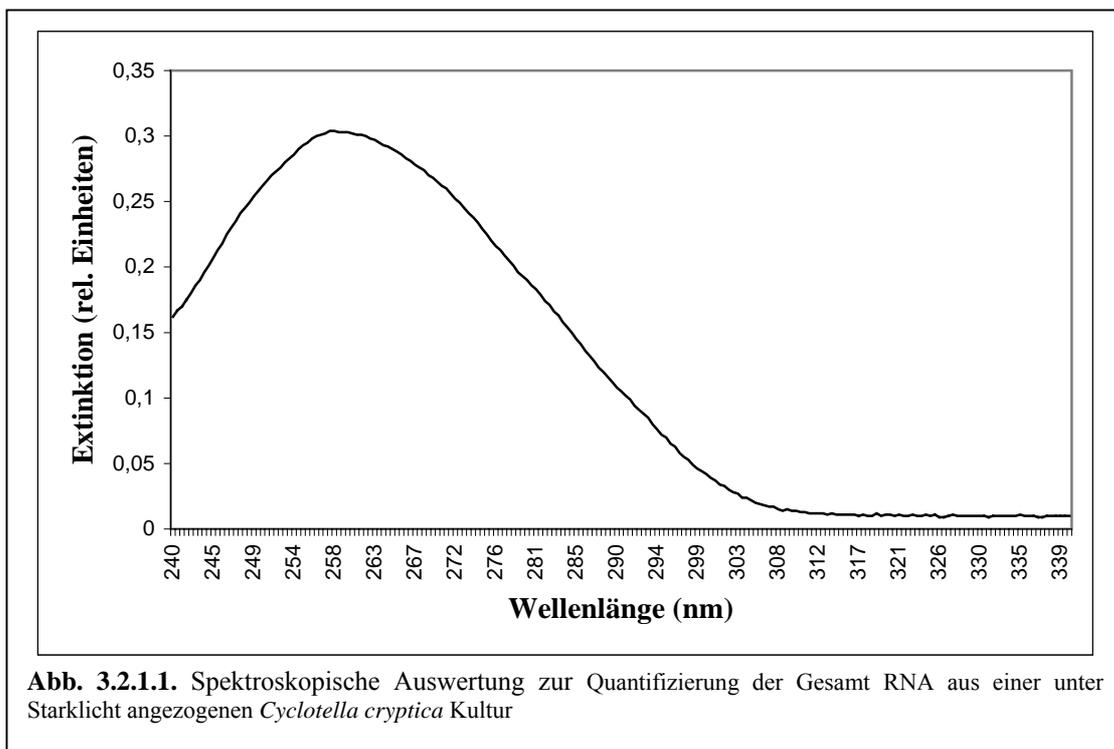


Die Analyse der Pigmentzusammensetzung der Zellen aus den verschiedenen Anzuchten weist nur geringe Unterschiede aus. Zwar weisen die Verhältnisse der Chlorophylle: Carotinoiden bei den unterschiedlichen Anzuchten Differenzen auf, allerdings sind diese sehr gering. Dennoch scheint die Konzentration an Carotinoiden in den Zellen von *Cyclotella cryptica* unter Rotlicht- und Grünlicht-Bedingungen anzusteigen, verbunden mit einer Abnahme der Chlorophyllkonzentration.

3.2. RNA Ausbeute

Die Ausbeute an Gesamt RNA aus den verschiedenen Proben variierte in ihren Mengen. Es wurde festgestellt, daß aus einem Probenvolumen von 150 ml zwischen 120 – 1400 µg/ml Gesamt RNA isoliert werden konnte. Für die nachfolgenden Untersuchungen bedeutete dies, daß in den Eppendorf Caps je 400 Lösung mit 48 – 560 µg Gesamt RNA zur Verfügung standen. Im Schnitt erhielt man durch die RNA Isolation nach Sambrock *et al.* (1989) etwa 240 µg an Gesamt RNA aus 400 ml *Cyclotella*-Flüssigkultur, wobei die Mengen an Gesamt RNA bei gleichen Kulturvolumen aus der Flüssigkultur von *Cyclotella cryptica* bei Starklicht-Anzuchten immer geringer waren als die aus unter Schwachlicht kultivierten Zellen.

3.2.1. Gesamt RNA Ausbeute bei Kulturen, die unter Starklicht und Schwachlicht kultiviert wurden



Eine Isolation der Gesamt RNA aus 400 ml Kultur-Medium von *Cyclotella cryptica*, die unter Starklicht angezogen wurden, ergab eine durchschnittliche Ausbeute von ungefähr 130 µg Gesamt RNA. Aus den Werten der spektroskopischen Quantifizierung (**Abb. 3.2.1.1.**) erhielt man einen OD₂₆₀/OD₂₈₀ Faktor von 1,8 bis 1,9, was auf eine hohe Reinheit der Aufarbeitung schließen läßt.

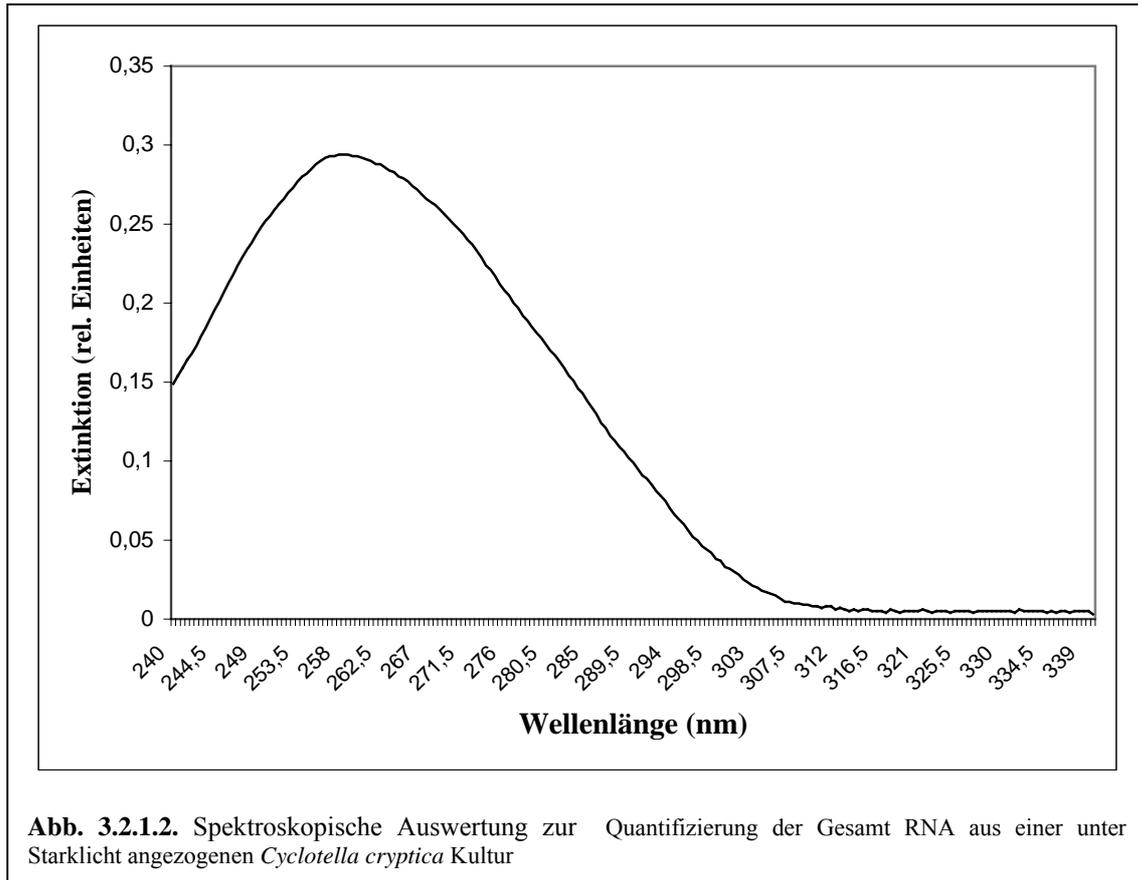


Abb. 3.2.1.2. Spektroskopische Auswertung zur Quantifizierung der Gesamt RNA aus einer unter Starklicht angezogenen *Cyclotella cryptica* Kultur

Bei der Isolation der Gesamt RNA aus Schwachlicht-Anzuchten von *Cyclotella cryptica* lag die durchschnittliche Ausbeute an Gesamt RNA bei etwa 290 µg, lieferte also wesentlich höhere Werte bei gleicher Kulturmenge. Der OD_{260}/OD_{280} Wert lag hier im Bereich von 1,7 (sh. **Abb. 3.2.1.2.**).

3.2.2. Gesamt RNA Ausbeute bei Kulturen, die unter Rot-, Blau-, bzw. Grünlicht angezogen wurden

Die Aufarbeitung der Kulturen von *Cyclotella cryptica*, die unter den unterschiedlichen spektralen Verhältnissen kultiviert wurden, führte zu einer durchschnittlichen Ausbeute an Gesamt RNA von etwa 160 µg. Hierbei lag der OD₂₆₀/OD₂₈₀ Wert zwischen 1,8 und 2,0 (sh. **Abb. 3.2.2.1. – 3.2.2.3.**).

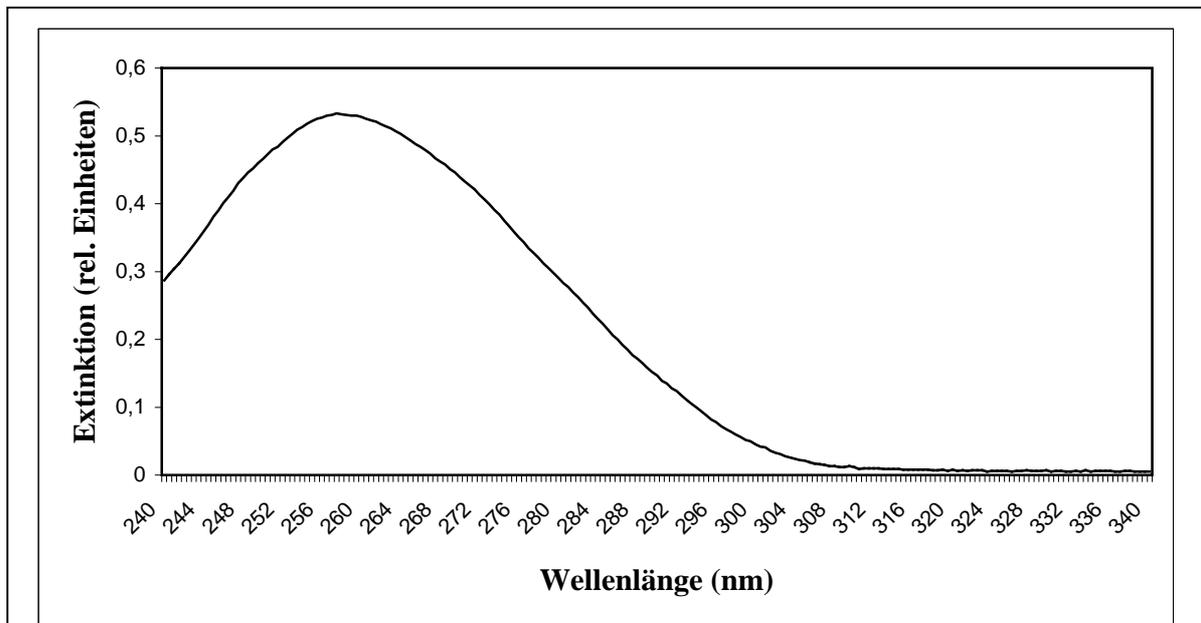


Abb. 3.2.2.1. Spektroskopische Auswertung zur Quantifizierung der Gesamt RNA aus einer unter Rotlicht (RL) angezogenen *Cyclotella cryptica* Kultur (OD₂₆₀/OD₂₈₀ : 1,8)

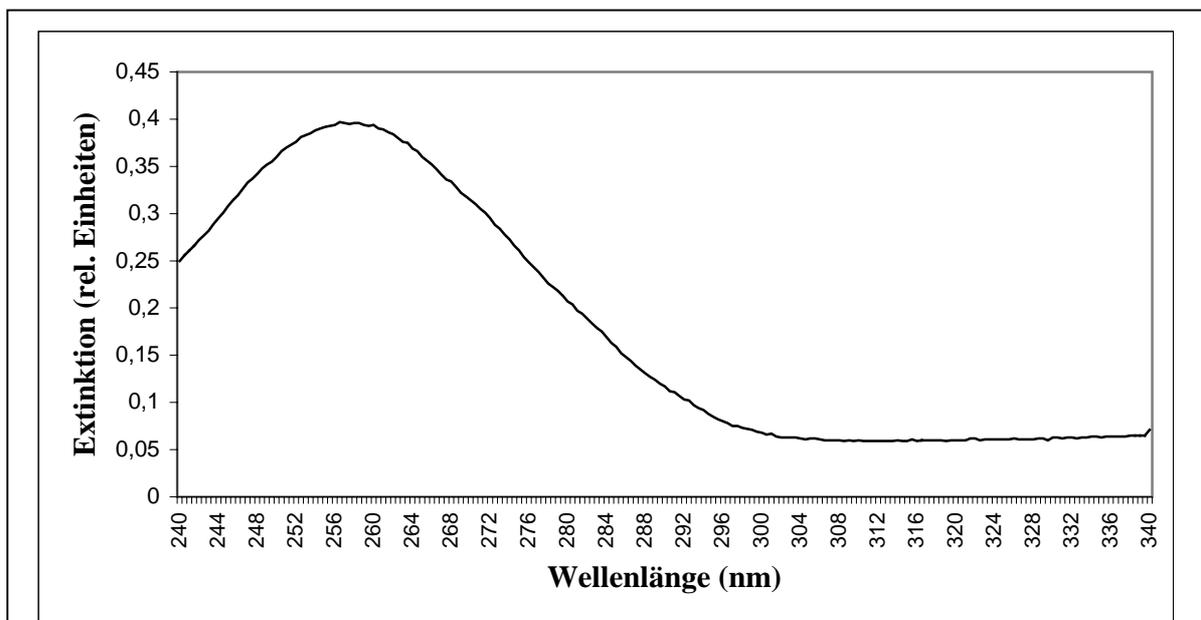
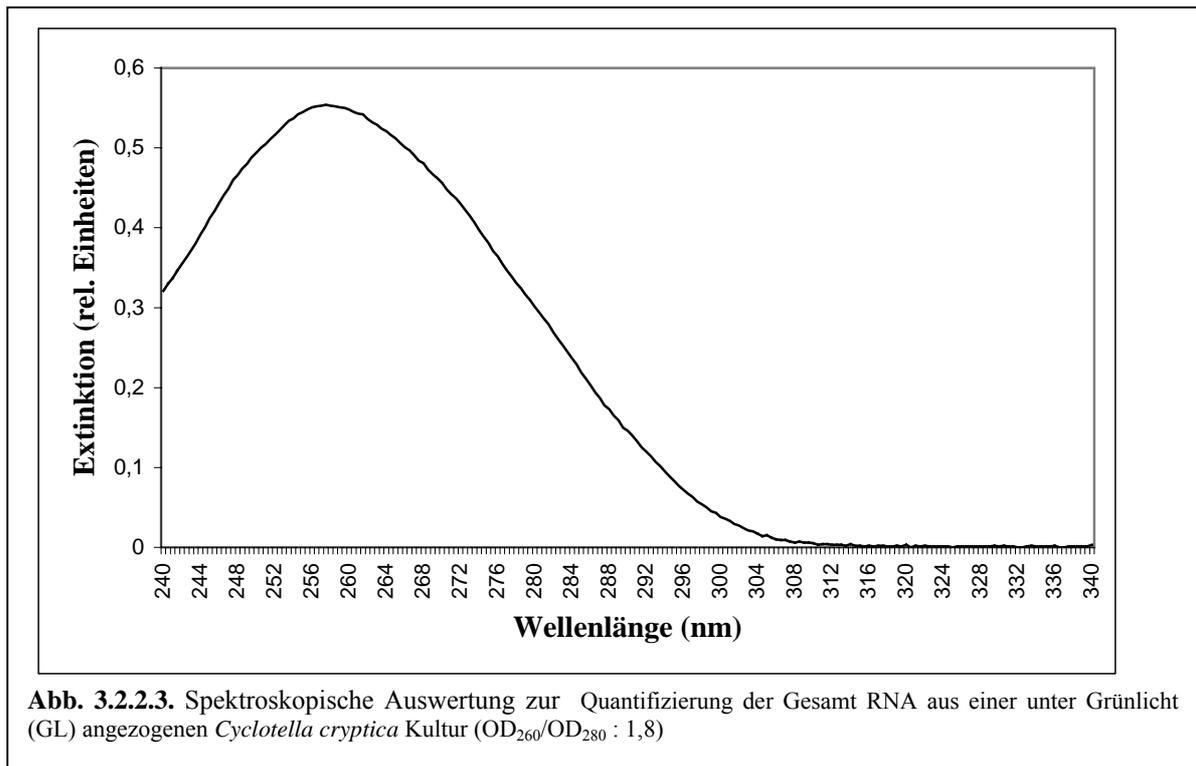
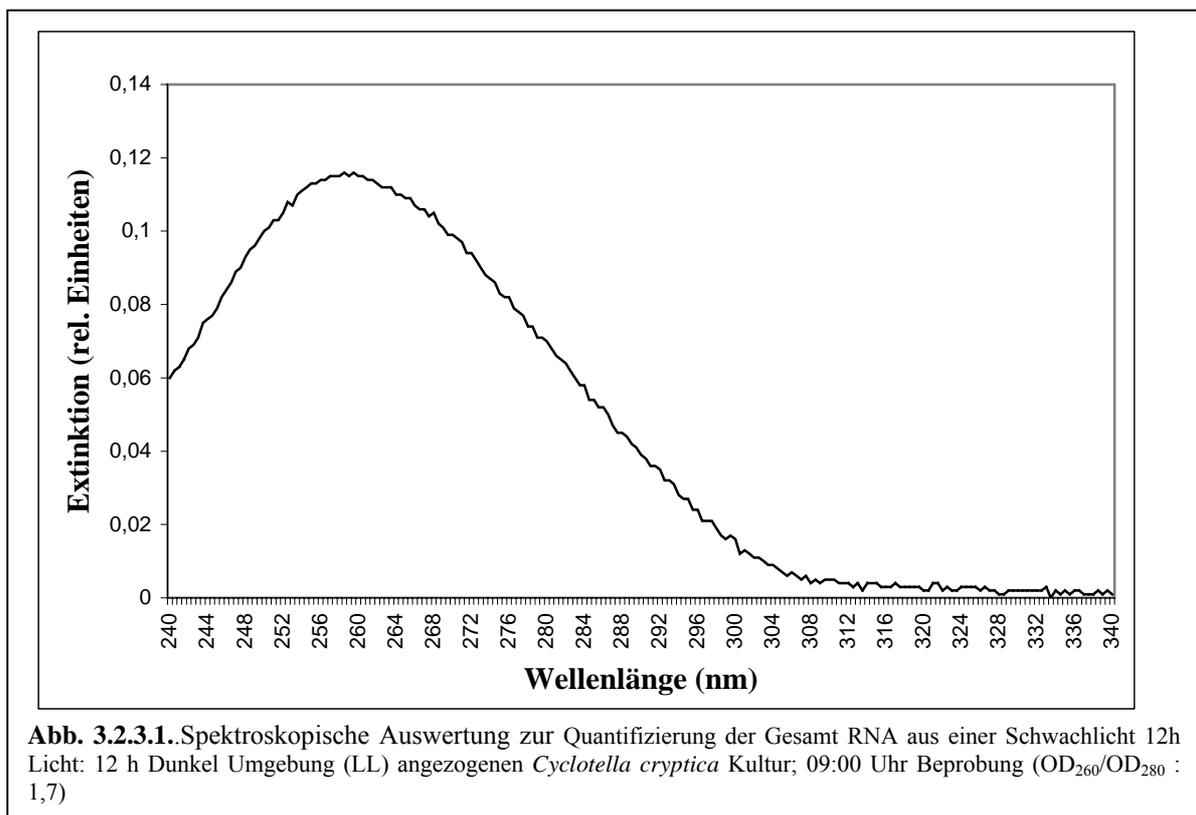


Abb. 3.2.2.2. Spektroskopische Auswertung zur Quantifizierung der Gesamt RNA aus einer unter Blaulicht (BL) angezogenen *Cyclotella cryptica* Kultur (OD₂₆₀/OD₂₈₀ : 2,0)



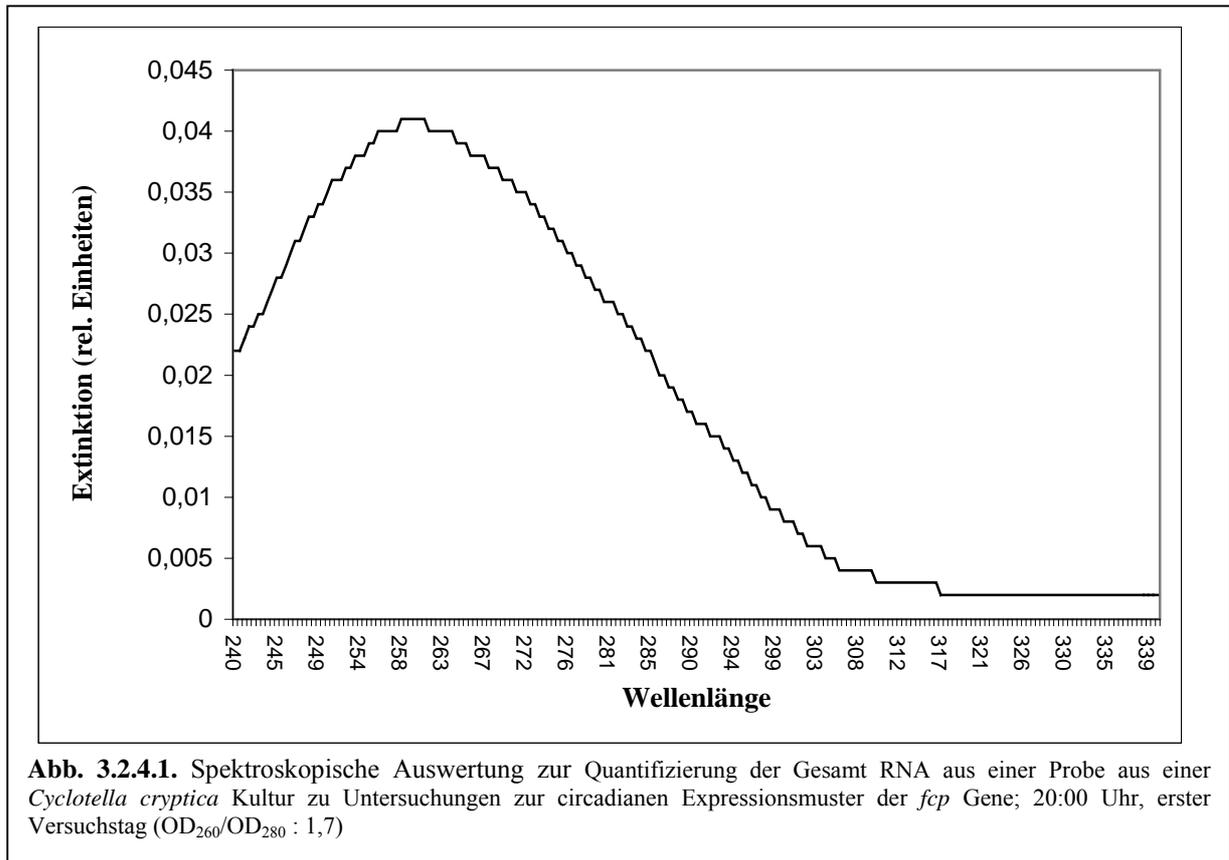
3.2.3. Gesamt RNA Ausbeute bei Kulturen zur Untersuchung der diurnalen Rhythmik

Die Aufarbeitung der Kulturen von *Cyclotella cryptica*, die in einem 12 h Licht: 12 h Dunkel Regime angezogen wurden, führte zu einer durchschnittlichen Ausbeute an Gesamt RNA von etwa 400 µg. Hierbei lag der OD_{260}/OD_{280} Wert zwischen 1,7 und 1,8 (sh. **Abb. 3.2.3.1.**).



3.2.4. Gesamt RNA Ausbeute bei Kulturen zur Untersuchung der circadianen Rhythmik

Die Aufarbeitung der Kulturen von *Cyclotella cryptica*, die in einem 24stündigen 12 h Licht: 12 h Dunkel Regime mit drei folgenden Tagen in Dauerdunkelheit angezogen wurden, führte zu durchschnittliche Ausbeuten an Gesamt RNA von etwa 320 µg/ml erzielt. Hierbei lag der OD₂₆₀/OD₂₈₀ Wert zwischen 1,7 und 1,8 (sh. **Abb. 3.2.4.1.**).



Das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ wies in keinem Fall einen signifikant höheren, bzw. niedrigeren Faktor als 1,7 auf, was bedeutet, daß in den Isolaten so gut wie keine DNA oder Proteinverunreinigungen nachgewiesen werden konnten.

Allerdings war die Isolation der Gesamt RNA nach Sambrock (1989) sehr zeitaufwendig und verlangte einen Zeitraum von drei oder mehr Tagen für eine einzelne Probe, so daß die Suche nach einer alternativen Isolationsmethode nahe lag. Hierbei wurde dann das Hauptaugenmerk auf die Verkürzung des Isolationsverfahrens gelegt.

3.3.. Alternative Isolation der Gesamt RNA mit NucleoSpin RNA II

Bei der Suche nach einer effektiv zeitsparenderen Methode zur Isolation der Gesamt RNA wurden verschiedene RNA Isolations-Kits zu Hilfe genommen. Dabei wurden die speziellen Filtereigenschaften von Silikatmembranen und die lysierenden Eigenschaften chaotropischer Ionenlösungen genutzt, was viel von der zeitraubenden mechanischen Arbeit an den geernteten Zellen sparte. Allerdings war die Menge an Kulturmateriale, aus der Gesamt RNA, isoliert werden konnte, und somit auch die Menge an isolierbarer Gesamt RNA durch die Bindekapazität der Silikatmembranen der Kits begrenzt. Obwohl die Ausbeute an Gesamt RNA mit Werten zwischen 18 bis 39 µg/ml lag, war diese Menge nicht ausreichend für eine statistisch qualitative Wiederholung und Auswertung der nachfolgenden Analysen. So wurde diese Methode letztlich vereinzelt bei allen Untersuchungen zu Bestätigung der Ergebnisse herangezogen. Für größere Ansätze erwies sich das System der Silikatmembran-Filterssysteme als zu begrenzend und kostspielig.

Eine Reinheitsuntersuchung zeigte, daß so gut wie keine DNA oder Proteinverunreinigung der Isolate nachgewiesen werden konnte. Das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ wies in keinem Fall einen signifikant höheren bzw. niedrigeren Faktor als 1,9 auf.

3.4.. Transkriptlängen

Die Längen der Transkripte der untersuchten *fcp* Gene wurden durch Northern und Turbo Blotting Experimente ermittelt. Ein repräsentativer Blot wird in **Abb. 3.4.1.** gezeigt.

Die durch PCR amplifizierte Genfragmente von *fcp2*, *fcp4*, *fcp6* und *fcp12* wurden hierbei als Sonden genutzt und lieferten definierte, distinkte Hybridisierungssignale. Durch Vergleich der mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegele, auf denen neben den RNA Proben ein RNA Größenmarker aufgegeben wurde, und den resultierenden Turboblots der jeweiligen Gele, die mit den verschiedenen Sonden hybridisiert wurden, konnten die Transkriptlängen der verschiedenen Gene bestimmt werden.

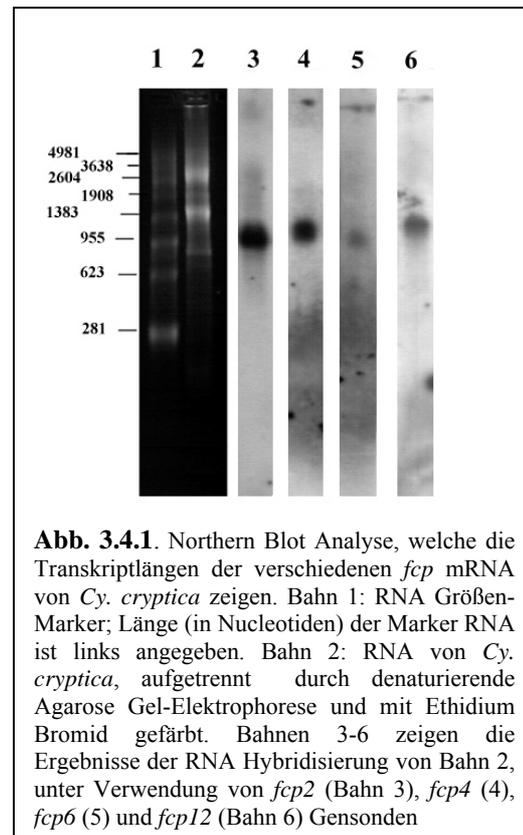


Abb. 3.4.1. Northern Blot Analyse, welche die Transkriptlängen der verschiedenen *fcp* mRNA von *Cy. cryptica* zeigen. Bahn 1: RNA Größen-Marker; Länge (in Nucleotiden) der Marker RNA ist links angegeben. Bahn 2: RNA von *Cy. cryptica*, aufgetrennt durch denaturierende Agarose Gel-Elektrophorese und mit Ethidium Bromid gefärbt. Bahnen 3-6 zeigen die Ergebnisse der RNA Hybridisierung von Bahn 2, unter Verwendung von *fcp2* (Bahn 3), *fcp4* (4), *fcp6* (5) und *fcp12* (Bahn 6) Sonden

Es ergaben sich für die *fcp* Gene folgende Werte:

	<i>fcp2</i>	<i>fcp4</i>	<i>fcp6/7</i>	<i>fcp12</i>
Transkriptlängen	950 Basen	1050 Basen	880 Basen	1150 Basen

Tabelle 3.4.1.: Berechneter Mittelwert aus allen Transkriptlängen Untersuchungen der untersuchten *fcp* Genen

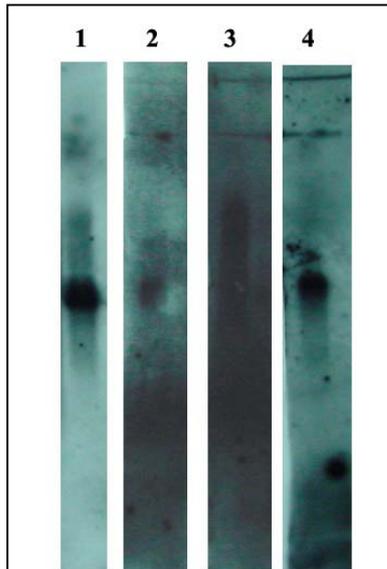


Abb. 3.4.2. Northern Blot Analyse, welche die Transkriptlängen der verschiedenen *fcp* mRNA von *Cyclotella cryptica* zeigen. –Die Bahnen 1-4 zeigen die Ergebnisse der RNA Hybridisierung, unter Verwendung von *fcp2* (Bahn 1), *fcp4* (Bahn 2), *fcp6* (Bahn 3) und *fcp12* (Bahn 4) Gensonden bei längere Exposition (18 Std.) der Röntgenfilme.

Für das Gen *fcp12* wurde die größte Transkriptlänge ermittelt, während das Gen *fcp6* die geringste Transkriptlänge zeigte. Verlängerte Exposition der hybridisierten Nylonmembranen (**Abb. 3.4.2.**) führten zu keinen weiteren Hybridisierungssignalen.

Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte die Schlußfolgerung gezogen werden, daß 1) die verwendeten Gensonden zu spezifischen Hybridisierungssignalen führten und 2) die entsprechenden *fcp* mRNAs in ausreichenden Konzentrationen in der isolierten Gesamt RNA vorlagen, um sie in den weiterführenden Experimenten, in denen die Einflüsse von Lichtqualität, Lichtquantität und eventuelle diurnale/circadiane Expressionsmuster untersucht werden sollten, einzusetzen.

3.5. Einfluß von Lichtquantität auf die steady state *fcp* mRNA Konzentration

Wenn die RNA Fraktionen von Kulturen, die unter Starklicht bzw. Schwachlicht angezogen wurden, in einer denaturierenden Formaldehyd Agarose-Gelelektrophorese gefolgt von Northern Blotting oder Turboblotting eingesetzt wurden oder in RNA Dot Blotting Experimenten verwendet wurden, ergaben sich für die hybridisierten *fcp* RNA Fraktionen unterschiedliche Signalintensitäten. Repräsentative Ergebnisse der Dot Blotting Experimente sind in **Abb. 3.5.1.** zu sehen. Hierbei wurden die Quantifizierungen der steady state *fcp* mRNA Mengen aus RNA Dot Blots vorgenommen, indem eine gleiche Menge RNA in Dot Blotting Experimenten eingesetzt und mit einem 18S rDNA Fragment hybridisiert wurde. Das 750 bp Fragment der 18S rDNA Gen von *Cyclotella cryptica*, welches aus chromosomaler DNA amplifiziert wurde, ergab in allen Proben fast die gleichen Signalintensitäten, unabhängig

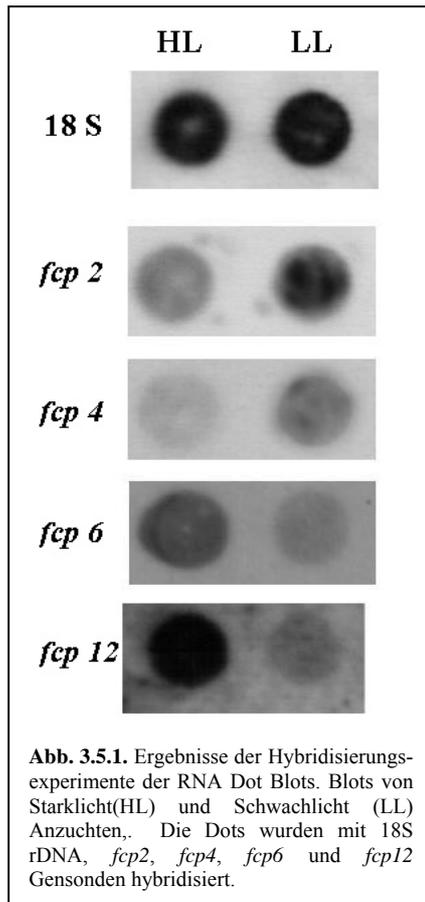


Abb. 3.5.1. Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente der RNA Dot Blots. Blots von Starklicht(HL) und Schwachlicht (LL) Anzuchten. Die Dots wurden mit 18S rDNA, *fcp2*, *fcp4*, *fcp6* und *fcp12* Gensonden hybridisiert.

vom Lichtklima, unter dem die Anzucht der Kulturen erfolgte (**Abb. 3.5.1.**). Es konnte daher als interner Standard benutzt werden. In allen folgenden Experimenten wurden daher die *fcp* mRNA Signale auf die entsprechenden 18S rRNA Signale normiert.

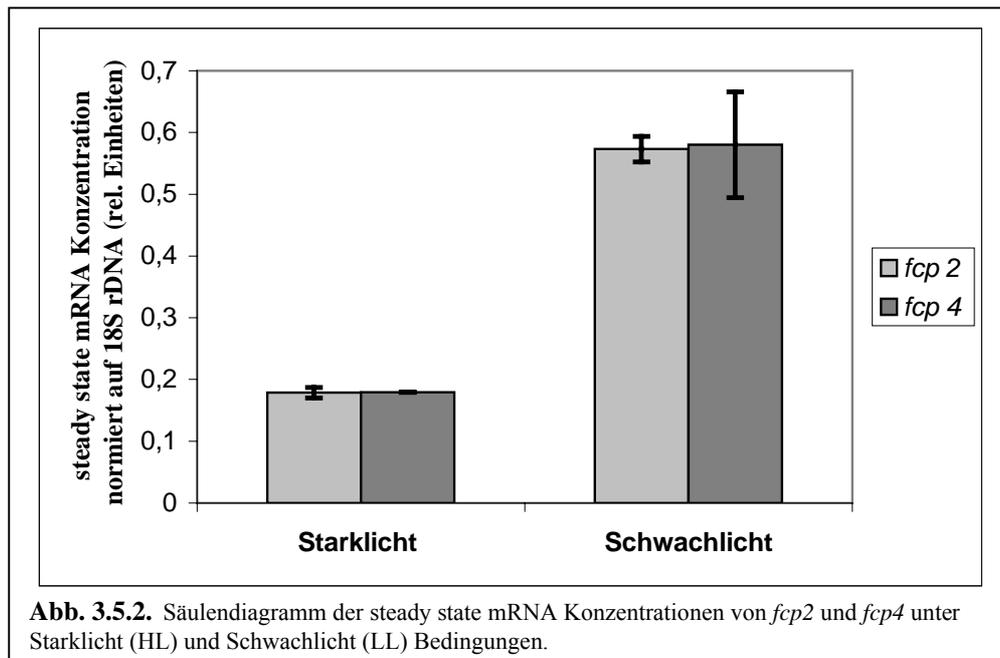
Aus den Dot Blotting Experimenten ergaben sich bei der Auswertung mittels Analyse mit *Easy Win* Program (Windows) unterschiedliche Pixelvolumen, deren Mittelwerte in der folgenden Tabelle zusammengefaßt wurden:

	<i>fcp2</i>	<i>fcp4</i>	<i>fcp6</i>	<i>fcp12</i>
LL	312.200 ± 11.300 (100)	316.000 ± 46.703 (100)	42.600 ± 800 (22)	24.800 ± 15.700 (26)
HL	101.885 ± 4.800 (37)	102.305 ± 0 (32)	190.000 ± 2.700 (100)	56.300 ± 3.700 (100)

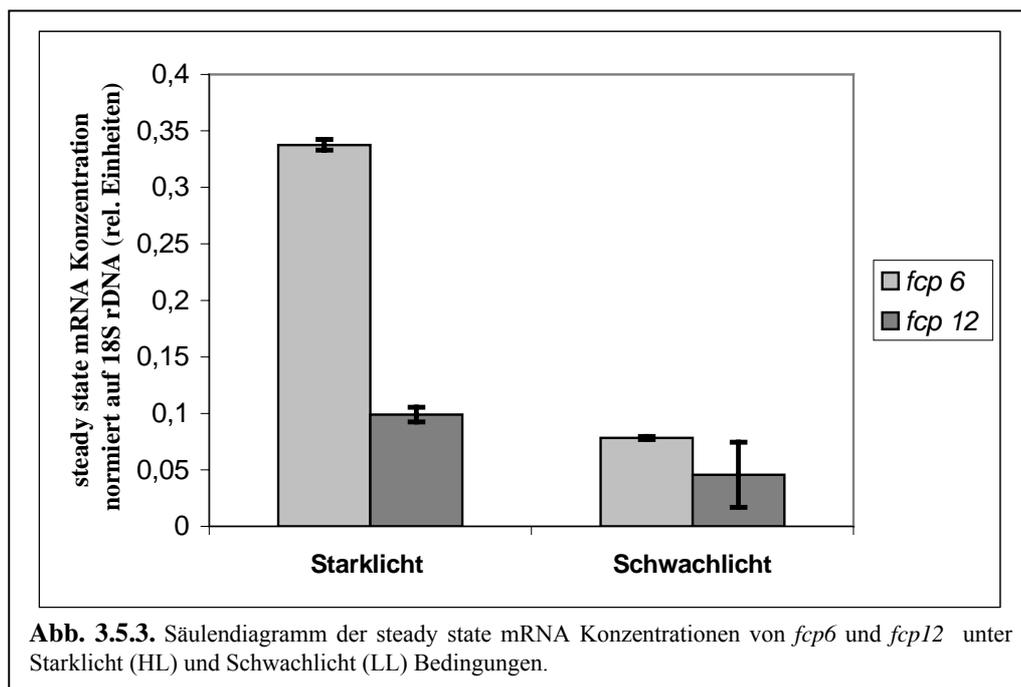
Tabelle 3.5.1. Relative Signalintensitäten der Dot Blots. Hier werden die gemittelten Pixelvolumen der Dots aus den Dot Blotting Experimenten samt der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Die Werte repräsentieren die Pixelvolumen der Dots aus Schwachlicht (LL) und Starklicht (HL) angezogenen Kulturen isolierten Gesamt RNA, die mit spezifischen Gensonden hybridisiert wurden. Die Zahlen in Klammern entsprechen % Angaben, wobei der höhere Signalintensitätswert bei Anzucht unter LL, bzw. HL gleich 100% gesetzt wurde.

Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in den Graphen **Abb. 3.5.2. – 3.5.3.** dargestellt.

Aus diesen Daten ist klar zu erkennen, daß Kulturen, die unter Starklicht-Bedingungen angezogen wurden, eine Reduktion der steady state mRNA Konzentrationen von *fcp2* und *fcp4* von etwa 60% erfahren, verglichen mit den *fcp* mRNA Konzentrationen von Kulturen, welche unter Schwachlicht kultiviert wurden. Auf der anderen Seite wurden für *fcp6* und *fcp12* geringere steady state mRNA Signale für unter Schwachlicht angezogene Kulturen gemessen und ungefähr 4fach höhere Werte für Zellen, die unter Starklicht-Bedingungen



angezogen worden waren (**Tab. 3.5.1.**). Normiert auf die 18S rRNA Signale ergaben sich die gleichen Verhältnisse für die steady state *fcp* mRNA Konzentrationen der verschiedenen Gene, wie in den Säulendiagrammen **Abb. 3.5.2.** und **Abb. 3.5.3.** zu sehen ist.



3.6. RT-PCR Experimente

Die RNA-Dot Blotting Experimente zeigten, daß die Lichtintensität Einfluß auf die steady state mRNA Konzentration der untersuchten *fcp* Gene hatten. Sie wurden jedoch mit Gesamt RNA durchgeführt, was eventuell zu Fehleinschätzungen hinsichtlich der gemessenen Signalintensitäten infolge unspezifischer Sondenbindung führen könnte. Um diese mögliche Fehlerquelle ausschließen zu können, wurden als zweite unabhängige Methode zu Quantifizierung des steady state *fcp* mRNA Konzentration RT-PCR Experimente durchgeführt. Die RT-PCR Experimente wurden exemplarisch mit unter Starklicht und Schwachlicht angezogenen Kulturen durchgeführt. RT-PCR vermittelte Visualisierung und Quantifizierung der Transkripte wurde dazu verwendet, um die Resultate aus Northern Blotting und RNA Dot Blotting Experimente zu bestätigen. Dafür wurde Gesamt RNA von Schwachlicht oder Starklicht angezogenen Kulturen isoliert und aus ihnen poly(A)⁺ mRNA isoliert.

Beim Aufreinigen der Gesamt-RNA mittels des Kits „*Oligotex-dT Purification of poly(A)⁺ mRNA from total RNA*“ (Qiagen, Hilden, Germany) wurde jedoch klar, das nur geringe Mengen an poly(A)⁺ mRNA aus den Proben der Gesamt RNA zu erhalten waren, was die Anzahl an Wiederholungen beschränkte. Dennoch waren genug RT-PCR Experimente möglich, um eine statistische Auswertung zu machen.

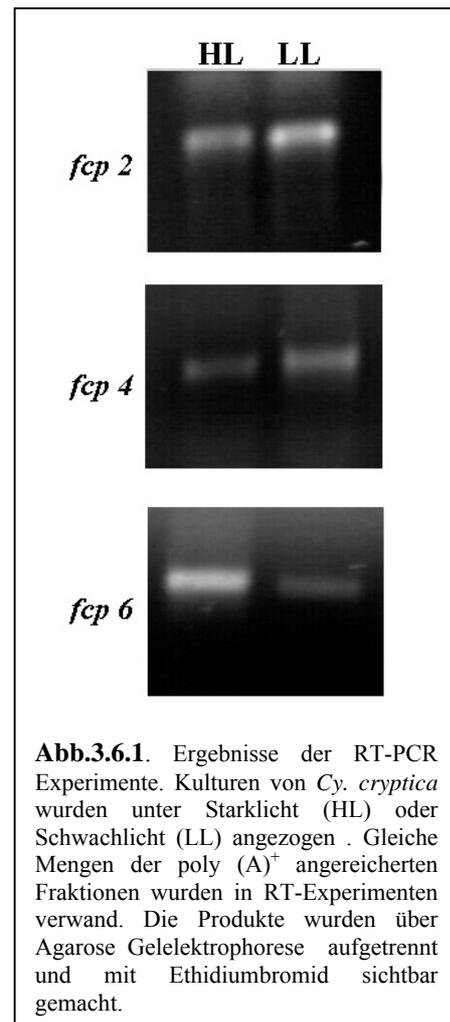
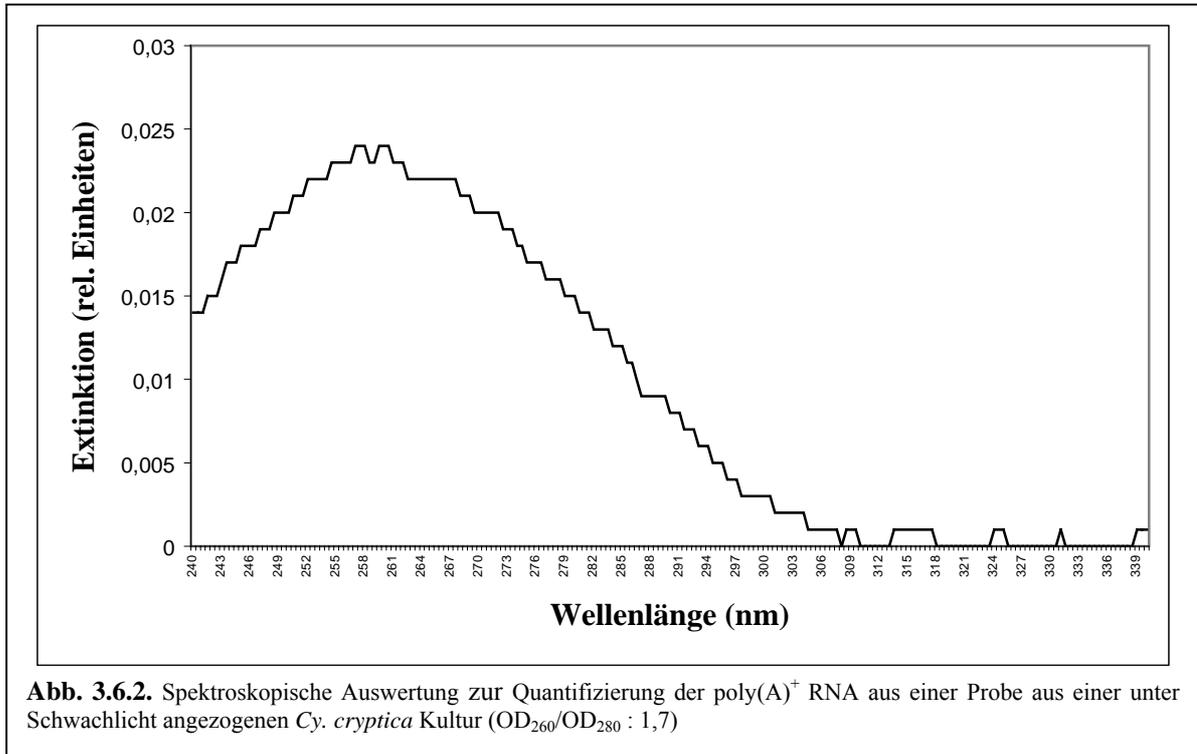


Abb.3.6.1. Ergebnisse der RT-PCR Experimente. Kulturen von *Cy. cryptica* wurden unter Starklicht (HL) oder Schwachlicht (LL) angezogen. Gleiche Mengen der poly (A)⁺ angereicherten Fraktionen wurden in RT-Experimenten verwendet. Die Produkte wurden über Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Im Anschluß wurden definierte Bereiche der Transkripte von *fcp2*, *fcp4* und *fcp6* Gene in cDNA umgeschrieben und anschließend durch PCR amplifiziert. Die poly(A)⁺ Ausbeute sollte laut Anleitung bei etwa 10% der eingesetzten Gesamt RNA Menge liegen, welche bei maximal 250 µg Einsatzmenge liegen sollte. Im Schnitt erhielt man 20-40 µg/ml poly(A)⁺ mRNA aus den aufgereinigten Ansätzen. (sh. **Abb. 3.6.2.**)



Die Amplifikationsprodukte zeigten die erwarteten Größen von ungefähr 400 bp (*fcp2*), 350 bp (*fcp4*) und 550 bp (*fcp6*). Die RT-PCR und anschließende Amplifikation und der Nachweis von *fcp12* Transkripten führte zu keinen verwertbaren Ergebnissen. Kontrollexperimente, in welchen der RT-Schritt ausgelassen wurde, ergaben keine Amplifikationsprodukte, was zeigte, daß die PCR-Produkte aus den in cDNA umgeschriebenen mRNAs hervorgegangen waren und die poly(A)⁺ mRNA Fraktionen frei von DNA waren.

Wie in **Abb. 3.6.1.** gesehen werden kann, ergab die quantitative Auswertung, daß zweimal mehr RT-PCR-Produkt von *fcp2* und *fcp4* Transkripten generiert wurde, wenn poly(A)⁺ angereicherte RNA Fraktionen von unter Schwachlicht angezogenen Kulturen als Template revers transkribiert und amplifiziert wurden, während fünfmal mehr Produkt der *fcp6* Transkripte bei den poly(A)⁺ angereicherten RNA Fraktionen der unter Starklicht kultivierten Kulturen zu finden war. Diese Ergebnisse bestätigten die Tendenzen der RNA Dot Blotting Experimente, wenn auch nicht exakt mit den gleichen Mengenwerten. Dennoch ist klar zu erkennen, daß die Gene *fcp2* und *fcp4* Gencluster unter Schwachlicht höhere steady state

mRNA Konzentrationen aufweisen, und unter Starklicht größere Transkriptmengen von *fcp6* produziert wurden als unter Schwachlicht.

In den weiterführenden Untersuchungen wurde RNA Dot Blotting als leichter handhabbare und billigere Methode verwendet.

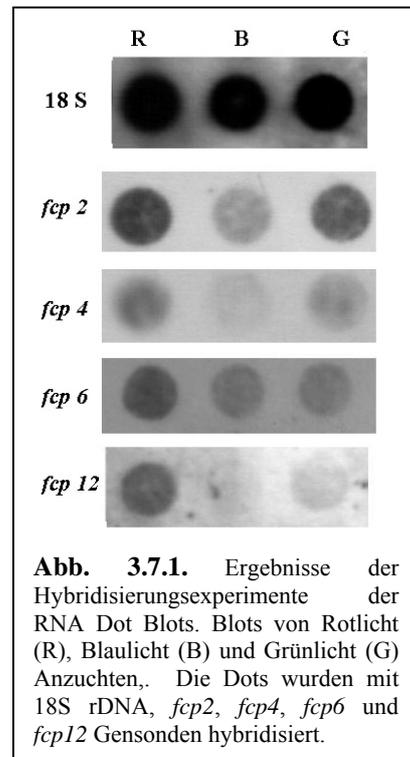
3.7. Einfluß von Lichtqualität auf die steady state *fcp* mRNA Konzentration

Im allgemeinen ergaben sich für alle untersuchten *fcp* Gene die höchsten steady state mRNA Konzentrationen für Kulturen, die unter Rotlicht angezogen wurden, gefolgt von Grünlicht, während die *fcp* Transkriptmengen von unter Blaulicht kultivierten Zellen von *Cyclotella cryptica* am geringsten waren (sh. Tab. 3.7.1., Abb. 3.7.1 und Abb. 3.7.2.).

	<i>fcp1/fcp2/fcp3/fcp5</i>	<i>fcp4</i>	<i>fcp6/7</i>	<i>fcp12</i>
RL	123.000 ± 6.600 (100)	278.818 ± 64.500 (100)	150.000 ± 13.000 (100)	113.00 ± 5.000 (100)
GL	96.100 ± 18.700 (78)	140.000 ± 37.000 (57)	26.400 ± 2.100 (18)	39.400 ± 3.100 (34)
BL	53.000 ± 26.200 (43)	119.000 ± 44.000 (45)	2.200 ± 1700 (1,5)	20.700 ± 2.100 (18)

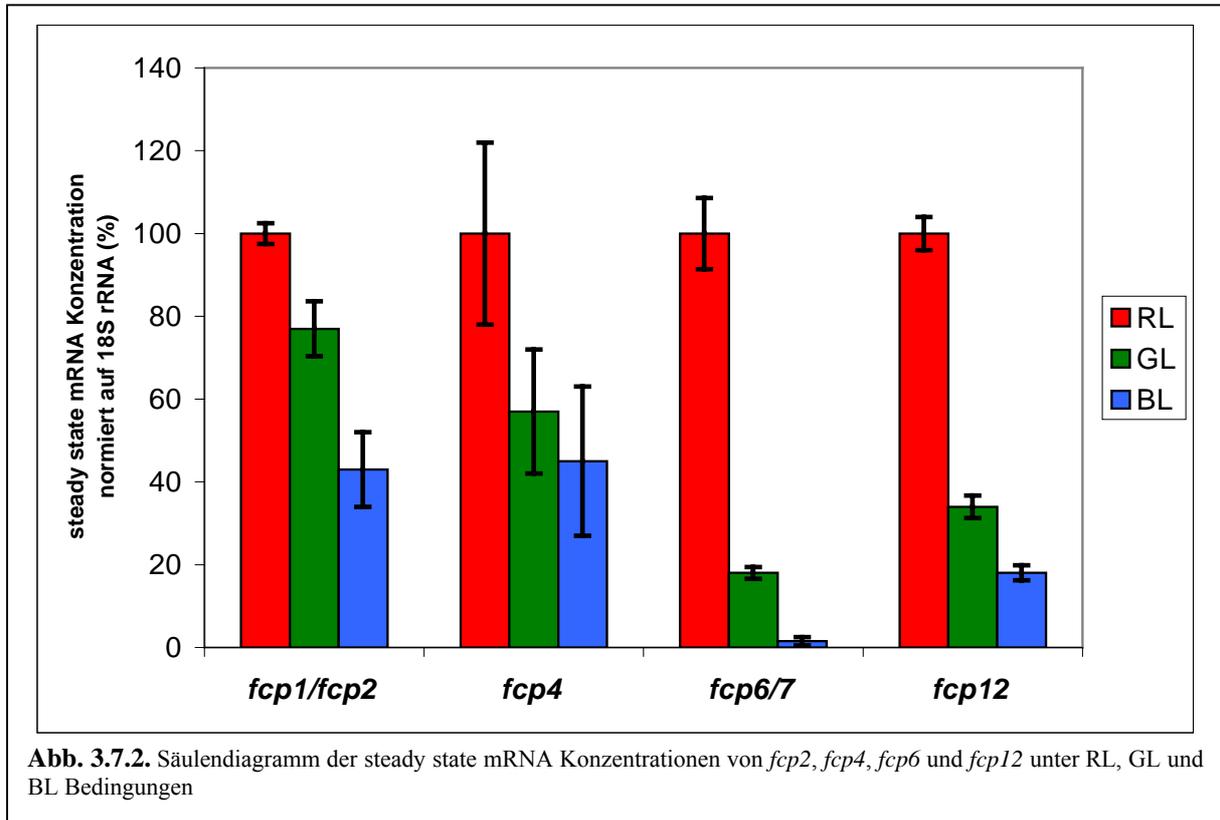
Tabelle 3.7.1. Relative Signalintensitäten der Dot Blots. Hier werden die gemittelten Pixelvolumen der Dots aus den Dot Blotting Experimenten samt der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Die Werte repräsentieren die Pixelvolumen der Dots aus Rotlicht (RL), Blaulicht (BL) und Grünlicht (GL) angezogenen Kulturen isolierten Gesamt RNA, die mit spezifischen Gensonden hybridisiert wurden. Die Zahlen in Klammern entsprechen % Angaben, wobei der höchste Signalintensitätswert bei Anzucht unter RL gleich 100% gesetzt wurde.

Während bei allen *fcp* Genen die höchsten Konzentrationen an steady state mRNA unter Rotlicht-Anzucht gemessen werden konnten und dieser Wert für den Vergleich mit den anderen Anzuchten als 100 % Wert angenommen wurde, lag für *fcp2* die Konzentration der steady state mRNA von unter Grünlicht angezogenen Kulturen bei 78%, während für die gleichen Proben für *fcp4* mit 57% nur etwa die Hälfte des Wertes der Rotlichtanzuchten erreicht wurden. Die Konzentrationen für *fcp6* waren die niedrigsten, weniger als 18 % der Rotlicht-Werte, während die für *fcp12* gemessenen Werte mit 34 % wieder etwas höher lagen. Ein ähnliches Muster zeigt



sich bei den Blaulichtanzuchten, die generell die niedrigsten Konzentrationen an steady state *fcp* mRNA zeigten. Während die Werte bei *fcp2* mit 43% und *fcp4* mit 45% sich sehr ähnelten und gegenüber den mRNA Konzentrationen der Rotlichtanzuchten etwa relativ hoch lagen,

fielen die Werte bei *fcp12* um das 5fache, und bei *fcp6* sogar um das 50fache. Auffallend ist hierbei, daß die Konzentrationsunterschiede an steady state *fcp* mRNA der unterschiedlich belichteten Kulturen für das *fcp4* Gen nicht so markant sind wie bei den anderen untersuchten *fcp* Genen.

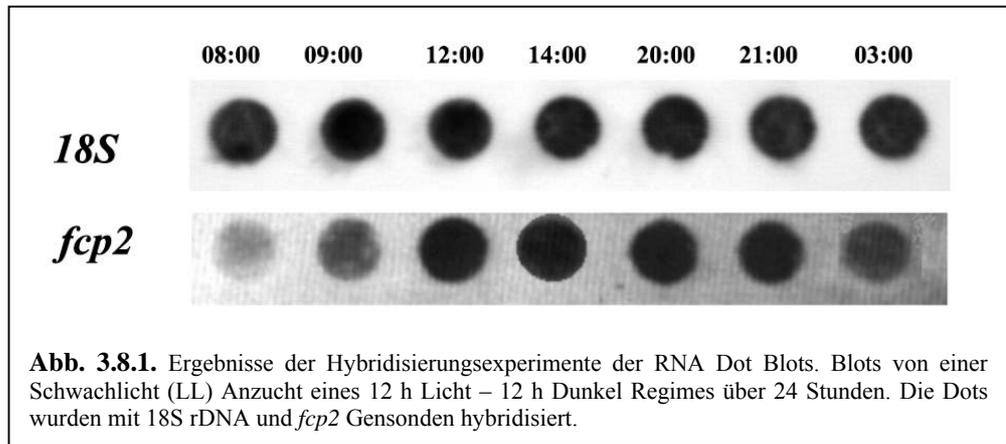


3.8. Diurnales Expressionsmuster

In einem vorläufigen Experiment sollte untersucht werden, ob sich die steady state mRNA Konzentrationen der *fcp* Gene über den Tag hinaus änderten und somit auf diurnale, bzw. circadiane Rhythmik hinweisen. Hierzu wurden die diurnalen Transkriptmengen der Genclusters

fcp2, *fcp4*, *fcp6*
und *fcp12*
untersucht.

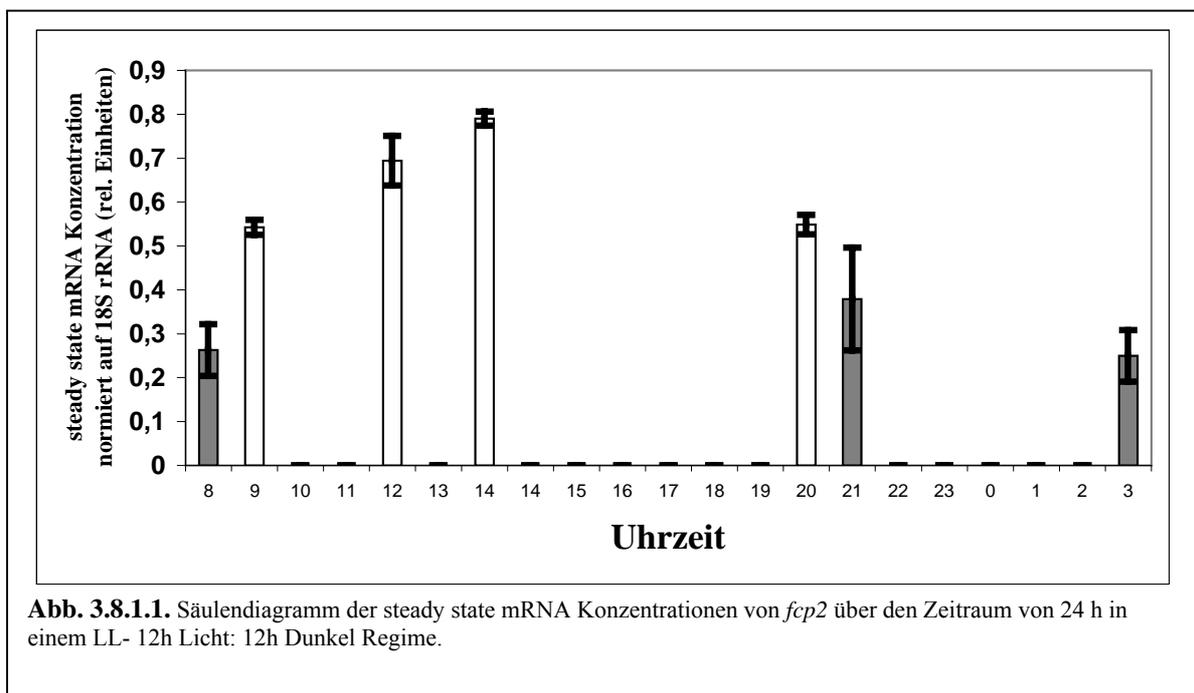
Dazu wurden
Aliquots in
regelmäßigen
Intervallen über
eine 24 h



Periode aus Kulturen eines 12 h Licht: 12 h Dunkel Regimes entnommen. RNA Dot Blot Analysen zeigten, daß die steady state *fcp* mRNA Konzentrationen über den Tag variierten und einem diurnalen Rhythmus unterlagen. Die Hybridisierungssignale der 18S rDNA Transkripte blieben über den untersuchten Zeitraum fast gleich und wurde als interner Standard verwendet. Die steady state *fcp* mRNA Konzentrationen aller untersuchten Gene stiegen mit dem Einsetzen des Lichtes an, erreichten Maxima etwa 6 h nach dem Beginn der Lichtphase und nahmen danach wieder ab.

3.8.1. Diurnales Expressionsmuster von *fcp2*

Der noch im Dunkeln gemessene erste Wert um 8:00 Uhr lag mit einem Faktor von ungefähr 0,25 relativer Einheiten sehr niedrig, verdoppelte sich aber schon eine Stunde später mit Beginn der Lichtphase. Das Maximum sechs Stunden nach Beginn der Lichtphase wies etwa die 4fache Konzentration an steady state *fcp* mRNA Konzentration auf. In der Dunkelphase sank der Wert letztlich wieder auf den gemessenen Minimalwert von ungefähr 0,25 Einheiten ab (Abb. 3.8.1.1.).



3.8.2. Invertiertes diurnales Expressionsmuster von *fcp2*

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Rhythmik der steady state *fcp* mRNA Konzentration vom Licht als Zeitgeber geleitet wird, wurde eine Invertierung der Licht- und Dunkelphase bei der Anzucht einer weiteren *Cyclotella cryptica* Kultur angewandt. Dieser experimentelle Aufbau führte zu dem gleichen Ergebnis (sh. **Abb. 3.8.2.1.**). Auch hier stieg die Konzentration der steady state *fcp2* mRNA mit Beginn der Beleuchtung an und erreichte etwa 6 Stunden danach ein Maximum, um anschließend zum Abend wieder abzusinken. Die gemittelten steady state *fcp2* mRNA Konzentrationen vervierfachten sich ebenfalls vom ersten Messpunkt bis zum Maximum am Mittag. Allerdings fiel bei diesem Versuchsansatz die Konzentration nicht so schnell und deutlich ab, wie in der vorausgegangenen Untersuchung.

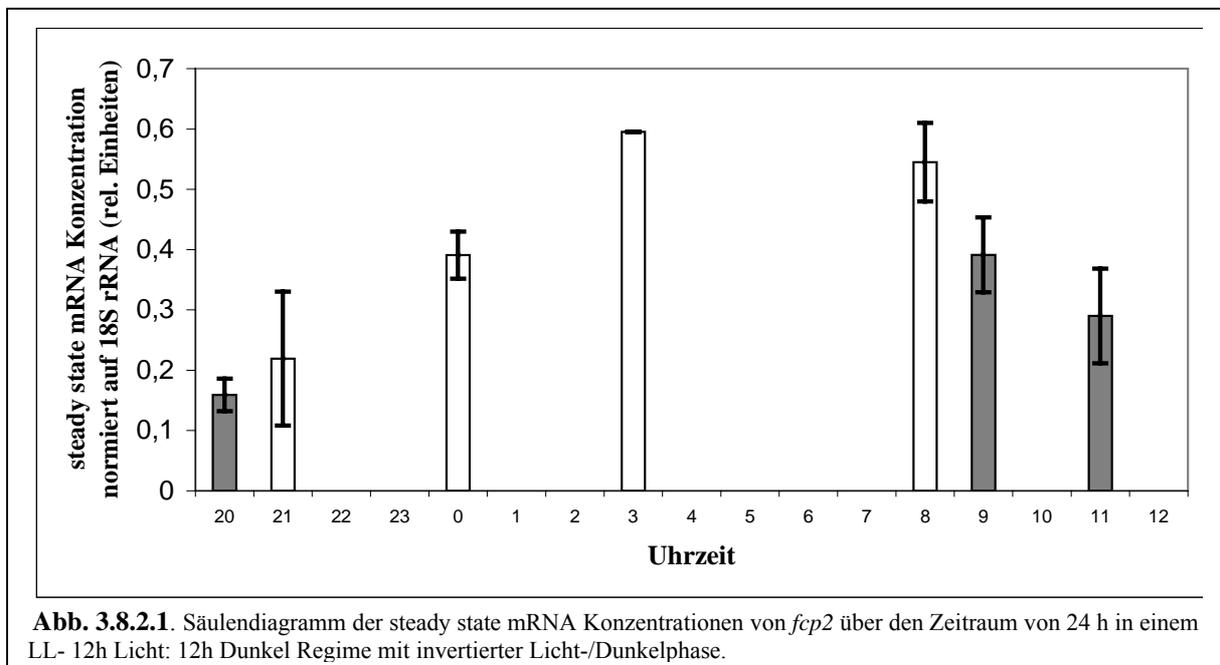
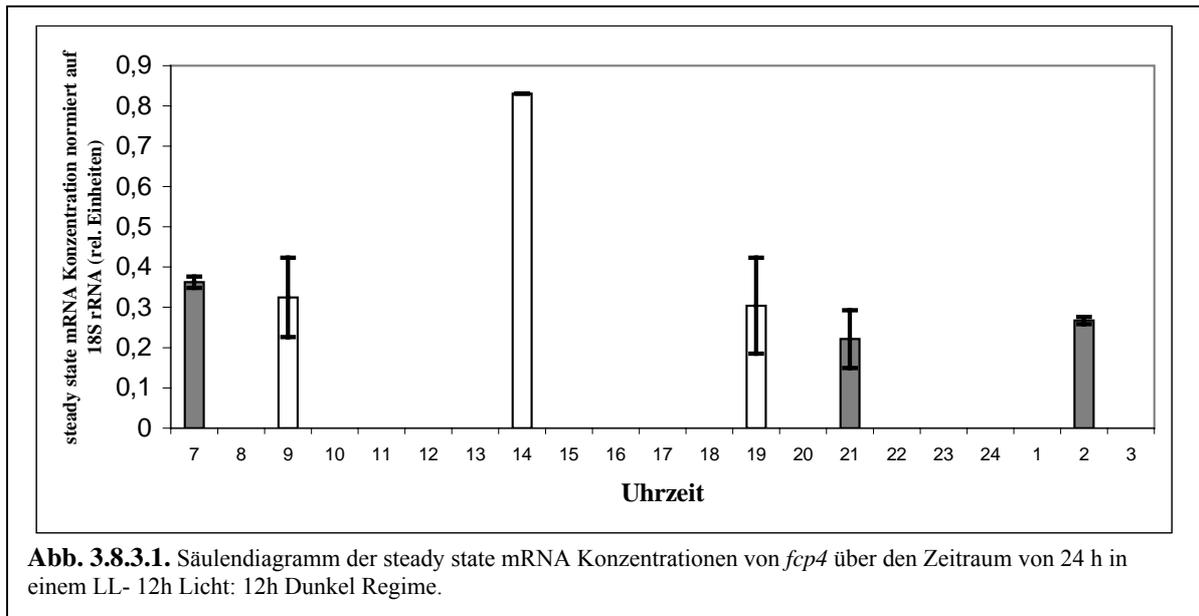


Abb. 3.8.2.1. Säulendiagramm der steady state mRNA Konzentrationen von *fcp2* über den Zeitraum von 24 h in einem LL- 12h Licht: 12h Dunkel Regime mit invertierter Licht-/Dunkelphase.

3.8.3. Diurnales Expressionsmuster von *fcp4*

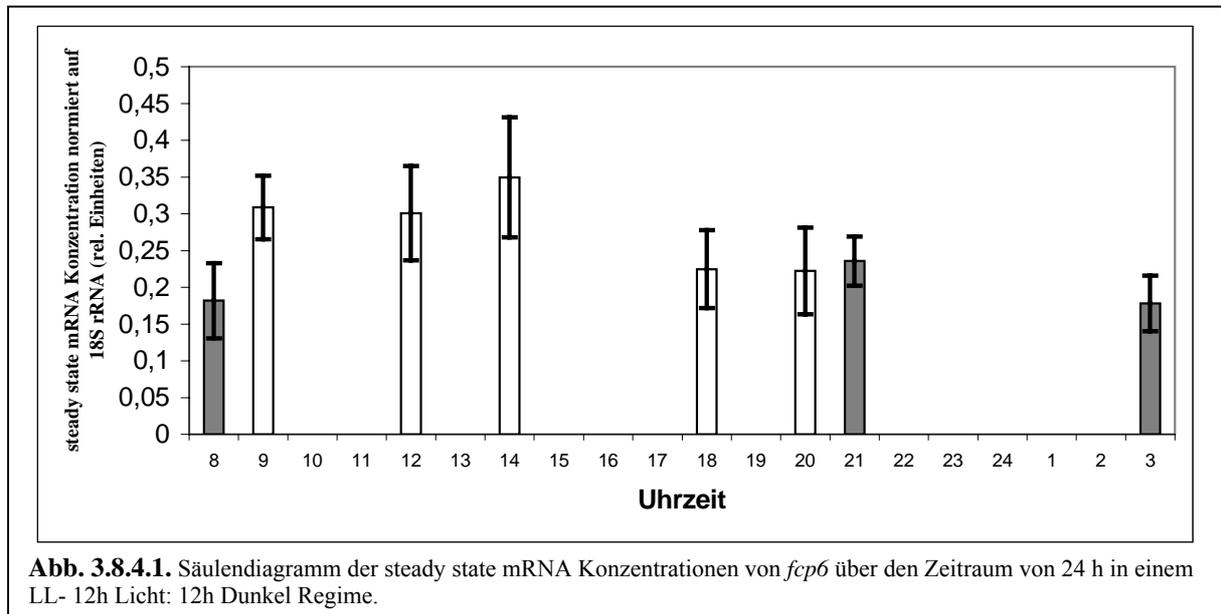
Das Expressionsmuster der steady state mRNA Konzentration von *fcp4* erwies sich als relativ schwierig zu beobachten und mußte in einem separaten Versuch mit sechs Messpunkten innerhalb von 24 Stunden untersucht werden. Dennoch ließ sich letztlich beobachten, daß die Schwankung der Konzentration der steady state *fcp4* mRNA in etwa dem Muster von *fcp2* entsprach (sh. **Abb.3.8.3.1.**).



Einzigster Unterschied war, daß die steady state *fcp4* mRNA Konzentration nach ihrem Maximum 6 Stunden nach Beginn der Lichtphase stärker und schneller absank, als das bei dem *fcp2* Expressionsmuster der Fall war. So sank die mRNA Konzentration bei *fcp4* bereits fünf Stunden nach dem Erreichen ihres Tagesmaximums bereits wieder auf ein Drittel des Maximalwertes ab, während unter *fcp2* nach sechs Stunden die steady state *fcp2* mRNA noch bei 60% des maximalen Tageswertes lag.

3.8.4. Diurnales Expressionsmuster von *fcp6*

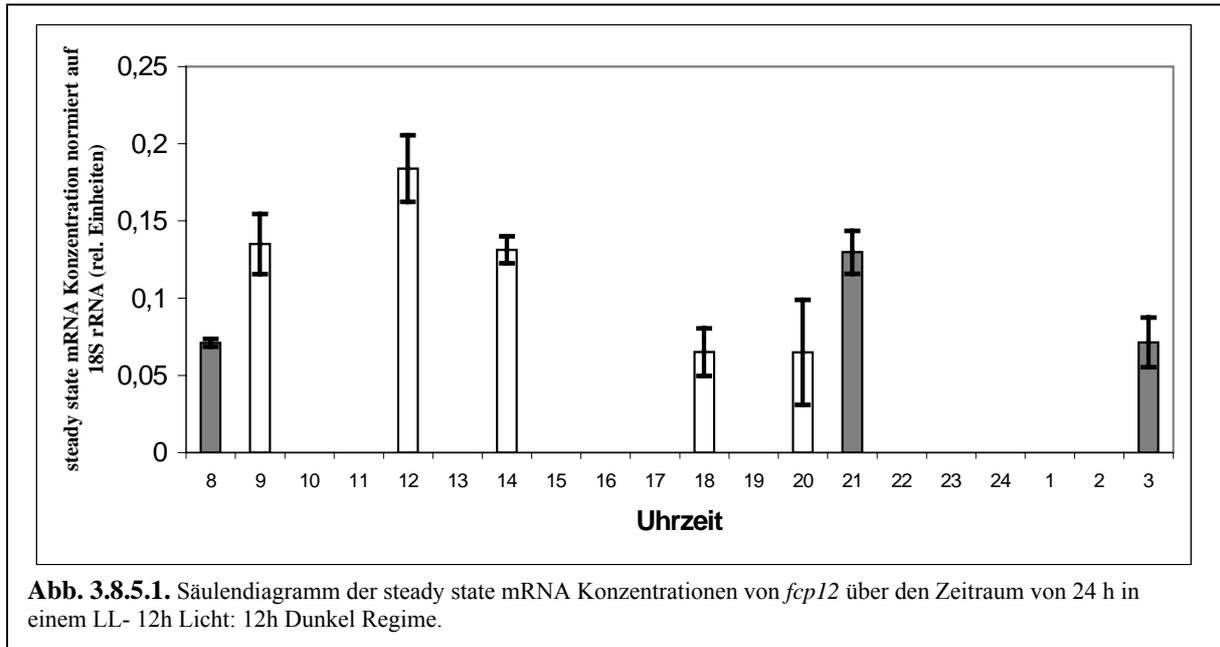
Die diurnalen Expressionsmuster von *fcp6* unterschied sich geringfügig von den Ergebnissen der steady state mRNA Konzentrationen von *fcp2*. Der Anstieg der steady state mRNA Konzentration war bei *fcp6* nicht so deutlich wie unter *fcp2*, dennoch erreichte auch bei *fcp6*



die höchste Konzentration etwa 6 Stunden nach Beginn der Lichtphase, und sank dann wieder bis zur Dunkelphase ab. Allerdings war hier der Unterschied zwischen dem ersten gemessenen Wert und dem Maximalwert nicht so hoch wie bei den zuvor untersuchten Genen. Der Wert von 14:00 Uhr war nur etwa doppelt so hoch wie der um 8:00 Uhr gemessene Wert. Insgesamt wirkten die Schwankungen bei der steady state *fcp6* Konzentration schwächer als unter den vorangegangenen Untersuchungen.

3.8.5. Diurnales Expressionsmuster von *fcp12*

Die Oszillation der steady state *fcp12* mRNA Konzentration folgte im großen und ganzem dem aus den vorangegangenen Untersuchungen bekannten Muster. Allerdings wurde der Höchstwert innerhalb der untersuchten 24 Stunden nicht etwa 6 Stunden nach Beginn der Lichtphase gemessen, sondern bereits nach vier Stunden. Die Konzentration der mRNA lag um 12:00 Uhr etwa 3mal höher als um 8:00 Uhr. Die Konzentration nahm anschließend wieder ab, bis sie um 18:00 Uhr mit einem Faktor von 0,06 ihren geringsten Wert erreichte. Danach verdoppelte sich die Konzentration um 21:00 Uhr wieder, um danach erneut bis 03:00 Uhr auf etwa die Hälfte abzusinken (sh. **Abb. 3.8.5.1.**).

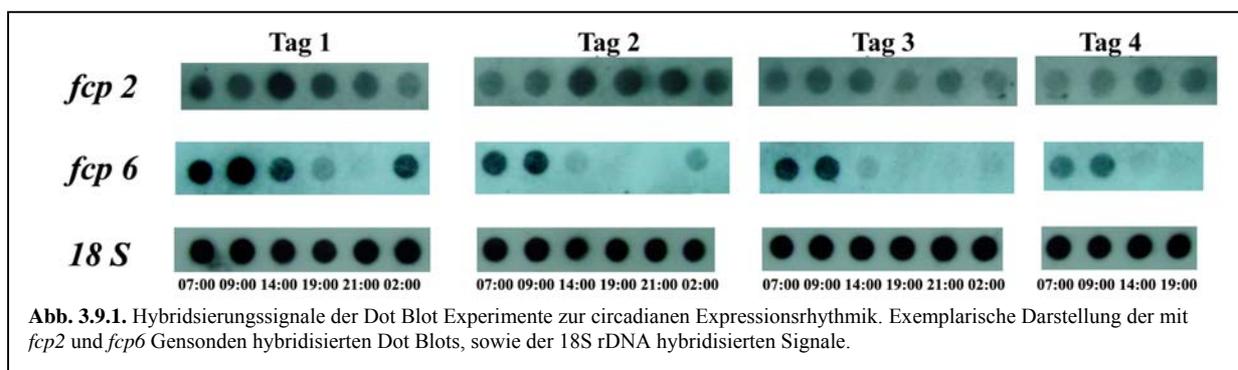


Die Untersuchungen zu diurnalen Expressionsmustern lieferten für alle untersuchten Gene ähnliche Ergebnisse. Es war daher wahrscheinlich, daß 1) mindestens ein diurnales Expressionsmuster der untersuchten *fcp* Gene bei *Cyclotella cryptica* vorlag und 2) daß bei diesem Expressionsmuster Licht als *Zeitgeber* wirkte.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Schwankungen der steady state *fcp* mRNA nur einem diurnalen Expressionsmuster folgten, oder ob die Oszillation vielleicht sogar circadian reguliert wurde. Diese Frage sollte in einem weiteren Satz von Experimenten geklärt werden.

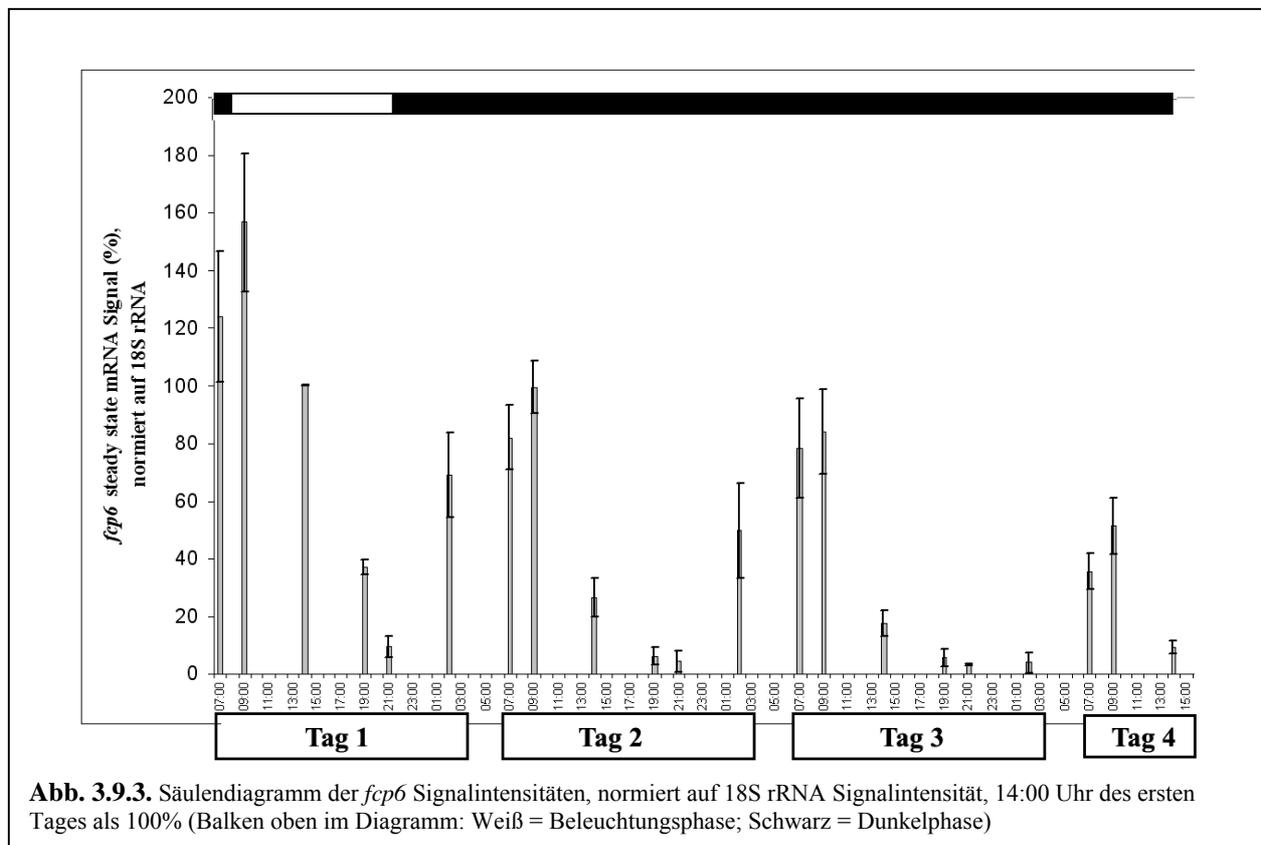
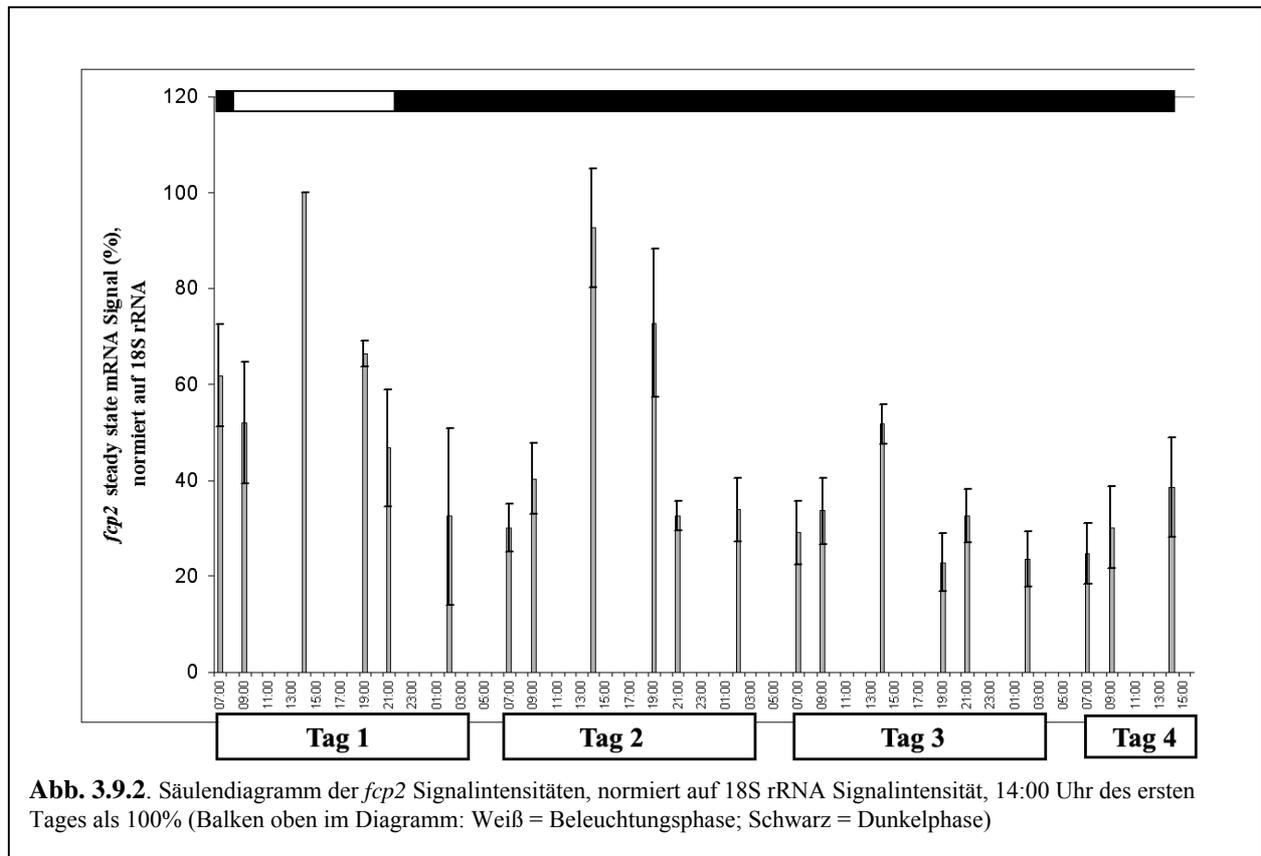
3.9. Circadiane Expressionsmuster

Um zu untersuchen, ob die steady state mRNA Konzentrationen der verschiedenen Gencluster einem circadianen Rhythmus unterlagen, wurden Aliquots zu bestimmten Zeitpunkten über eine Periode von 96 h aus Kulturen von *Cycotella cryptica* entnommen. Die Kulturen wurden in einem 12 h Licht: 12 h Dunkelregime vor Beginn des eigentlichen Experimentes und am ersten Probenstag angezogen und für die folgenden drei Tage unter völliger Dunkelheit weiter kultiviert. RNA Dot Blot Analysen zeigten, daß die Intensitäten der Hybridisierungssignale, und damit letztendlich auch die steady state *fcp2* mRNA Konzentrationen, über den Verlauf der vier Tage variierten, während die Intensität der Hybridisierungssignale für die 18S rDNA Transkripte ungefähr gleich blieb (Abb. 3.9.1.).



Die Ergebnisse für die unterschiedlichen Gencluster ähnelten sich sehr. Die steady state *fcp2* mRNA Konzentration erhöhte sich mit Einsetzen der Beleuchtung, erreichte ihr Maximum etwa sechs Stunden nach Beginn der Lichtphase und sank danach wieder ab, entsprechend der Ergebnisse aus den vorherigen Experimenten zum diurnalen Expressionsmuster (sh. 3.8.). Die gemessenen Werte wurden gemittelt und auf die 18S rDNA Signalintensität normiert.

Für *fcp2* und *fcp6* ergaben sich folgende Resultate:



Wie in den Diagrammen zu sehen ist, unterschieden sich die Expressionsmuster der untersuchten Gene etwas während des ersten Versuchstages. Die *fcp6* Transkriptmenge war am Ende der Dunkelphase schon höher und erreichte ihr Maximum gleich nach dem Einsetzen der Beleuchtung um 9:00 Uhr. Der Anstieg von 7:00 auf 9:00 Uhr war weniger ausgeprägt und signifikant. Danach nahm die relative Menge der *fcp6* mRNA ab und am späten Abend und in der frühen Nacht wurden sehr niedrige Werte, verglichen mit denen um 02:00 Uhr des gleichen Tages, gemessen. Während der nächsten drei Tage in Dunkelheit wurde diese Rhythmik weiter beobachtet. Ähnlich wie in der Untersuchung der steady state *fcp2* Konzentrationen nahm auch bei *fcp6* die Amplitude stetig ab.

Es bleibt festzuhalten, daß bei beiden steady state mRNA Konzentrationsuntersuchungen eine circadiane Expressionsrhythmik zu beobachten war.

Bei den Untersuchungen der Expression der *fcp4* und *fcp12* Gencluster zeigte sich, daß die Unterschiede der Ergebnisse, also die p-Werte der t-Test-Analyse nicht signifikant genug waren, um auch für diese Gene zweifelsfrei eine circadiane Rhythmik nachweisen zu können (Abb. 3.9.4. und Abb. 3.9.5.).

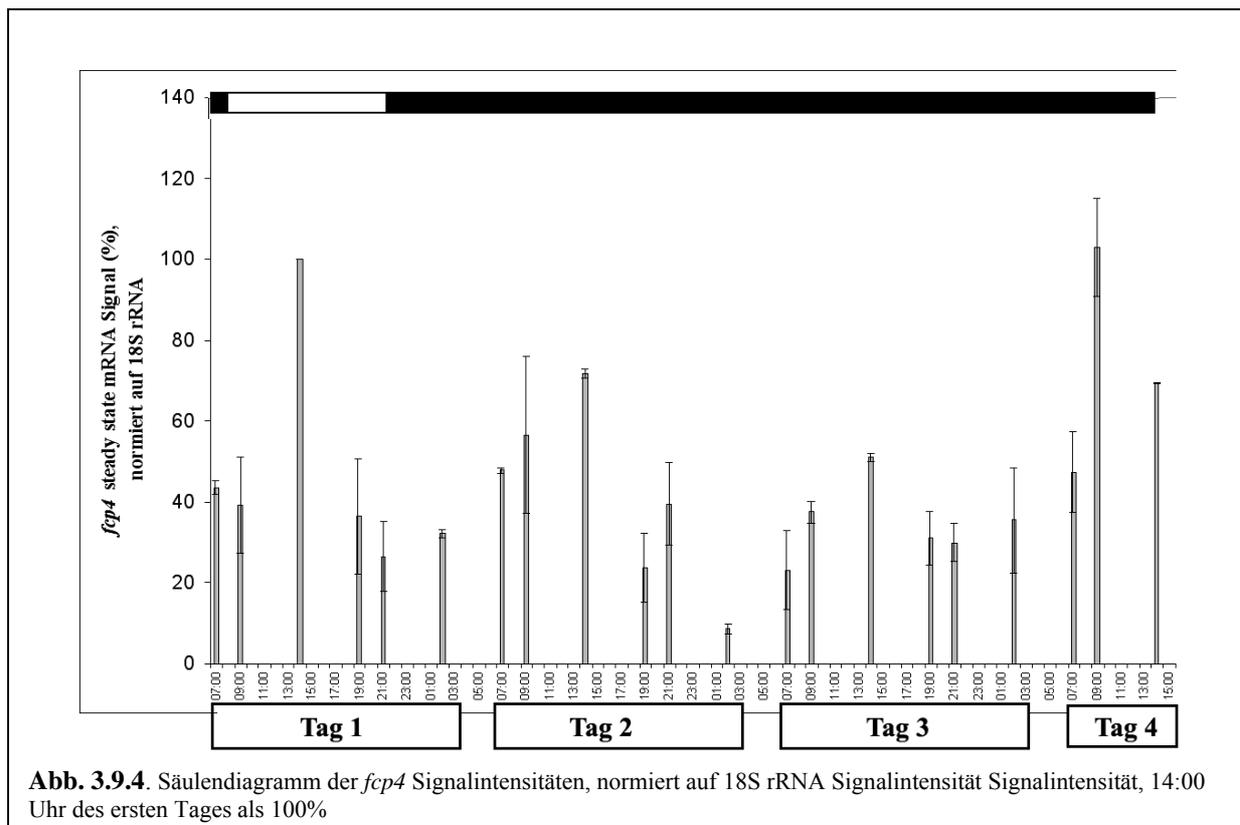


Abb. 3.9.4. Säulendiagramm der *fcp4* Signalintensitäten, normiert auf 18S rRNA Signalintensität, 14:00 Uhr des ersten Tages als 100%

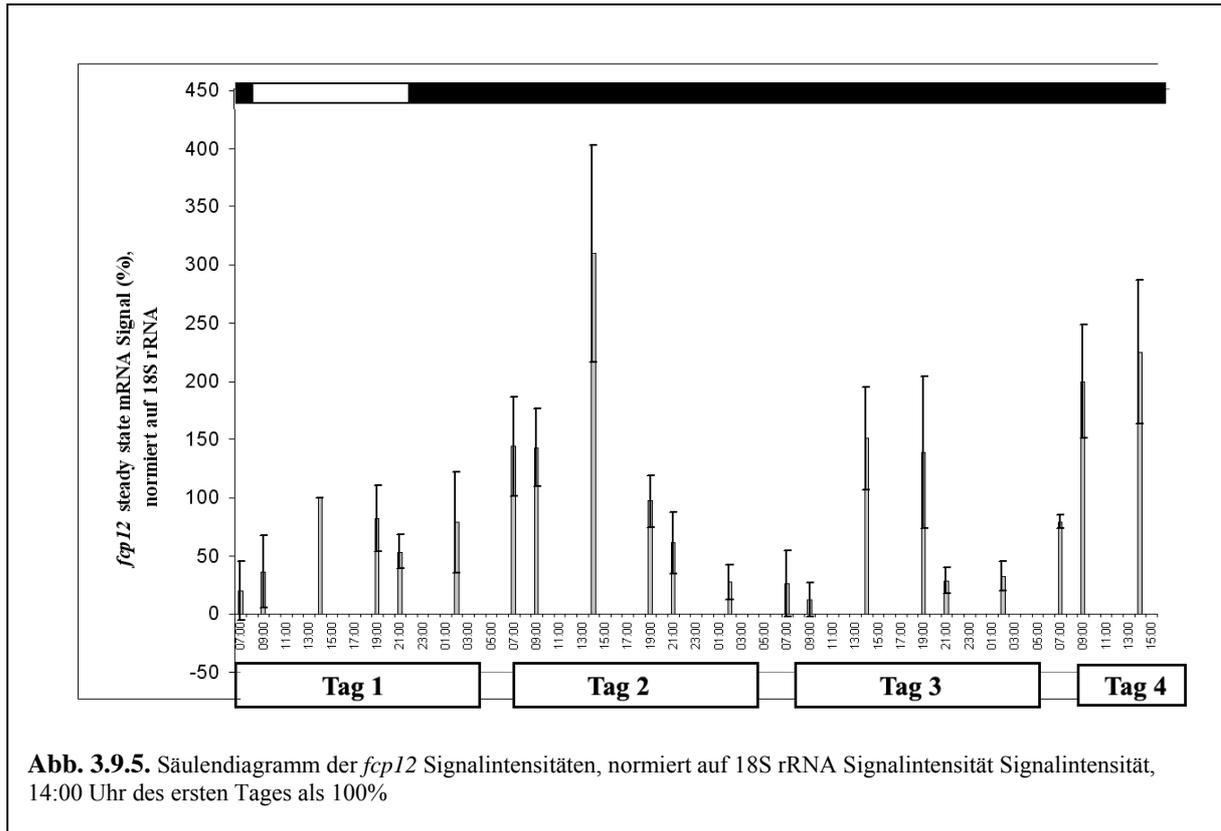


Abb. 3.9.5. Säulendiagramm der *fcp12* Signalintensitäten, normiert auf 18S rRNA Signalintensität, 14:00 Uhr des ersten Tages als 100%

Wie in den Diagrammen zu sehen ist, existierte auch für die Gene *fcp4* und *fcp12* ein Rhythmus in der Expression ihrer Transkripte, allerdings wichen die gemessenen Werte stark von den anderen Beobachtungen ab.

Bei den Messungen der *fcp4* steady state mRNA Konzentrationen zeigte sich am ersten Tag noch das von den Untersuchungen zu *fcp2* bekannte Muster. Allerdings blieb die Transkriptmenge zuerst gleich (07:00 Uhr Wert und 09:00 Uhr Wert relativ gleich), erreichte aber dennoch etwa sechs Stunden nach Beginn der Beleuchtungsphase ein Maximum und sank danach wieder ab. Für die folgenden drei Tage in Dunkelheit war zwar eine Amplitude zu erkennen, allerdings war diese nicht so ausgeprägt wie unter den zuvor untersuchten Genclustern, und sie nahm nur die ersten zwei Tage ab, um am letzten Versuchstag wieder anzusteigen.

Für die relativen *fcp12* Transkriptmengen war nur ein schwach oszillierender Rhythmus am ersten Versuchstag zu beobachten, der aber dennoch in seinem Verlauf dem der *fcp2* und *fcp6* Genen entsprach. Auch hier stieg die Konzentration der steady state mRNA mit Beginn der Beleuchtung an, erreichte ihr Maximum gegen Mittag und nahm dann zum Abend wieder ab. Die Werte für die folgenden drei Tage in Dunkelheit zeigten allerdings nicht die zu erwartende abnehmende Amplitude, sondern wesentlich höhere Transkriptmengen als die

vom ersten Versuchstag unter dem 12 h Licht: 12 h Dunkelregime. Somit konnte kein circadianer Expressionsrhythmus der Gene *fcp4* und *fcp12* zweifelsfrei festgestellt werden.

Die anschließende t-Test Analyse der Daten aus der Untersuchung zu circadianen Expressionsmuster für *fcp2* und *fcp6* zeigten für fast alle Werte eine deutliche Signifikanz. Besonders beim Vergleich der steady state mRNA Konzentration von 7:00 und 14:00 Uhr, sowie 14:00 und 21:00 Uhr waren alle Werte mit einer Ausnahme über die vier Versuchstage signifikant (p Werte < 0,01). Bei *fcp12* ergab die t-Test Analyse eine noch höhere Signifikanz bei den wichtigsten Messpunkten der Versuchsproben, allerdings waren mehrere direkt hintereinander folgende Messpunkte nicht signifikant verschieden zueinander. So ist beispielsweise die Differenz zwischen den Werten von 07:00 und 09:00 Uhr nur am vierten Probenstag statistisch signifikant. Die statistische Auswertung der *fcp4* steady state mRNA Konzentrationen weist in vielen Fällen keine statistische Signifikanz der Unterschiede auf (p Werte > 0,1). Selbst beim Vergleich der Differenz der wichtigsten Messpunkte sind vier von sieben nicht signifikant (**Tab. 3.9.1.**).

Die Unterschiede zwischen den Werten von 07:00 zu 14:00 Uhr und denen von 14:00 zu 21:00 Uhr des ersten Versuchstages waren für *fcp2* statistisch signifikant (p Werte < 0,01). Bei den Messwerten der gleichen Zeitpunkte der folgenden drei Tage in Dauerdunkel bestätigt die t-Test Analyse die statistische Signifikanz für die 07:00 zu 14:00 Uhr Werte, sowie den 14:00 zu 21:00 Uhr Werten (p Werte < 0,03). Einzige Ausnahme hierbei bildet der Unterschied der Werte von 14:00 zu 21:00 Uhr des zweiten Versuchstages, der mit einem p Wert von 0,09 weniger signifikant ist (**Tab. 3.9.1.**).

	7-14 Tag 1	14-21 Tag 1	7-14 Tag 2	14-21 Tag 2	7-14 Tag 3	14-21 Tag 3	7-14 Tag 4
<i>fcp2</i>	$3,66 \cdot 10^{-4}$	$4,61 \cdot 10^{-5}$	$1,58 \cdot 10^{-3}$	0,09	0,01	0,01	0,03
<i>fcp4</i>	0,01	$2,40 \cdot 10^{-4}$	0,30	0,03	0,12	0,51	0,76
<i>fcp6</i>	0,14	$1,53 \cdot 10^{-6}$	$1,88 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,01	0,01	$2,27 \cdot 10^{-3}$
<i>fcp12</i>	$6,58 \cdot 10^{-6}$	0,01	0,01	$1,41 \cdot 10^{-3}$	$4,57 \cdot 10^{-3}$	$9,99 \cdot 10^{-4}$	$2,39 \cdot 10^{-3}$

Tabelle 3.9.1. p Werte der t-Test Analyse der wichtigsten steady state mRNA Konzentrationen der circadianen Expressionsmuster-Experimente für die Gene *fcp2*, *fcp4*, *fcp6* und *fcp12* von *Cyclotella cryptica*.

Die Unterschiede zwischen den Werten von 07:00 zu 14:00 Uhr und denen von 14:00 zu 21:00 Uhr des ersten Versuchstages waren für *fcp4* statistisch signifikant (p Werte < 0,01). Der Vergleich der Messwerte der folgenden drei Versuchstage im Dauerdunkel waren mit einer Ausnahme nicht statistisch signifikant (p Werte < 0,12) und somit für die Auswertung sehr fragwürdig. Nur der Unterschied zwischen 14:00 zu 21:00 Uhr des zweiten Versuchstages war relativ signifikant (p Wert 0,03).

Bei der Analyse der Daten aus den Expressionsstudien für *fcp6* zeigte sich, daß die Unterschiede zwischen den Werten statistisch signifikant waren. Zwar ist der Anstieg der mRNA Konzentration zwischen 07:00 zu 09:00 Uhr am ersten Versuchstag nicht so ausgeprägt und nicht signifikant (p Wert: 0,16), dafür zeigen die Werte von 9:00 zu 14:00 Uhr eine deutliche Signifikanz (p Wert: 0,02). Ebenso wie bei *fcp2* zeigt auch *fcp6* eine ähnliche Oszillation der mRNA Konzentrationen und eine Abnahme der Amplitude in den folgenden drei Versuchstagen in Dauerdunkel. Die t-Test Analyse bestätigt für diese Versuchstage eine statistische Signifikanz beim Anstieg der mRNA Konzentration am Morgen und beim Absinken am Nachmittag mit p Werten < 0,01 (**Tab. 3.9.1**).

Auch bei der Untersuchung des Expressionsmusters von *fcp12* zeigte sich wie zuvor beschrieben eine Oszillation der mRNA Konzentration, die mit Beginn der Beleuchtung anstieg, ihr Maximum gegen Mittag erreichte und zum Nachmittag wieder abfiel. Im Gegensatz zu *fcp2* sank die Amplitude jedoch nicht stetig in den folgenden drei Versuchstagen in Dauerdunkelheit, sondern stieg am zweiten Versuchstag an, sank wieder am dritten und nahm am letzten Versuchstag wieder zu. Dennoch war die statistische Signifikanz beim Vergleich der Zeitpunkte 07:00 zu 14:00 Uhr und 14:00 zu 21:00 Uhr immer gegeben (p Wert < 0,01).

Insgesamt bestätigt die t-Test Analyse der Unterschiede zwischen den mRNA Konzentrationen der verschiedenen Messpunkten für *fcp2*, *fcp6* und *fcp12* die statistische Signifikanz der Messungen. Für *fcp4* zeigt die t-Test Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen der Mehrzahl der Messwerte und weist somit nicht auf das Vorhandensein einer circadianen Rhythmik bei der Expression des Gens hin.

4. Diskussion

4. Diskussion

4.1. Spektroskopie

Die Aufnahme von *in vivo* Absorptionsspektren, bzw. von Spektren von Pigmentextrakten sollte einen ersten Eindruck darüber vermitteln, ob schon mit einfachen Mitteln Unterschiede bei der Pigmentkonzentration in den Kulturen zu erkennen sind, die unter verschiedenen Lichtbedingungen angezogen wurden. Es stellte sich die Frage, ob sich die Pigmente bei unterschiedlichen Lichtbedingungen in ihrer Zusammensetzung und/oder Konzentrationen verändern, und ob sich diese Veränderungen mit den einfachen Mitteln der Spektroskopie nachweisen lassen. Die Spektroskopie stellt einen einfachen Weg dar, um zumindest einen ersten Eindruck über die Unterschiede in den Pigmentkonzentrationen zu erhalten (Hust 1999).

Die weitergehenden Analysen der Expressionsraten der Pigment-Proteine mittels RNA-Isolation und Blotting-Methoden sind zeitaufwendig und kompliziert, gehen aber über eine simple Pigmentkonzentration-Beobachtung hinaus.

4.1.1. *in vivo*-Absorptionsspektroskopie ganzer Zellen

Bei der Auswertung der Absorptionsspektren ganzer Zellen wurden unterschiedliche Maxima registriert. So zeigte sich bei den Anzuchten unter Rot-, Blau- und Grünlicht ein deutliches Maximum bei 430 nm, im Gegensatz zur Anzucht unter schwachem Weißlicht, wo kaum ein Maximum zu registrieren war. Dies zeigte, daß bei den Anzuchten unterschiedliche Verhältnisse der Pigmente zueinander vorlagen. Während bei Zellen von *Cyclotella cryptica*, die unter schwachem Weißlicht angezogen wurden, das Verhältnis der Werte in den Absorptionsspektren für *Chl c* (+ Carotinoiden) und *Chl a* ungefähr gleich war, zeigten sich die Werte bei den Anzuchten unter Rot-, Blau- und Grünlicht doch ausgeprägter.

Insgesamt zeichneten sich bei gleicher Zellzahl der Kulturen die Absorptionsspektren aus Grünlicht- und Blaulicht-Regime durch höhere Werte aus, als die der Anzuchten aus schwachem Weißlicht und Rotlicht (respektiv). Es ist anzunehmen, daß die unterschiedlichen Werte in den Absorptionsspektren aus den verschiedenen Lichtqualitäten hervorgehen. Je nach Lichtangebot wurde die Produktion der Pigmente unterstützt oder abgeschwächt.

Lichtintensität als auch Lichtqualität beeinflussen den Metabolismus von Pflanzen (Werner 1977). Praktisch jede Spezies von photosynthetisch aktiven Organismen ist zu einer individuellen Anpassung fähig. Das betrifft einmal die Menge der Antennenpigmente, welche bei Lichtmangel erhöht, bei Überschuß erniedrigt werden kann. Ein Spezialfall dieser

Adaption ist die Erhöhung der Pigmentdichte: Die eigentlichen lichtabsorbierenden Chromophore sind in Antennen an Proteine und andere Komponenten gebunden. Das relative Mengenverhältnis oder, noch wichtiger, die Menge an Chromophoren pro Volumeneinheit, ist aber bei verschiedenen Antennentypen sehr unterschiedlich.

Anhand der vorliegenden Daten ist zu vermuten, daß grünes Licht die Synthese von Pigmenten am stärksten induziert. Auffallend ist, daß die Anzuchten unter rotem Licht geringere Werte aufweisen als die Anzucht unter schwachem Weißlicht. Der Wert für *Chl a* in dieser Anzucht ist dennoch verhältnismäßig höher als der aus der schwachen Weißlicht-Anzucht (Maxima bei 670 nm), was vermuten läßt, daß die Synthese an Carotinoiden und *Chl c* niedriger ist, als die bei den anderen Anzuchten und so das Maxima bei 430 nm (*Chl a*, *Chl c* + Carotinoide) im Absorptionsspektrum niedriger hält. Einzeln ist *Chl a* stärker im Spektrum ausgeprägt.

Individuelle Anpassungen können aber auch die Qualität der Antenne betreffen. Das vielleicht beeindruckendste Beispiel dafür ist die komplementäre chromatische Adaption vieler Cyanobakterien. Zieht man z.B. *Fremyella diplosiphon* im Grünlicht an, so bilden sie große Mengen des roten Pigments Phycoerythrin, welches maximal im Grünbereich absorbiert. Zieht man denselben Stamm im Rotlicht an, so bildet er bevorzugt das blaue Phycocyanin. Da Antennenpigmente im allgemeinen die Farbe der Organismen bestimmen, ist *Fremyella diplosiphon* deshalb einmal rot und einmal blaugrün gefärbt. Bei anderen Organismen ist die Anpassung zwar weniger dramatisch, aber fast alle haben Möglichkeiten, ihre Antennen in gewissem Umfang Farbänderungen des Lichtes anzupassen (Scheer 1999).

Wallen and Geen (1971) untersuchten den Effekt der Lichtqualität auf *Thalassiosira pseudomona*. Blaues oder grünes Licht beeinflußt den Zellmetabolismus durch Anregung der Proteinsynthese und Verringerung der Kohlenhydratsynthese, verglichen mit Weißlicht der gleichen Intensität. Diese Beobachtung scheint durch die Daten dieser Untersuchung bestätigt zu werden. Auch die Beobachtung, daß Carotinoide am höchsten bei Anzuchten unter grünem Licht sind, was darauf hinweist, daß eine chromatische Adaption stattgefunden hat (Wallen and Geen 1971 a,b), wird durch die hier gefundenen Daten bestätigt. Unter Weißlicht ist die geringste Konzentration an Carotinoiden zu beobachten, während unter grünem und blauem Licht die Werte wesentlich höher sind.

Generell haben die Chromophyten ein höheres Carotenoid:Chl Verhältnis als es bei Höheren Pflanzen der Fall ist, und diese Carotenoide, besonders Fucoxanthin, machen einen signifikanten Teil des spektralen Absorptionsbereichs der grünen Region des Spektrums aus (Hiller *et al.*, 1993).

Es hat sich gezeigt, daß in Diatomeen ein Anstieg an Fucoxanthin in den Zellen die photosynthetische Adaption an Schwachlicht-Bedingungen begleitet, und daß der Beitrag an Fucoxanthin-Anregungsenergie auf *Chl a* Fluoreszenz unter diesen Bedingungen fast 20% größer ist als die Mengenzunahme des Fucoxanthins in der Zelle.

Dennoch sind die Ergebnisse dieser spektroskopischen Analyse nicht wirklich aussagekräftig. Absorptionsspektren ganzer Zellen sind durch die starke Streuwirkung der Zellwände und Zellbestandteile neben den Pigmenten sehr ungenau und können bestenfalls einige Hinweise auf Besonderheiten bei der Pigmentzusammensetzung geben.

Daher sind die Daten aus den Absorptionsspektren der ganzen Zellen für die Analyse der Pigmentzusammensetzung der verschiedenen *Cyclotella*-Anzuchten nicht signifikant.

4.1.2. Absorptionsspektroskopie von Pigmentextrakten

Bei der Pigmentextraktion in Aceton zeigten sich ähnliche Maxima wie bei der Absorption ganzer Zellen. Allerdings sind hier keine so deutlichen Unterschiede zu verzeichnen wie bei den Absorptionsspektren ganzer Zellen. Die Maxima dieser Absorptionsspektren lagen bei dieser Untersuchung bei ungefähr 663 nm, 620 nm und 430 nm. Die Maxima stehen für *Chl a* und *c*. Eine Schulter bei 480 nm wird durch Carotinoide verursacht. Es zeigten sich bei Kulturen, die unter Rotlicht angezogen wurden, die höchsten Absorptionsmaxima, während die Anzucht unter Grünlicht die niedrigsten Werte vereint. Die Untersuchungen der Kulturen, die in blauem Licht und schwachem Weißlicht wuchsen, liegen mit ihren Werten respektiv dazwischen.

Die Werte stehen im Widerspruch zu den Daten aus den Absorptionsspektren ganzer Zellen. Dort zeigten sich die höchsten Werten bei der Anzucht unter grünem Licht. Eine Erklärung hierfür kann nicht gegeben werden.

Die berechneten Verhältnisse der Chlorophylle (Jeffrey & Humphrey, 1975) ist bei den Kulturen, die unter rotem, blauem, grünem und schwachem Weißlicht angezogen wurden, immer ungefähr 5,5 : 1 ($\text{Chl } a : \text{Chl } c_1 + c_2$), d.h. es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anzuchten im Hinblick auf das Verhältnis dieser beiden Pigmente. D.h. das Verhältnis *Chl a:Chl c* ist immer gleich. Im Gegensatz hierzu zeigen die *in vivo* Spektren allerdings Unterschiede. Dies könnte auf unterschiedlich Carotinoid-Konzentrationen in den verschiedenen Anzuchten hindeuten.

Das *Chl a/c* Verhältnis der meisten Chromophyten LHCs variieren, und reichen von 1 bis 5,6 (Hiller *et al.*, 1991; Hiller *et al.*, 1993). Bei *Phaeodactylum tricornutum* wurden *Chl a:c*-Verhältnisse von 5:1 (Owens and Wold, 1986); Friedman and Alberte, 1984), 6,7:1 (Friedman

and Alberte, 1986) und 8,1:1 (Gugliemelli, 1984) gemessen. Bei hoher Lichtintensität ändert sich das photoadaptive Verhalten von Diatomeen in der Art und Weise, dass Chlorophyll *a* abgebaut oder gleich weniger gebildet wird (Gallagher *et al.*, 1984; Friedman and Alberte, 1985; Pinkney and Zinmark, 1993). Unter Starklicht lassen sich durchaus Chl *a*:*c*-Verhältnisse von 3:1 finden (Gallagher *et al.*, 1984).

Bei den Pigmentextrakten dieser Untersuchung zeigten sich geringe Unterschiede in den Verhältnissen von *Chl*:Carotinoiden. Ein Vergleich der Peaks der Absorptionsspektren der verschiedenen Anzuchten ergaben, daß sich das Verhältnis von Chlorophyll zu Carotinoiden je nach Lichtverhältnis ändert. Während die Konzentrationsverhältnisse *Chl a*: Carotinoiden (430 nm: 475nm), bei Anzuchten aus schwachem Weißlicht und Grünlicht noch von den Werten her relativ übereinstimmen, sind bei den Anzuchten unter Rot- und Blaulicht eine Erhöhung der Chl *a* - Konzentration, bzw. Verringerung der Carotinoid-Konzentration zu verzeichnen. Es zeigt sich also, daß die Zusammensetzung der verschiedenen Pigmente anscheinend tatsächlich durch das jeweilige Lichtklima, unter welchem die verschiedenen *Cyclotella*-Flüssigkulturen kultiviert werden, in einem gewissen Maß beeinflusst wurde. Allerdings geben die Spektroskopie-Experimente keine Hinweise auf die zelluläre Prozesse, die zu den Veränderungen führen. Weiterhin spiegeln die Werte nur den allgemeinen Zustand der untersuchten Zellen dar. Über die einzelnen Pigmente gibt die Spektroskopie keine Informationen. Daher sind Untersuchungen der *Fcps* auf RNA Ebene notwendig, um das Expressionsverhalten der *fcp* Gene beobachten und analysieren zu können.

Die ganze Organisation des Photosyntheseapparates der Diatomeen unterscheidet sich in vielen Aspekten von dem der grünen Pflanzen. Ihre Pigmentzusammensetzung ist anders, wobei *Chl c* und Fucoxanthin die Hauptpigmente sind. Die Xanthophyllkonzentration kann relativ zum Chlorophyll 2-4 mal höher als in den Höheren Pflanzen sein (Lavaud *et al.* 2003).

4.1.3. Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektroskopie

Bei den Spektren der Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektroskopie zeigten sich kaum Unterschiede. Zwar zeigten sich bei den Anzuchten unter Rotlicht, Blaulicht, Grünlicht und schwachem Weißlicht je nach Lichtbedingungen verschiedene Werte für die Maxima, aber die Maxima selbst lagen bei allen Anzuchten ungefähr im gleichen Bereich, etwa bei 690 nm, bzw. etwa 1 nm darüber oder darunter. Diese Abweichungen sind nicht signifikant für die Auswertung. Es zeigte sich, daß Licht der Anregungswellenlänge von 500 nm die höchsten Emissionswerte bei den Spektren lieferte, gefolgt von Licht der Anregungswellenlänge 460 nm und 440 nm.

Durch die großen Fluktuationen in der Lichtintensität aufgrund von Wasserbewegungen, haben sie wie andere photosynthetisch-aktive Organismen effiziente Photoschutzmechanismen entwickelt (Ting and Owens, 1993, Ting and Owens 1994; Lavaud *et al.*, 2002). Bei Untersuchungen hierzu zeigte sich, daß die Konzentrationen an Pigmenten von der Lichtintensität beeinflußt werden. In den Diatomeen wurde hierzu der Xanthophyll-Zyklus untersucht, bei dem Diadinoxanthin in Diatoxanthin unter Starklicht umgewandelt wird und umgekehrt bei Schwachlicht (Hager and Stransky, 1970). Die Konzentration an Diadinoxanthin war, so ergaben Fluoreszenzemissionsuntersuchungen von Lavaud *et al.* (2003) an *Phaedactylum tricornutum*, unter intermittierend beleuchteten Zellen doppelt so hoch wie bei Schwachlichtanzuchten. Fucoxanthin und Chl *c* unterschieden sich bei den Anzuchten kaum.

Letztlich erbrachten die spektroskopischen Methoden keine signifikanten Ergebnissen für die eigentliche Fragestellung, die letztendlich die Untersuchung der Apoproteinsynthese der Pigmente bei Anzuchten unter verschiedenen Lichtqualitäten und -quantitäten beinhaltete. Ohne eine genauere Untersuchung mittels wie in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Isolations- und Hybridisierungsexperimente mit *fcp* Gensonden sind kaum Unterschiede in den Anzuchten zu erkennen. Es war also notwendig, diesen, wenn auch aufwendigen, Weg zu gehen.

4.2. RNA Ausbeute

Mit der Methode der Spektroskopie waren einige Hinweise auf Änderungen der Pigmentkonzentration in *Cyclotella cryptica* zu beobachten, aber diese waren nicht schlüssig. Die eigentliche Zielsetzung der Experimente, nämlich Unterschiede in der Expression der *fcp* Gene bei unterschiedlichen Umweltbedingungen auf RNAEbene zu untersuchen, kann mit den Mitteln der Spektroskopie nicht beantwortet werden. Dazu ist die Isolation der Gesamt RNA und anschließender Analyse mit genspezifischen Sonden notwendig.

Die Isolation der Gesamt RNA wurde nach Sambrock *et al.*(1989) über isopyknische CsCl-Dichtegradientenzentrifugation erreicht. Dabei konnten große Mengen an Zellmaterial von *Cyclotella cryptica* bearbeitet werden und daraus folgend auch große Menge an Gesamt RNA erhalten werden. Die jeweilige isolierte Menge an Gesamt RNA der unterschiedlichen Untersuchungen variierte stark, was auf unterschiedliche Zelldichte zurückzuführen war.

Die Ausbeute bei der RNA-Isolierung unterscheidet sich stark von Gewebe zu Gewebe. So erhält man aus Leber fast dreimal mehr RNA als aus Niere (Mülhardt 2002). Allerdings war

der Unterschied in der Menge der Gesamt RNA selbst bei gleichen Kultur-Mengen relativ stark, was aber keinen Einfluß auf die nachfolgenden Analysen hatte.

Im allgemeinen wird diese Methode allerdings als die klassische, wenngleich mittlerweile fast völlig aus der Mode gekommenen Methode angesehen (Mülhardt 2002). Die Methode hat den unbestreitbaren Vorteil, daß man zum einen mit großen Mengen Material arbeiten kann und daß man in den Schritten zur RNA Isolation etwas sieht. Man kann die Isolation optisch verfolgen. Der Nachteil ist jedoch hierbei, daß die Zentrifugation sehr lange dauert (24 h bei 180.000 g) und sehr arbeitsintensiv ist.

Die ausgesuchte alternative Methode mit dem *NucleoSpin RNA II Kit* (Macherey, Nagel, Düren, Germany) erwies sich als wesentlich zeitsparender, erlaubte aber nur Untersuchungen in kleinerem Maßstab, die nicht dem Rahmen der Versuchsanordnung entsprachen.

Die RNA Ausbeute erwies sich bei beiden Methoden als für die jeweiligen Untersuchungen als ausreichend, wobei mit dem *NucleoSpin RNA II Kit* (Macherey, Nagel, Düren, Deutschland) Material für die Überprüfung von vorangegangenen Untersuchungen bereitgestellt wurde, da die Ausbeuten hier mit maximal 40 µg RNA sehr gering waren.

Der Reinheitsgrad der aufgearbeiteten Proben lag nach den Berechnungen für den OD_{260}/OD_{280} Faktor zwischen 1,7 und 2,0. Nach Sambrock (1989) entspricht ein Faktor von 2,0 einer reinen RNA-Lösung. Die abweichenden Werte deuten auf Verunreinigungen durch Proteine und DNA hin. Dennoch zeigten sich bei den nachfolgenden Experimenten keine auffälligen oder signifikanten Abweichungen. Die Untersuchungen aus den RT-PCR Experimenten bestätigten die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche, so daß davon auszugehen ist, daß die poly(A)⁺ mRNA Fraktionen frei von DNA waren, was die Reinheit der Proben noch weiter bestätigt.

Mögliche Erklärungen für die abweichenden Faktoren sind zum einen das Alter des Spektrophotometers und die damit verbundenen Meßfehler. Eine andere Erklärung ist, daß die OD_{280} Werte aufgrund ihrer geringen Extinktion nicht aussagekräftig sind und vermutlich nicht korrekt wiedergegeben wurden. Die Konzentration von RNA-Lösungen wird über eine OD_{260} -Messung bestimmt. Hierbei gilt, daß nur OD-Werte zwischen 0,1 und 1 aussagekräftig sind, während Werte zwischen 0,02 und 0,1 mit starken Fehlern behaftet sein können (Mülhardt 2002; Chirgwin *et al.*, 1979). Daraus folgt, daß die Messung der OD-Werte von 280 nm mit starken Abweichungen behaftet sein können. Schon geringe Fehler führen hierbei zu Unterschieden beim OD_{260}/OD_{280} Faktor im Bereich von 0,2 Einheiten.

4.3. Transkriptlängen

Die Transkriptlängen der verschiedenen *fcp* Gene wurden über eine einfache Methode bestimmt. Anhand der Hybridisierungssignale konnte die Aussage gemacht werden, daß die Transkripte ungefähr 950 (*fcp2*), 1050 (*fcp4*), 880 (*fcp6*) und 1150 (*fcp12*) Nucleotide lang sind. Die Transkriptlängen von *fcp2* und *fcp6* stimmten mit den Daten überein, die sich von den Ergebnissen von cDNA Klonen der entsprechenden Gene ableiten ließen.

Daten aus vorangegangenen Untersuchungen (Eppard *et al.*, 2000) weisen *fcp4* eine andere Transkriptlänge als die hier berechnete zu. Allerdings wies der cDNA Klon, welcher *fcp4* codiert, nach dieser Untersuchung eine relative große, nichtcodierende 3'-Sequenz von 279 Nucleotiden auf, wenn man ihn mit anderen *fcp* cDNA Klonen vergleicht (75 – 155). Allerdings war die codierende 5'-Sequenz unvollständig. Verglichen mit den anderen Fcps von *Cyclotella cryptica* beginnt das Gen *fcp4* ungefähr in der Region, bei welcher das reife Polypeptid beginnen würde, nachdem es prozessiert und das Transpeptid abgeschnitten worden wäre (Eppard *et al.*, 2000). Wenn man einen Verlust von ungefähr 20–30 Aminosäuren am N-Terminus annimmt und einen weiteren Verlust von Nucleotiden an der 5'-nichtcodierenden Region, könnte die hier berechnete Größe mit den Daten von Eppard *et al.* (2000) übereinstimmen.

Das Gen *fcp12* stimmte mit der berechneten Größe aus diesen Untersuchungen nicht ganz mit den Werten aus vorangegangenen Arbeiten überein. *fcp12* wies mit 1150 Nucleotiden die größte Transkriptlänge auf. Basierend auf den Daten des ursprünglichen cDNA Klons war eigentlich ein kleineres Transkript zu erwarten, obwohl auch in der vorangegangenen Arbeit zu *fcp12* das klonierten Gen sich durch die höchste Nucleotidanzahl der *fcp* Gene von *Cyclotella cryptica* auszeichnete (Eppard *et al.*, 2000). Die ungewöhnlich große Transkriptlänge, die für *fcp12* gemessen wurde, zeigt vermutlich eine Erhöhung der Länge der nichttranslatierten 3'-Region, welche man in Größenordnungen von bis zu 1000 Basen bei den *fcp* Transkripten von *Macrocystis pyrifera* (Grossman *et al.*, 1995) findet. Generell erhält man ähnliche Werte für andere chromophytische Algen. Daher wurden von Apt *et al.* (1995) Transkriptlängen von 1.2 kb und 1.6 kb für *fcp* Gene der Braunalge *Macrocystis pyrifera* gefunden, während die Transkripte von *Phaeodactylum tricornutum* nur um 0.76, 0.78 und 0.79 kb lagen (Grossman *et al.*, 1990). Für die Chrysophyceen *Giraudiodopsis stellifer* und *Isochrysis galbana* und für die Raphidophyceen *Heterosigma carterae* wurde respektive eine mRNA Länge von 1.2, 1.1 und 0.98 kb (Passaquet and Lichtle, 1995, LaRoche *et al.*, 1994, Durnford and Green, 1995) errechnet.

4.4. Effekte von Lichtquantität

Die Experimente zur Untersuchung zum Einfluß der Lichtquantität auf die Expression der *fcp* Gene von *Cyclotella cryptica* haben gezeigt, daß die steady state mRNA Konzentrationen der *fcp* Gene durch die Lichtintensität beeinflusst wird, mit welcher die Kulturen angezogen wird. Dieses Verhalten kann man bei verschiedenen anderen Genen, die für die Proteine der Photosynthesepigmente codieren, beobachten. Lichtsammelnde Chlorophyll a/b (LHC) II Proteine, welche zu den Hauptkomponenten der Lichtsammlerantennen von PSII von Höheren Pflanzen und Grünen Algen gehören, ändern ihre Abundanz in Reaktion auf die Lichtintensität (Anderson *et al.*, 1988, 1995). Die Qualitäts- und Quantitätskontrolle der LHC Proteinkomplexe ist notwendig, um Schäden durch Photooxidation mittels Vermeidung von Anregungsenergie-Überschuß zu verhindern (Teramoto *et al.*, 2002).

Untersuchungen zur Verwandtschaft der *fcp* Gene von *Cyclotella cryptica* mit anderen Genen, die für die Proteine der photosynthetische Pigmente codieren, haben gezeigt, daß die Gene *fcp1*, *fcp2*, *fcp3* und *fcp5* eng mit denen anderer Diatomeen und chromophytischen Algen verwandt sind, wohingegen *fcp4* mit *lhaR1* der Rotalge *Porphyridium cruentum* verwandt ist. Laut Eppard *et al.* (2000) sind die Gene *fcp1*, *fcp2*, *fcp3* und *fcp5* von *Cyclotella cryptica* typische Vertreter des Fcps Clusters der zentralen Diatomeen. Die Gene *fcp6*, *fcp7* und *fcp12* von *Cyclotella cryptica* gehören zu einem weiteren Zweig innerhalb der Gene, die für Proteine der photosynthetisch aktiven Pigmente codieren. Sie gehören zur gleichen heterogenen Gruppe wie der Fcps von *Isochrysis galbana* und die „LHC-ähnlichen“ Polypeptide LI818 und LI818r3 von *Chlamydomonas*. Hierbei scheinen die Gene *fcp1*, *fcp2*, *fcp3* und *fcp5* Fcp Untereinheiten zu codieren, die mit PSII assoziiert sind, wohingegen *fcp6*, *fcp7* und *fcp12* für lichtinduzierbare Untereinheiten codieren mit bislang unbekannter Funktion. In Analogie zu den mit *fcp6*, *fcp7* und *fcp12* eng verwandten, „LHC-ähnlichen“ Polypeptide LI818 und LI818r3 von *Chlamydomonas* könnten sie ebenfalls eine Lichtschutzfunktion ausüben.

Fcp4, das Genprodukt von *fcp4*, könnte eine LH Untereinheit von PSI sein, jedoch geben die bisherigen Daten hierfür nicht ausreichende Beweise (Eppard *et al.*, 2000).

Generell wird die Syntheserate der Fcps durch die Lichtintensität kontrolliert. Die Synthese der Fcps steigt an, wenn die Lichtintensität abnimmt (Grossman *et al.*, 1995). Bei diesen Untersuchungen kann ein solches Verhalten für die Gene von *fcp2* und *fcp4* beobachtet werden, deren steady state mRNA Konzentration bei unter Schwachlicht-angezogenen Kulturen wesentlich höher ist als bei unter Starklicht-angezogenen Kulturen. Extrem hohe Lichtintensitäten unterdrücken die mRNA Akkumulation von vielen *Lhc* Genen, welche die

lichtsammelnde Chlorophyll *a/b* Proteine des Photosystems II der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* codieren (Teramoto *et al.*, 1998). Auch bei *Phaedactylum tricornutum* verzeichnet man eine dreifache Verringerung der Fcp-Synthese, wenn die Alge von schwacher in starke Beleuchtung überführt wurde (Friedman and Alberte, 1986). Weiterhin zeigten Primerextension-Experimente, daß sechs clonierte *fcp* Gene dieser Alge unterschiedlich exprimiert werden (Bhaya and Grossman, 1993). Bei der Braunalge *Macrocystis pyrifera* wurde eine zweimal höhere *fcp* Transkriptmenge unter Schwachlicht als unter Starklicht gefunden (Apt *et al.*, 1995). Das Gen *fcpD* hatte etwa die gleichen Transkriptmengen unter allen Beleuchtungsbedingungen, während die Transkriptmengen von *fcpF* unter Schwachlicht um das fünffache anstiegen.

Bei den Genen *fcp6* und *fcp12* von *Cyclotella cryptica* konnte unter Schwachlicht-Bedingungen eine geringere Expression beobachtet werden, während unter Starklicht-Bedingungen die Konzentration des steady state mRNA dieser Gene wesentlich höher war. Da hohe Lichtintensitäten im allgemeinen als schädlich für die empfindlichen Reaktionszentren angesehen werden, legt dieses Verhalten die Vermutung nahe, daß beide *fcp* Gene nicht der Absorption von Lichtenergie zur Weiterverarbeitung in den Reaktionszentren dienen, sondern als photoprotektive Mechanismen agieren, ähnlich der ELIPS der grünen Pflanzen oder den *cab*-verwandten und lichtinduzierbaren Proteinen der Grünalge *Chlamydomonas* (Bassi *et al.*, 1997; Terramoto *et al.*, 2002). ELIPs wurden bisher nicht in chromophytischen und rhodophytischen Algen gefunden. Allerdings konnte ein Gen für ein Ein-Helix Protein (HLIP) bei Cyanobakterien gefunden werden, welches unter Starklichtbedingungen exprimiert wird und mit den ELIPs verwandt ist. HLIP-ähnliche Gene wurden darüber hinaus in den Plastidengenomen zweier rhodophytischen Algen gefunden (Dolganov *et al.*, 1995).

Die Verwandtschaft von *fcp6*, *fcp7* und *fcp12* zu der LI818 und Cab Protein Genen weist auf Schutzfunktion vor Schäden durch Photooxidation hin. Bei der Untersuchung der LI818 Gene über einen längeren Zeitraum, zeigte sich, daß die LI818 mRNA von *Chlamydomonas reinhardtii* mehrere Stunden vor der *cab I/II* mRNA exprimiert wird. Daraus kann man schlußfolgern, daß auch die LI818 Proteine vor den Cab I/II Polypeptiden akkumulieren (Gagne and Guertin, 1992; Savard *et al.*, 1996). Vermutlich dienen die LI818 Proteine als Ersatz für die LHC Polypeptide und schützen die neusynthetisierten Reaktionszentren vor Schäden durch Photooxidation und bei ihrer Verwandtschaft zu *fcp6* und *fcp12* ist es wahrscheinlich, daß auch diese eine Photoschutzaufgabe übernehmen. Diese Annahme wird

auch durch die Beobachtung gestützt, daß *fcp6* und *fcp12* unter Starklicht höhere steady state mRNA Konzentrationen aufweisen als unter Schwachlicht.

Gegenwärtig sind biochemische und physiologische Daten über den Photosyntheseapparat von *Cyclotella cryptica* recht selten und so können die gefundenen Daten nicht ausreichend mit anderen Arbeiten verglichen werden. Wenn *Cyclotella cryptica* unter Schwachlicht- oder Starklichtbedingungen kultiviert wird, variiert das *Chl a* : *Chl c* Verhältnis nur wenig. Die Menge an Fucoxanthin jedoch steigt unter Schwachlicht Bedingungen an, während die Menge an β -Carotin relativ zu *chl a* in Starklicht-angezogenen Zellen ansteigt. Darüber hinaus wurde ein fünffacher Anstieg der zwei Xanthophyll-Zyklus Pigmente (Diadinoxanthin und Diatoxanthin) in Relation zu *chl a* unter Starklicht-Bedingungen beobachtet. Western Immunoblotting Experimente zeigten, daß die Menge von D1, dem Reaktionszentrum-Polypeptid von PSII, unter Starklicht-Bedingungen zurückging. (Rhiel *et al.*, 1997). Messungen der PSI/PSII Stöchiometrie fehlen in diesem Bereich noch für *Cyclotella cryptica*. *Phaeodactylum tricornutum* reagiert beispielsweise auf Schwachlicht mit einer Zunahme der Zellgröße und gleichzeitigem Anstieg der Anzahl an PSI und PSII Reaktionszentren. Allerdings wurde hierbei keine signifikante Änderung der Photosyntheserate pro Zelle oder Photosyntheseinheit beobachtet. Wenn nun unter Schwachlicht kultivierte Zellen Starklicht ausgesetzt wurden, nahm der *in vivo* Einbau des ^{14}C -label in das Apoprotein des LH Komplexes ab. Demgegenüber wiesen unter Starklicht angezogene Zellen einen starken Anstieg an Apoprotein Synthese aus, wenn sie in Schwachlicht überführt wurden (Friedman and Alberte, 1986).

Es bleibt festzuhalten, daß die *fcp* Gene von *Cyclotella cryptica* sich offensichtlich in zwei Gruppen aufteilen lassen: 1) in die *fcp* Gene, deren Expression durch Schwachlicht induziert werden und 2) in die *fcp* Gene, die unter Starklicht-Bedingungen eine erhöhte Aktivität aufweisen. Weiterhin ist durch diese Untersuchungen die Vermutung möglich, daß nur *fcp2* und *fcp4* Apoproteine für Antennenpigmente im Photosyntheseapparat von *Cyclotella cryptica* codieren, während die Starklicht-induzierbaren Fcp12 und Fcp6 ähnlich den ELIPs als Apoproteine für photoprotektive Pigmente die empfindlichen Reaktionszentren des Photosyntheseapparates schützen.

4.5. Lichtqualitätsexperimente

Im allgemeinen hat sich in den Untersuchungen gezeigt, daß bei allen untersuchten *fcp* Genen die höchste steady state mRNA Konzentration in den Kulturen zu finden war, die unter rotem Licht angezogen wurden, gefolgt von Kulturen aus Grünlicht-Anzuchten, während die *fcp* Transkriptmengen von unter Blaulicht kultivierten Zellen von *Cyclotella cryptica* verringert wurden. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die Expression der *fcp* Gene neben der Lichtintensität auch von der Art des Lichtes, der Lichtqualität, mit der die Kulturen bestrahlt werden, beeinflußt wird.

Untersuchungen zu der Wirkung der Lichtqualität auf die Transkriptmengen der *fcp* Gene bei Chromophyten sind selten und beschränken sich auf die Daten von Apt *et al.* (1995) zu *Macrocystis pyrifera*. Dort hat sich gezeigt, daß Thalli, die unter schwachem Blaulicht ($10\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gezüchtet wurden, ungefähr doppelt soviel individuelles *fcp* Transkript, verglichen mit denen, die unter intensivem Blaulicht ($100\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kultiviert wurden, enthielten.

Eine Ausnahme hierbei bildet *fcpD*, welches unter allen Beleuchtungsbedingungen ungefähr die gleichen Transkriptmengen aufwies. Weiterhin verhielt sich *fcpF* ebenfalls anders, indem die Transkriptmengen dieses Gens unter schwachen Blaulicht um das zehnfache anstiegen im Gegensatz zu starkem Blaulicht.

Thalli, die in hochintensivem Rotlicht ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogen wurden, hatten höhere Transkriptmengen als die, welche unter ähnlicher Intensität von Blaulicht kultiviert wurden, was die Ergebnisse dieser Untersuchungen zu unterstützen scheint. Allerdings zeigte sich bei Apts Untersuchungen, daß isolierte mRNA aus Kulturen, die unter schwachem Rotlicht ($10\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogen worden sind, abgebaut war und die Transkriptmengen im Gegensatz zu den hier gemachten Versuchen kaum nachgewiesen werden konnten. Dies legt die Vermutung nahe, daß bei den hier gemachten Versuchen entweder eine noch gerade ausreichende Lichtintensität gewählt wurde ($30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oder daß die *fcp* Gene von *Cyclotella cryptica* durchschnittlich größere Transkriptmengen ausbilden.

Das Meiste, was über die Kontrolle der Genexpression der *Lhc* Gene bekannt ist, stammt aus Untersuchungen über Höhere Pflanzen. *Lhc* Gene werden in Reaktion auf eine große Bandbreite von Faktoren beeinflußt, inklusive Licht (Qualität und Quantität), circadianen Rhythmen, Entwicklungsstand, Pflanzenwachstumsregulatoren und außerdem Metabolit-Vorkommen. Im Dunkeln sind kaum hohe Konzentration der *Chl* und *Lhc* Transkriptmengen zu beobachten. Diese Repression durch Dunkelheit wird hauptsächlich durch die Rotlicht-absorbierende Form von Phytochrom (P_r) verursacht. Bei der Bestrahlung mit Weißlicht, Blaulicht und UV Licht werden die Photorezeptoren aktiviert und P_r wird zu P_{fr} umgewandelt.

P_{fr} ist eine Form der Phytochroms, welche längerwelliges Rotlicht absorbieren kann. Es aktiviert eine Reihe von Prozessen, unter anderem die koordinierte Synthese und den Zusammenbau von Chlorophyll Molekülen und den korrespondierenden Apoproteinen. Neben den Phytochromen wird die *Lhc* Expression von der Menge an Rotlicht und Blaulicht beeinflusst. Sehr niedrige Lichtintensitäten von Rotlicht führen zu mittlerer, und schwache Rotlichtbeleuchtung führt zu hoher Akkumulation der *Lhc* mRNA. Geringe Mengen von Blaulicht lösen die Akkumulation von *Lhcb* Transkripten durch eine Erhöhung der Transkriptionsrate aus, während hohe Blaulicht-Lichtintensitäten zu einem erhöhten *Lhc* mRNA Abbau führen, und daher zu einem Absinken der mRNA Konzentration führen (Grossman *et al.*, 1995).

4.6. RT-PCR Experimente

Mit den bisherigen Untersuchungsmethoden konnte durch Northern Blotting und RNA Dot Blotting Experimente der Nachweis erbracht werden, daß die Lichtintensität Einfluß auf die Konzentration der steady state mRNA der untersuchten Gene hat. Allerdings wurden diese Experimente mit Gesamt RNA durchgeführt, was die Möglichkeit von falschen Signalintensitäten aufgrund unspezifischer Sondenbindung zuläßt. Um diese Fehlerquelle auszuschließen, wurde zur Bestätigung der zuvor erhaltenen Ergebnisse die steady state mRNA Konzentrationen der *fcp* Gene über Reverse Transkription, gefolgt von einer Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), zusätzlich untersucht und die Ergebnisse mit den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen verglichen.

Die Ergebnisse der RT-PCR Untersuchungen stimmen in ihren Tendenzen mit den Daten aus den RNA Dot Blotting Experimenten überein. Auch in diesen Untersuchungen bestätigte sich die Beobachtung, daß die steady state mRNA Konzentrationen der *fcp* Gene von der Lichtintensität beeinflusst wird. Die Amplifikationsprodukte dieser Untersuchung weisen ähnliche Unterschiede in der Konzentration auf wie bei den Daten aus den Untersuchungen der steady state *fcp* mRNA Konzentrationen der verschiedenen Anzuchten. Die Menge der Amplifikationsprodukte bei den verschiedenen Anzuchtbedingungen, also Starklicht- oder Schwachlicht-angezogenen Kulturen, unterscheiden sich signifikant. Daher ist zu vermuten, daß auch in den PCR-Lösungen die Startmengen der Templates von unter Starklicht, bzw. Schwachlicht-angezogenen Zellen, sich stark voneinander unterscheiden. Daraus resultiert, daß auch die Transkripte der *fcp* Gene sich in ihrer Menge unterscheiden. Damit bestätigen die Ergebnisse aus den RT-PCR Versuchen die Daten der vorangegangenen Experimente die Lichtquantitätsuntersuchung.

Die steady state mRNA Konzentration von *fcp2* und *fcp4* ist bei Anzuchten unter schwachem Weißlicht höher und unter intensivem Weißlicht geringer, bei den Genen *fcp6* und *fcp12* respektiv anders. Diese Bestätigung der Ergebnisse zeigt, daß die RT-PCR Experimente für die Kontrolle von Northern Blotting und RNA Dot Blotting Experimenten sehr nützlich sein können. Die Methode der RT-PCR ist ein nützliches Werkzeug, nicht nur um andere Methoden zu bestätigen. Kuno *et al.* (2000) untersuchten mit RT-PCR Experimenten Phytochrom-regulierte Gene auf Unterschiede bei Anzuchten unter Rotlicht und Weißlicht. In einer anderen Untersuchung nutzte Leblanc *et al.* (1999) eine semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der Genexpression der marinen Diatomee *Thalassiosira weissflogii* im Hinblick auf den Einfluß des Lichtes auf die Expression. Ähnlich wie bei den Untersuchungen dieser Arbeit für *fcp2* und *fcp4* zeigte sich, daß bei Diatomeen-Kulturen, die im Dunkeln kultiviert wurden, die Konzentration an *fcp* mRNA um das fünf- bis sechsfache anstieg, wenn sie mit Weißlicht bestrahlt wurden.

Die Methode der RT-PCR ist ein verbreitetes Mittel. Wu *et al.* (2004) untersuchten mit dieser Methode die circadiane Rhythmik verschiedener Gene in einer Mäuseleber, während Aoki *et al.* (2004) den circadianen Rhythmus des *PpLhcb2* Gens des Mooses *Physcomitrella patens* in einem 12 h Licht- 12 h Dunkel Regime überprüfte, nachdem dort ein Rhythmus in der steady state mRNA Konzentration beobachtet werden konnte. Auch die Regulation der Gene, die für Proteine der Atmungskette in Blättern der Kartoffel *Solanum tuberosum* codieren, wurden über RT-PCR auf Einfluß durch Licht untersucht (Svensson and Rasmusson, 2001).

Während des Ablaufes der RT-PCR erreicht die Reaktion eine Plateauphase, d.h. es werden kaum oder gar keine Amplifikationsprodukte mehr hergestellt. Dies liegt zumeist daran, daß die Reaktionskomponenten aufgebraucht sind. Die Stufe der Plateauphase kann jedoch von der Startmenge des Templates unabhängig sein und daher ergeben sich unterschiedliche Mengen an Templatekopien bei gleichen Plateausignalen (Freeman *et al.*, 1999).

Gegenwärtig kann aber nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die Änderungen der steady state *fcp* mRNA Mengen durch Änderungen der Transkriptionsraten oder durch veränderte Umsatz-Raten verursacht werden.

4.7. Diurnales Expressionsmuster

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist die Fähigkeit, kommende, sich wiederholende Ereignisse vorherzusehen, von großem Vorteil für das Überleben in einem natürlichen Umfeld, da der Mechanismus es den Organismen erlaubt, diese Veränderungen „vorherzusehen“. Endogene Rhythmen sind deshalb während der Evolution erhalten geblieben. Ein endogener Rhythmus ist durch folgende Merkmale charakterisiert (Sitte *et al.*, 1998):

- a) Sie laufen auch unter konstanten Außenbedingungen (Dauerdunkel oder Dauerlicht, Temperatur- und Feuchtigkeitskonstanz) noch wochen- (bei Pflanzen meist 1-2 Wochen) bis monatelang (vielfach bei Tieren) weiter, wobei die Schwingungsamplitude in manchen Fällen langsam abnimmt.
- b) Die Periodenlänge dieser unter konstanten Bedingungen weiterlaufenden („freilaufenden“) Schwingungen liegt nicht immer genau bei 24 Stunden, auch wenn die Periode unter natürlichen Bedingungen genau 24 Stunden beträgt. Die Abweichung der Periode der „freilaufenden“ von den in natürlicher Umgebung auftretenden Rhythmen wird als stärkstes Indiz für das Vorhandensein einer endogenen Rhythmik betrachtet. Da die endogene Rhythmik nur ungefähr einer Tageslänge entspricht, werden derartige periodische Vorgänge auch als circadiane Rhythmen bezeichnet.
- c) Der rhythmische Vorgang kann durch ein einziges Signal in Gang gesetzt werden.
- d) Circadiane oszillierende Systeme können in ihrer Periode durch überlagernde äußere Schwingungen „verstellt“ („mitgenommen“) werden. Bei Temperaturkonstanz können auf diese Weise Periodenlängen von 6 bis 36 Stunden erzwungen werden.
- e) Die circadianen Rhythmen sind abhängig vom oxidativen Stoffwechsel, d. h. sie werden nach einigen Stunden Sauerstoffabschluß eingestellt.

In diesem Zusammenhang wurde das Expressionsmuster der *fcp* Gene auf diurnale Rhythmik untersucht. Diurnal bedeutet „auf zwei Phasen verteilt“. Diurnale Rhythmik für die *fcp* Gene würde eine Schwankung der steady state mRNA Konzentration über den Tag bedeuten, mit einem Maximal- und einem Minimal-Wert bei einem diurnalen (zweiphasigen) Lichtregime (Huang and Chow, 1986, 1988).

Die Untersuchung der steady state *fcp* mRNA Konzentrationen über den Zeitraum von 24 Stunden ergab für alle vier untersuchten Gene eine Oszillation der mRNA Konzentration, wobei sie mit Beginn der Beleuchtung ansteigt und etwa nach sechs Stunden ein Maximum erreicht, um anschließend am Nachmittag wieder abzusinken. Dieses Verhalten deutet auf eine diurnale Rhythmik bei der Expression der *fcp* Gene von *Cyclotella cryptica* hin.

Auch Hust (1999) und Meyer *et al.* (2003) registrierten an Freilandproben die maximale Expression der *fcf* Gene zwischen 13:00 und 14:00 Uhr. Das entsprach im Zeitraum der Probenentnahme 6 bis 7 Stunden nach Sonnenaufgang, also nach Einsatz der Lichtphase (Sonnenaufgang im April ~7:00 Uhr), ähnlich wie bei diurnalen Expression der *fcf* Gene dieser Untersuchung. Es konnte daher nachgewiesen werden, daß der photosynthetische Apparat der Diatomeen sich ändernden Umweltbedingungen anpaßt. Durch die Beschränkung der Beprobung auf einen Zeitraum von 24 Stunden kann allerdings keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich vielleicht hier doch um ein circadian oszillierendes System handelt. Dazu mußten dann die Außenbedingungen konstant gehalten werden, so wie in den nachfolgenden Untersuchungen zu circadianen Expressionsmuster.

Die Stabilität der mRNA ist bei den Untersuchungen ebenfalls ein wichtiger Faktor. Die Haltbarkeit der mRNA kann auf die Konzentrationsmessung über einen längeren Zeitraum Einfluß nehmen. So sind *Lhc* mRNA im Dauerdunkel in Tomatenblättern nur drei Tage lang nachweisbar (Piechulla 1999). Auch für andere Pflanzen ließ sich ein Abbau der *Lhc* mRNA beobachten. Bei Tabak waren nach vier Tagen in Dunkelheit keine *Lhc* Transkripte mehr nachweisbar, während bei zwei Gymnospermen die *Lhc* mRNA noch sieben bzw. zehn Tage vorhanden waren. Dies läßt vermuten, daß die *Lhc* mRNA Transkriptabbau-Raten bei verschiedenen Pflanzenarten stark variieren (Brinker *et al.*, 2001).

Die Oszillation der steady state mRNA bei diesen Untersuchungen weist darauf hin, daß die Haltbarkeit der steady state *fcf* mRNA wesentlich geringer ist und so eine Analyse der Rhythmik erlaubt.

Da Untersuchungen zu diurnalen und/oder circadianen Expressionsmuster der LH Untereinheiten codierenden Gene für chromophytischen Algen selten sind und sich fast ausschließlich auf Daten über *Lhca* und *Lhcb* Gene der Höheren Pflanzen und Grünalgen beschränken, sind die Ergebnisse dieser Arbeit, die zeigen, daß alle vier untersuchten *fcf* Gencluster einem diurnalen Expressionsmuster unterliegen, auch sehr interessant und bieten neue Ansätze.

Sowohl Angiospermien als auch Grünalgen weisen diurnale und/oder circadiane Rhythmen der steady state *Lhc* mRNA Konzentration auf. Diurnale Muster wie in diesen Untersuchungen wurden bei verschiedenen Pflanzenarten beobachtet. So konnten diurnal oszillierende steady state mRNA Konzentrationen der *Lhc* Gene bei Bohnen (Kloppstech 1985), Tomaten (Piechulla and Gruissem 1987) und Weizen (Nagy *et al.*, 1988; Piechulla 1993) beobachtet werden. Auch hier erreichten die steady state mRNA Konzentrationen ihr

Maximum etwa um Mittag, fielen am Nachmittag ab, und konnten nachts nicht mehr nachgewiesen werden.

Auch bei Einzellern lassen sich diurnale Rhythmen im Metabolismus beobachten. So ist die Stickstofffixierung bei verschiedenen diazotrophischen Cyanobakterien ebenfalls diurnal geregelt (Sherman *et al.*, 1998), wobei hier die N₂-Fixierung auf die Dunkelphase beschränkt wird, um nicht durch die O₂-Produktion der Photosynthese des Tages behindert zu werden.

Allerdings weichen einige Gymnospermen von dieser Beobachtung ab und zeigen keine rhythmische Oszillation (Piechulla, 1999). Kellmann *et al.* (1993) untersuchte die steady state mRNA Konzentrationen von 19 Mitgliedern der *Lhca/Lhcb* Genfamilie von *Lycopersicon esculentum* (Tomate) und fand heraus, daß jedes Gen exprimiert und daß die individuelle mRNA auf bestimmten Mengen akkumuliert. Die mRNA Mengen aller Gene zeigten diurnale und circadiane Oszillation. Hahn and Kuck (1999) untersuchten die Expression von *lhcb1* bei *Chlamydomonas reinhardtii* und *Euglena gracilis*. Dieses Gen codiert ein *Chl a/b* bindendes Protein von PSII, und man fand heraus, daß die Expression dieses Gens sowohl durch Licht, Inhibitoren der Chlorophyll-Synthese als auch durch circadiane Rhythmen reguliert wird. Die Regulation der Genexpression findet anscheinend auf der Stufe der Transkription statt. Es zeigte sich für die circadiane Synthese der zwei LH Untereinheiten von *Euglena gracilis*, daß die Akkumulation dieser LH Untereinheiten während der Beleuchtung auf transkriptionaler Ebene kontrolliert und reguliert wird.

Untersuchungen an den Lhc Protein Genen von Höheren Pflanzen durch Piechulla (1993) haben gezeigt, daß Dunkel–Licht (Sonnenaufgang) oder Licht–Dunkel Übergänge dominante ‚Zeitgeber‘ sind, d.h. sie sind das Signal, welches den endogenen Rhythmus synchronisiert.

Für die circadiane Synthese von zwei LH Untereinheiten von *Euglena gracilis* hat sich gezeigt, daß die Akkumulation der LH Untereinheiten während der Beleuchtung auf der transkriptionalen Ebene kontrolliert und reguliert wird. Die Gesamtmenge an LH Protein blieb konstant, wenn *Euglena* unter wechselnden diurnalen Bedingungen gezüchtet wurde, während die Menge an neusynthetisierten Polypeptiden etwa um den Faktor 20 variieren konnten. Die höchste Konzentration an neusynthetisierten Polypeptiden fand sich bei Zellen, die in der Lichtphase geerntet wurden. Bei der Untersuchung der steady state mRNA Konzentrationen spezifischer mRNA wurden nur geringe Schwankungen über den beobachteten Zeitraum gefunden (Künne *et al.*, 1998). Passaquet und Lichtle (1995) demonstrierten an der Chrysophyce *Giraudiopsis stellifer*, daß das *cac* Gen auf der transkriptionalen Ebene lichtinduziert wird. Allerdings zeigte dieses Gen keine circadiane Expression und stellt somit einen Sonderfall bei den LH Protein-Genen dar. Als *Giraudiopsis*

stellifer vom regulären Licht-Dunkel Rhythmus in eine Dauerdunkel-Umgebung überführt wurde, zeigte sich kein rhythmisches Expressionsmuster.

Die steady state *fcp* mRNA Konzentrationen von *Thalassiosira weissflogii* stieg ebenfalls unter Licht an, und erreichte den höchsten Wert etwa 6 bis 8 Stunden nach Beginn der Beleuchtung (Leblanc *et al.*, 1999). Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen ebenfalls, daß die 4 verschiedenen Gencluster auf der transkriptionalen Ebene lichtinduziert werden und zumindest einen diurnalen Rhythmus aufweisen.

Die Interpretation dieser Daten und der von anderen wird durch die Tatsache kompliziert, daß neben dem Lichtklima einige andere Faktoren existieren, welche sowohl die Transkription der *Lhc* Gene, als auch die Translation der LH Untereinheiten beeinflussen, und damit die Umsatz- und Abbauzeit der mRNAs und Proteine. Die unterschiedlichen Transkriptmengen lassen vermuten, daß sich auch die Fcp-Proteinmengen entsprechend der steady state mRNA Konzentrationen ändern. Laut Kloppstech *et al.* (1997) und Piechulla *et al.* (1998) ist dies allerdings nicht garantiert, d.h. es müssen nicht unbedingt mit ändernden Transkriptmengen sich auch die Proteinmengen im gleichen Verhältnis ändern.

Unter anderem moduliert der Redoxzustand des Plastochinon-Pools, welche von der Anregungsrate der photosynthetischen Reaktionszentren reguliert wird, die *Lhc* Expression. Die Expression der *Lhc* Gene wird darüberhinaus von Pflanzenhormonen und anderen Zellmetaboliten wie Sucrose oder Chlorophyllpigmenten beeinflusst. Es ist bekannt, daß die Genregulation der LH Untereinheiten über Gene co-reguliert wird, die Enzyme in der Chlorophyll-Synthese codieren. Mutanten von Reis, die variierende Raten bei der Chl b Synthese aufweisen, haben LH Untereinheiten Umsatz, die invers proportional zu den Chl b Mengen sind. Dies läßt vermuten, daß Ligandenassoziation die LH Polypeptide stabilisiert. Ein schneller Umsatz der LH Untereinheiten verhindert vielleicht die Akkumulation von abweichenden Pigment-Protein Komplexen innerhalb der Thylakoidmembranen (Grossman *et al.*, 1995). Die gemessenen Änderungen in den Konzentrationen der steady state mRNA kann daher aus Veränderungen der Transkriptionsraten herrühren.

4.8. Circadianes Expressionsmuster

Wie zuvor erwähnt, ist die Ausbildung eines circadianen Rhythmus bei verschiedenen Aspekten des Metabolismus evolutionär von Vorteil. Ein circadianes Expressionsmuster unterscheidet sich vor allem durch die Fortsetzung der Oszillation des beobachteten Aspekts beim Wegfallen des zeitgebenden Faktors. Die „Erwartung des nächsten Tages“ ist somit nicht nur durch den „Zeitgeber“ reguliert, sondern wird vielmehr auch durch eine endogene Rhythmik kontrolliert.

Wie die diurnale Rhythmik sind auch die circadian oszillierende steady state mRNA Konzentrationen vor allem bei den *Lhc* Genen der Höheren Pflanzen gut untersucht, z. B. Angiospermen und Grünalgen. Im allgemeinen steigen die Transkriptmengen nach Beginn der Beleuchtung an, erreichen ein Maximum etwa um die Mittagszeit und sinken am Nachmittag wieder ab, ähnlich wie bei diurnalen Rhythmen. Die Schwankungen der mRNA Akkumulation setzen sich allerdings auch fort, wenn die Pflanzen aus ihren normalen Licht-Dunkel Wachstumsbedingungen in eine Umgebung mit entweder Dauerbeleuchtung oder Dauerdunkelheit überführt werden.

Ein Grund für die Existenz der circadianen Rhythmen in Pflanzen vermutet man in der ‚Erwartung des nächsten Tages‘. Im Fall der Cab Proteine scheint es wichtig zu sein, Pflanzen in optimale Bedingungen für die Synthese und Zusammenbau der Thylakoidmembranen zu versetzen, die für die funktionierende Photosynthesereaktion notwendig sind (Piechulla and Riesselmann 1990). Hierbei spielt neben dem Licht auch die Umgebungstemperatur eine wichtige Rolle. Bei Tomaten liegt beispielsweise für die optimale Expressionsrate für *cab* Protein-Gene die Temperatur zwischen 18 - 24°C. Hierbei zeigte sich, daß hohe und niedrige Temperaturen als effektive „Zeitgeber“ für die Synchronisierung der Rhythmen bei Pflanzen fungieren. Eine ähnliche Hypothese gibt es auch bei den endogenen Rhythmen von kaltblütigen Tieren (Bünning 1977). Temperatur stellt also neben dem Licht einen wichtigen Einflußfaktor bei der Ausbildung eines endogenen Expressionsrhythmus dar.

Deshalb mußte die Temperatur bei diesen Untersuchungen auch konstant gehalten werden.

Dieser Effekt läßt sich auch bei dieser Untersuchung beobachten. Die Oszillation der steady state *fcp* mRNA setzt sich auch nach Entfernen des „Zeitgebers“ (in diesem Fall: Licht) im gleichen Muster fort, welches auch beim normalen LD/DL – Rhythmus beobachtet werden kann. Die Daten der Untersuchungen zur circadianen Expression der *fcp2* und *fcp6* Gene erfüllen einige der Charakteristika, die für eine circadiane Rhythmik ausschlaggebend sind. Besonders die Tatsache, daß ein circadianer Rhythmus auch unter konstanten Außenbedingungen (Dauerdunkel oder Dauerlicht, Temperatur- und Feuchtigkeitskonstanz)

weiterläuft, wobei die Schwingungsamplitude in manchen Fällen langsam abnimmt, wird hier erfüllt. Daher ist es sicher, daß die Expression zumindest die Gene *fcp2* und *fcp6* einem circadianen Muster unterliegen.

Die Ergebnisse der Expressionsmusterstudien für *fcp4* und *fcp12* lieferten leider keine so deutlichen Ergebnisse wie die der beiden anderen Gene. Dennoch ist eine deutliche Oszillation der steady state *fcp* mRNA Konzentrationen beider Gene zu beobachten. Trotzdem sollten die Ergebnisse nicht völlig vernachlässigt werden, da laut Sitte *et al.* (1998) die Amplituden in einem endogenen Rhythmus nicht unbedingt abnehmen müssen. Generell war bei beiden Untersuchungen zu sehen, daß die Expression der steady state mRNA Konzentration sich ähnlich wie die bei *fcp2* verhält. Ungewöhnlich ist nur, daß die Amplitude sich im Dauerdunkel bei beiden Genen erst erhöht, dann wieder fällt, um am letzten Versuchstag wieder anzusteigen.

Eine t-Test Analyse zur statistischen Signifikanz der bei dieser Untersuchung erhaltenen Daten zeigte, daß die Unterschiede der steady state mRNA Konzentrationen der Gene *fcp2*, *fcp6* und *fcp12* zwischen den verschiedenen Zeitpunkten statistisch signifikant waren. Bei den Messwerten zur circadianen Rhythmik von *fcp4* ließ sich nur bei wenigen Messungen eine statistische Signifikanz beobachten.

Es wird generell akzeptiert, daß die Tag/Nacht- oder Nacht/Tag-Übergänge eine wichtige Rolle bei der Synchronisation des circadianen Rhythmus und bei der Entwicklung der Akkumulationsamplitude spielen, also einer Konzentrationsschwankung der steady state mRNA mit einem Maximum und Minimum, und daher wird das Oszillationsmuster jeden Tag neu eingestellt. Die Temperatur unterstützt neben Licht zusätzlich die Ausbildung des Rhythmus (Piechulla 1999, Piechulla and Riesselmann 1990).

Wie unter 4.7. erwähnt sind Informationen über die diurnale/circadiane Expression der LHC Polypeptid codierenden Gene sehr rar. Auch muß die Lichtinduzierbarkeit von Genen kein sicheres Merkmal für das Vorhandensein eines diurnalen oder circadianen Rhythmus sein, wie Passaquet und Lichtlé (1995) nachweisen konnten.

Die diurnale Rhythmik, die in 4.7. für das *fcp2* Gen von *Cyclotella cryptica* diskutiert wurde, läßt sich auch in den Ergebnissen des ersten Versuchstages dieser Untersuchung wiederfinden, was nochmal die Ergebnisse aus 4.7. untermauert. Weiterhin zeigte sich das Expressionsmuster in der folgenden Inkubationsperiode in Dauerdunkelheit. Daher können wir annehmen, daß die Expression des *fcp2* Gens von *Cyclotella cryptica* durch einen endogenen circadianen Rhythmus ähnlich dem, den man in den Höheren Pflanzen findet, kontrolliert wird.

Zu diesen Beobachtungen passen die Untersuchungen von Piechulla *et al.* (1998), bei denen die Oszillation der mRNA Akkumulation in Dauerlicht und Dauerdunkel noch zu messen war, wobei sich allerdings die Amplitude im letzteren Fall verringerte und meist nach drei Tagen nicht mehr meßbar war.

Das Expressionsmuster des *fcp6* Gens von *Cyclotella cryptica* wich vom bekannten Muster etwas ab, welches *fcp2* zeigt. *fcp2* codiert vermutlich ein übliches lichtsammelndes Polypeptid, welches an die zwei Photosysteme bindet (Eppard *et al.*, 2000). Phylogenetische Analysen zeigten, daß Fcp6, also das Protein von *fcp6*, die höchste Homologie mit den Fcps der Haptophyceen *Isochrysis galbana* und den lichtinduzierbaren und *cab*-verwandten Proteinen LI818r-3 and LI818 von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlamydomonas eugametos* (Eppard *et al.* 2000) hat. Es gibt leider keine Informationen über die Expressionsmuster der Gene, welche die Fcps von *Isochrysis galbana* codieren, während es für LI818r-3 and LI818 schon einige Untersuchungen gibt. Im Gegensatz zu den *Lhca1*1* und *cabII-1* mRNA Konzentrationen von *Chlamydomonas reinhardtii*, welche ihr Maximum sechs bis acht Stunden nach Beginn der Lichtphase erreichten, erhöhte sich die mRNA Konzentration für LI818r-3 recht abrupt bei Beleuchtung. Dieses Verhalten ähnelt den Ergebnissen dieser Arbeit für die Expression von *fcp6*. Eine Schwankung der LI818r-3 Transkriptmengen wurde, wenn auch mit geringeren Amplituden, selbst bei Beginn der Lichtperiode beobachtet, wenn die *Chlamydomonas* Zellen dabei im Dunkeln gehalten werden (Savard *et al.*, 1996). Gegenwärtig sind die genauen Funktionen von LI818r-3 und LI818 noch nicht bekannt, aber es wird vermutet, daß sie eine Rolle als Stellvertreter für die LHC Polypeptide einnehmen und beim Schutz der Reaktionszentren gegen photooxidativen Schaden mitwirken. Da die *fcp6* mRNA Menge von *Cyclotella cryptica* unter starkem Weißlicht am höchsten ist, und ein ähnliches Expressionsmuster zeigt wie LI818 mRNA, könnte das Genprodukt von *fcp6* ebenfalls eine ähnliche Rolle bei der Photoprotektion spielen.

Die mRNA Akkumulation zu unterschiedlichen Tageszeiten wird vermutlich durch die Promotorsequenzen der Gene kontrolliert. Tageszeitspezifische Promotormotive sind von Höheren Pflanzen bekannt. Promotor Sequenzanalyse zusammen mit Promotordeletion von vier Tomatenarten zeigten, daß das Motiv "CAA(N)₃₋₄ATC" in der circadianen *Lhc* Genexpression beteiligt ist, während die Consensus Promotorsequenz "AAAAATCT" für *Lhcb1*3* Gens von *Arabidopsis thaliana* identifiziert wurde (Kellmann *et al.*, 1999; Hoffroge *et al.*, 2003). Die mRNAs dieser Gene erreichen ihr Maximum gegen Mittag. Allerdings gipfeln 31 Gene mit dem Element "AAAATATCT" demgegenüber am Abend (Harmer *et al.*,

2002). Eine Identifikation der Promotorelemente der *fcp* Gene erweist sich als schwierig. Gegenwärtig sind die DNA Sequenzdaten für *fcp* Gene und ihre 5'- und 3'-flankierenden Regionen nur für die *fcpA*, *fcpB*, *fcpC* und *fcpD* Genen von *Phaeodactylum tricornutum* bekannt (Bhaya and Grossman 1993). Eine Untersuchung des ganzen 5564 bp langen DNA Fragmentes auf die Motive "CAA(N)₃₋₄ATC" und "AAAAATCT" hin ergab keine signifikanten Daten. Das gekürzte Motiv 'AATC' erschien 19mal; zweimal vor *fcpA*, einmal vor *fcpB* und sechs- und fünfmal in nichttranslatierten Regionen vor *fcpC* und *fcpD*, respektiv. Da sowohl die Distanz von der codierenden Sequenz und ihre umliegenden Sequenzen ziemlich variabel waren, ist es höchst unwahrscheinlich, daß *Phaeodactylum tricornutum*, und damit die Diatomeen im allgemeinen, die gleichen Promotormotive nutzen wie die Höheren Pflanzen. Daneben existieren Untersuchungen, bei denen einige verschiedene cis-regulative Motive für Pflanzen gefunden wurden (Manzara *et al.*, 1991, Schindler and Cashmore 1990). Ein wichtiges Element ist hier "ACGT", die G-Box (Guilano *et al.* 1988), welche in den Promotoren von Pflanzengenomen verschiedener Proteine gegenwärtig ist (Williams *et al.*, 1992).

Circadiane Rhythmen wurden bisher in fast jedem eukaryotischen Organismus und in einigen Prokaryoten gefunden (Kondo *et al.*, 1993). Trotz ihres universellen Erscheinens ist der molekulare Mechanismus der *circadianen clock* noch nicht verstanden.

5. Zusammenfassung

5. Zusammenfassung:

5.1. Spektroskopie

Untersuchungen an den Pigmenten mittels Spektroskopie sollten auf einfache Weise Unterschiede in den verschiedenen Anzuchten erkennen lassen und so Rückschlüsse auf den Einfluß von Lichtqualität und -quantität auf die Pigmentzusammensetzung der Zellen von *Cyclotella cryptica* geben.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit erweist sich die Spektroskopie allerdings als nicht ausreichend. Die Werte reichen für die hier vorliegende Fragestellung nicht aus. Es ist zwar zu beobachten, daß die Verhältnisse von Chlorophyll zu Carotinoiden sich ändern, doch diese Unterschiede sind sehr gering, so daß sie nicht als signifikante Veränderungen betrachtet werden können. Die Methoden der Spektroskopie liefern nur wenig signifikante Ergebnisse, die im Hinblick auf die Untersuchung der verschiedenen Anzuchten von Bedeutung wären.

5.2. Transkriptlängen

Die Transkriptgrößen der *fcp* Gene von *Cyclotella cryptica*, die zu verschiedenen *fcp* Genclustern gehören und verschiedene Fucoxanthin Chlorophyll *a/c* lichtsammelnde Polypeptide (Fcps) codieren, wurden bestimmt. Es ergaben sich für die Transkriptgrößen folgende Daten: ungefähr 950 für *fcp2*, 1050 für *fcp4*, 880 für *fcp6* und 1150 Nucleotide für *fcp12*.

Die erhaltenen Transkriptlängen für das Gen *fcp2* und das Gen *fcp6* stimmen mit den Daten der cDNA Klone aus früheren Untersuchungen überein. Der cDNA Klon, welcher *fcp4* codiert, weist eine relativ große nichtcodierende 3'-Sequenz von 279 Nucleotiden auf, wenn man ihn mit anderen *fcp* Genen vergleicht (75-155 Nucleotide), allerdings fehlte ihm die codierende 5'-Sequenz.

Das Gen *fcp12* wies mit 1150 Nucleotiden die höchste Transkriptlänge auf. Basierend auf den Daten des ursprünglichen cDNA Klons war eigentlich ein kleineres Transkript zu erwarten, obwohl das Gen *fcp12* das Größte der *fcp* Gene von *C. cryptica* ist (Eppard and Rhiel, 1998; 2000; Eppard *et al.*, 2000).

5.3. RNA Ausbeute

Bei der Isolation der für die Untersuchungen notwendigen Gesamt RNA hat sich gezeigt, daß bei gleichen Mengen an Flüssigkulturen nach der Aufarbeitung immer wieder recht unterschiedliche Mengen an Gesamt RNA isoliert wurden. Dabei hat sich die Isopyknische CsCl-Dichtegradienten Zentrifugation nach Sambrock *et al.* (1989) für die nachfolgenden Untersuchungen als die sinnvollere Methode erwiesen.

Der Reinheitsgrad der RNA Lösungen variierte in begrenztem Maße, hatte dabei aber keinen signifikanten Einfluß auf die Ergebnisse der Analysen.

5.4. Effekte von Lichtquantität

Die Untersuchungen der steady state mRNA Konzentrationen der acht *fcp* Gene haben gezeigt, daß die Expression dieser Gene in ihrer Stärke von der Lichtintensität beeinflusst wird und daß sich diese Gene aufgrund ihrer unterschiedlichen Expressionsraten in zwei Gruppen einteilen lassen. So konnte gezeigt werden, daß zwei Gruppen, nämlich die Cluster um *fcp1/fcp2/fcp3/fcp5* und *fcp4*, unter geringeren Lichtintensitäten, also unter Schwachlicht, höhere steady state mRNA Konzentrationen und damit eine höhere Expressionsrate aufweisen. Demgegenüber zeigen die beiden anderen Cluster um *fcp6/7* und *fcp12* ein umgekehrtes Verhalten, nämlich eine starke Expression der Gene unter Lichtintensitäten von 300 µMol. Das bedeutet also, daß die Gene *fcp1/fcp2/fcp3/fcp5* und *fcp4* Schwachlicht-induziert sind, während die Gengruppen *fcp6/7* und *fcp12* durch Starklicht induziert werden. Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei Höheren Pflanzen beobachtet werden, so daß man davon ausgehen kann, daß das Verhalten der Gene von *Cyclotella cryptica* stellvertretend für die Klasse der Bacillariophyceae und auch der Gruppe der Heterokontophyten (Chromophyten) gelten darf.

5.5. Effekte von Lichtqualität

Bei der Analyse der Effekte durch verschiedene spektrale Wellenlängenbereiche bei der Anzucht von *Cyclotella cryptica* Flüssigkulturen wurde klar, daß die Lichtqualität ebenso wie die Lichtintensität (s.o.) einen Einfluß auf die Expression der untersuchten *fcp* Gene von *Cy. cryptica* nimmt. Hierbei ergab sich für alle vier untersuchten Gene ein ähnliches Bild, bei dem die höchsten steady state mRNA Konzentrationen bei Kulturen gefunden wurden, die unter Rotlicht, also Licht mit relativ hohen Energiemengen, angezogen wurden. Die geringsten Expressionsraten wurden bei Kulturen aus Blaulichtanzuchten gefunden, welches vergleichsweise wenig verwertbare Lichtenergie für die Photosynthese liefert. Anzuchten

unter grünen Beleuchtungsbedingungen ordnen sich mit ihren steady state Konzentrationsmessungen zwischen den beiden zuvor genannten Anzuchtbedingungen ein. Somit weisen *Cy. cryptica* Kulturen, die unter Licht des roten Wellenlängenbereiches angezogen wurden, die höchsten Expressionsraten der *fcp* Gene auf, und Blaulicht-Kulturen die niedrigsten.

5.6. Diurnale/Circadianes Expressionsmuster

Die Experimente zur Untersuchung der Expressionsmuster der acht *fcp* Gene von *Cyclotella cryptica* weisen auf das Vorhandensein eines endogenen Rhythmus bei wenigstens zwei Vertretern der *fcp* Gene hin. Es hat sich gezeigt, daß die Konzentration der steady state mRNA der acht verschiedenen *fcp* Gene über den *in vitro* Tagesverlauf einen Anstieg bis zum Mittag, also etwa 5 Stunden nach dem Einsetzen der Lichtphase, erfuhr und danach am Nachmittag zum Abend hin wieder absank. Dieses Verhalten ist ein Kennzeichen eines diurnalen endogenen Rhythmus, wie er auch bei verschiedenen Höheren Pflanzen beobachtet werden konnte. Alle acht Gene verhalten sich ähnlich und weisen damit einen diurnalen Rhythmus bei der Expression auf.

Weiterhin zeigte sich bei mindestens zwei der untersuchten Gencluster (*fcp1/fcp2/fcp3/fcp5* und *fcp6/7*) ein circadianer Rhythmus bei der Konzentration der steady state mRNA über den Verlauf von vier Tagen. Es war zu erkennen, daß die steady state mRNA Konzentrationen dieser Gene nicht nur Schwankungen über den simulierten Tagesverlauf unterlagen, sondern daß der beobachtete Rhythmus für die analysierten Gene auch bei Entfernen des „Zeitgebers“, in diesem Fall dem Licht, trotzdem weiter zu beobachten war. Da die Konzentrationsschwankungen der steady state mRNA auch über den Verlauf dreier Tage ohne Lichtreiz einen Rhythmus aufwiesen, der dem aus den Experimenten der Anzucht unter 12h-Licht/ 12h-Dunkelheit entsprach, kann hier von einem circadianen Rhythmus bei der Expression der Gene *fcp2* und *fcp6* gesprochen werden.

Die Vermutung liegt nahe, daß auch die Expression der anderen *fcp* Gene (*fcp4* und *fcp12*) ebenfalls einem circadianen Rhythmus unterliegen, doch ergab sich bei den Untersuchungen der beiden anderen Gencluster kein signifikanter Rhythmus, der diese Aussage zweifelsfrei zuließ.

6. Anhang

Circadiane Rhythmik

Ergebnisse der t-Test Analyse der verschiedenen Messpunkte aus den Experimenten zur Circadianen Rhythmik der *fcp* Gene

fcp2

	t-Test Messpunkte Tag 1					
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,58	1,59*10 ⁻⁴	5,56*10 ⁻⁵	0,01	0,11	0,74
	t-Test Messpunkte Tag 2					
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,33	4,54*10 ⁻³	0,21	0,43	0,52	0,11
	t-Test Messpunkte Tag 3					
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,42	0,02	8,92*10 ⁻⁴	0,02	0,16	0,84
	t-Test Messpunkte Tag 4					
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,56	0,09	0,05			

fcp4

	t-Test Messpunkte Tag 1					
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,84	0,05	0,02	0,19	0,48	0,08
	t-Test Messpunkte Tag 2					
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,78	0,80	0,02	0,42	0,05	4,80*10 ⁻³
	t-Test Messpunkte Tag 3					
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,08	0,78	0,22	0,61	0,75	0,78
	t-Test Messpunkte Tag 4					
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,33	0,14	7,42*10 ⁻⁴			

fcp6

t-Test Messpunkte Tag 1						
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,16	0,02	$1,60 \cdot 10^{-6}$	$3,82 \cdot 10^{-4}$	$2,41 \cdot 10^{-3}$	0,29
t-Test Messpunkte Tag 2						
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,10	$3,73 \cdot 10^{-4}$	0,01	0,54	0,01	0,11
t-Test Messpunkte Tag 3						
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,67	$1,70 \cdot 10^{-3}$	0,02	0,26	0,82	$1,54 \cdot 10^{-3}$
t-Test Messpunkte Tag 4						
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,08	$1,88 \cdot 10^{-3}$	0,07			

fcp12

t-Test Messpunkte Tag 1						
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,34	0,03	0,86	0,07	0,47	0,15
t-Test Messpunkte Tag 2						
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,76	0,01	$2,75 \cdot 10^{-3}$	0,14	0,02	0,77
t-Test Messpunkte Tag 3						
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,43	$1,58 \cdot 10^{-4}$	0,75	0,03	0,94	0,01
t-Test Messpunkte Tag 4						
	7-9 Uhr	9-14 Uhr	14-19 Uhr	19-21 Uhr	21-03 Uhr	03-07 Uhr
P value	0,01	0,54	0,01			

Datensammlung der Dot Blot Analyse zur Circadianen Rhythmik

Mittelwerte der Rohdaten der Dot Blot Analyse aus den Experimenten zur Circadianen Rhythmik (Pixelvolumen der *fcf* Blot auf Pixelvolumen der 18S Blots normiert (jeweils 2 18S Dot Blot Durchgänge)

fcf2 Rohdatensammlung Pixelvolumen der Dot Blot auf 18S normiert (1. Reihe)

Uhrzeit	f2/18S k	f2/18S k		f2/18S L	f2/18S L
07:00	0,51237716	0,36728229		0,29682382	0,21277399
09:00	0,71362752	0,71053467		0,43735648	0,43547111
14:00	1,40223706	0,76970285		0,82489121	0,45280203
19:00	0,22377137	0,30099911		0,13581814	0,18269459
21:00	0,18095494	0,08770635		0,09479767	0,04594807
02:00	0,29951314	0,19138402		0,14591969	0,09324205
07:00	1,30476674	0,21044247		0,87016065	0,1403494
09:00	1,25364605	0,30193084		0,86777206	0,20900123
14:00	1,1484141	0,2792326		0,7124221	0,17322673
19:00	0,57909233	0,20690207		0,36679984	0,13105523
21:00	0,69288782	0,09226888		0,37220508	0,04956577
02:00	0,33140395	0,04505709		0,08847034	0,01202843
07:00	0,50017311	1,00314542		0,26553827	0,53257403
09:00	0,17470055	0,83117652		0,1146391	0,54543217
14:00	0,85604546	0,21513473		0,48860468	0,12279468
19:00	0,47269998	0,21208026		0,28582742	0,12824119
21:00	0,28698858	0,05518715		0,18282387	0,0351572
02:00	0,41182687	0,07670656		0,26966003	0,05022742
07:00	0,59957555	0,2105743		0,38028704	0,13356214
09:00	1,18860168	0,21143884		0,58470688	0,10401525
14:00	0,93700721	0,20247021		0,53098317	0,1147394
19:00	0,54516013	0,09917509		0,30304683	0,05513101

fcp2 Rohdatensammlung Pixelvolumen der Dot Blot auf 18S normiert (Parallelversuch)

Uhrzeit	f2/18S k	f2/18S k	f2/18S k	f2/18S L	f2/18S L	f2/18S L
07:00	0,97959866	0,88140783	0,62826982	0,66750051	0,60058078	0,428104328
09:00	0,93287621	1,18842542	0,46875141	0,58908359	0,75043816	0,296002577
14:00	2,7501961	3,92488614	2,26114153	0,90228572	1,28764229	0,741836448
19:00	2,10031819	2,8562755	1,75271702	0,58117444	0,79033637	0,484990481
21:00	1,17312659	1,24193099	0,58579761	0,5437999	0,57568229	0,271545018
02:00	0,92303665	0,34121569	0,32070117	0,48584798	0,17959906	0,168803716
07:00	0,83730806	0,201974	0,54431044	0,32186057	0,07763776	0,209232508
09:00	1,00012092	0,44114099	0,63891921	0,43999665	0,19407418	0,28108832
14:00	1,4772665	1,23139401	1,09902383	0,9394504	0,78307402	0,698911378
19:00	1,69154821	1,28229041	0,90207137	0,79512949	0,60274248	0,424027848
21:00	1,71886901	1,13211654	0,5700111	0,68056304	0,44823825	0,225688221
02:00	1,02297267	1,10755439	1,2054134	0,34821919	0,3770049	0,410321893
07:00	0,73403599	1,01898427	0,37921209	0,32287659	0,44820666	0,166802049
09:00	0,70739357	0,90903939	0,38482631	0,35432046	0,45531249	0,192752442
14:00	1,1734326	1,1846169	0,86396388	0,50822499	0,51305859	0,374191103
19:00	0,56600082	0,79124585	0,44559745	0,24351902	0,34042344	0,191716071
21:00	0,74178428	1,05439817	0,59560139	0,32665786	0,46431374	0,262283628
02:00	0,35117407	0,34771532	0,15386125	0,39251169	0,16034342	0,070951808
07:00	0,76415233	0,55794704	0,51056091	0,27893306	0,20366051	0,186366396
09:00	1,05629133	0,54545522	0,50950124	0,36003109	0,18591278	0,173660694
14:00	0,61699022	1,33889758	0,47511189	0,30465954	0,66111149	0,234602374
19:00	0,52352583	0,28604973	0,25147173	0,26436449	0,14444441	0,126985511

fcp4 Rohdatensammlung Pixelvolumen der Dot Blot auf 18S normiert (1ster Reihe)

Uhrzeit	f4/18S k	f4/18S k	f4/18S L	f4/18S L
07:00	0,44979216	0,40907164	0,29511259	0,26362815
09:00	0,4902798	0,34193852	0,34159017	0,24963758
14:00	0,83009566	1,08584677	0,56621936	0,67657142
19:00	0,28578905	0,45357432	0,19546702	0,3339907
21:00	0,24868897	0,31154039	0,1494268	0,19377132
02:00	0,36338287	0,36291699	0,20346986	0,18306223
07:00	0,56162061	0,49857442	0,41371054	0,37443733
09:00	0,67749544	0,46233222	0,51447862	0,34612791
14:00	0,60044174	0,77558868	0,42787928	0,52731845
19:00	0,24387303	0,25998157	0,17740277	0,11914072
21:00	0,36115051	0,31402242	0,23208226	0,18503865
02:00	0,11571036	0,10128669	0,03478375	0,0270856
07:00	0,29644992	0,25084731	0,16959616	0,22281756
09:00	0,48013207	0,31132217	0,3397093	0,31707846
14:00	0,59249509	0,49095395	0,37700148	0,32185165
19:00	0,35173779	0,27498309	0,2432798	0,19628024
21:00	0,46450604	0,2812372	0,32358451	0,21754981
02:00	0,61219135	0,31262337	0,43811243	0,20870959
07:00	0,66065293	0,43390013	0,46568571	0,30580806
09:00	0,94220568	0,95762021	0,55033967	0,55007663
14:00	0,59648049	0,68587467	0,39319621	0,48166706
19:00	0,32874159	0,405361	0,21714153	0,25948881
21:00	0			
02:00	0			

fcp4 Rohdatensammlung Pixelvolumen der Dot Blot auf 18S normiert (Parallelversuch)

	f4/18S k	f4/18S k	f4/18S k	f4/18S L	f4/18S L	f4/18S L
07:00	0,95521703	1,35563399	1,07622376	0,53636297	0,61582116	0,73334105
09:00	0,85169221	1,52390095	1,22536782	0,48870788	0,64153209	0,77378334
14:00	2,8281856	3,82626696	4,59681902	1,25308584	0,83688239	1,50812669
19:00	1,20400576	3,34496369	2,55402592	0,61209319	0,61705171	0,70671891
21:00	0,58080362	0,85479024	0,92333441	0,32670455	0,26415726	0,42800936
02:00	0,16614945	0,59208538	0,43465484	0,10160016	0,20776603	0,22878418
07:00	0,59833795	0,84252971	0,98666008	0,35130002	0,21591184	0,37927137
09:00	0,97211711	1,28817267	0,89793007	0,5338381	0,37781542	0,39503845
14:00	1,04194795	1,02750827	1,34960908	0,5734322	0,43562126	0,85826815
19:00	1,10877178	1,16314447	1,66257373	0,56083947	0,36449862	0,78150974
21:00	1,34206454	0,74891	1,65217301	0,67308381	0,19768055	0,65415566
02:00	1,134034	0,98392795	0,52790913	0,59102458	0,2232856	0,17969991
07:00	0,83678328	0,88079931	1,04455489	0,5039082	0,5515316	0,45946292
09:00	0,70536055	1,19621037	0,72955702	0,41654043	0,39943989	0,36542173
14:00	0,96726353	2,15890972	1,16479385	0,57819282	0,6233631	0,50448347
19:00	0,44510669	0,84295394	0,35053904	0,27095018	0,24178447	0,15081766
21:00	0,55091222	0,74205028	0,3990114	0,33777104	0,21784999	0,17571174
02:00	0,61325718	1,05644071	0,58561083	0,37517314	0,3247791	0,27004946
07:00	0,50705956	0,90848949	0,51315799	0,31425118	0,22107961	0,18731439
09:00	0,55179127	1,85409234	0,91074416	0,32302721	0,42130479	0,31042214
14:00	0,44177022	0,61491202	0,55786328	0,26363528	0,53161119	0,27546364
19:00	0,24369778	0,54814592	0,36913836	0,14857462	0,28552512	0,18640355

fcp6 Rohdatensammlung Pixelvolumen der Dot Blot auf 18S normiert (1ster Reihe)

Uhrzeit	f6/18S k	f6/18S k	f6/18S k	f6/18S L	f6/18S L	f6/18S L
07:00	0,12953314	0,73419832	0,40115541	0,07498818	0,46885714	0,23257574
09:00	0,46496946	0,33121272	1,35887275	0,28474715	0,22708168	0,83354161
14:00	0,44179955	0,77864284	1,15099319	0,2596765	0,45802382	0,67770169
19:00	0,24376059	0,37852858	0,58276272	0,14781046	0,23409362	0,35405467
21:00	0,14476675	0,55782114	0,30963385	0,07578113	0,2832476	0,16237207
02:00	0,23877568	0,53546925	0,56629044	0,11622247	0,2539461	0,27617405
07:00	0,42644413	1,00099273	1,13809548	0,2841861	0,62406722	0,75969703
09:00	0,41681438	1,14508042	1,30654707	0,28833813	0,72995705	0,90518805
14:00	0,71492078	1,78495166	2,31992133	0,44328553	0,96959249	1,44027492
19:00	0,44278154	0,78461452	1,15070314	0,28022854	0,49464372	0,72952136
21:00	0,38363699	0,41871857	0,8862472	0,20587443	0,23679736	0,47658362
02:00	0,06035571	0,10000268	0,42798124	0,01609608	0,02592033	0,114424
07:00	0,07424718	0,40166388	0,29508606	0,03941593	0,20226398	0,15673244
09:00	0,17271388	0,37216518	0,01948169	0,11314517	0,23589752	0,01279245
14:00	0,49699616	1,28589819	1,64720694	0,2834799	0,65479916	0,94087408
19:00	0,28453134	1,22701242	1,2871564	0,17199463	0,72380949	0,77897638
21:00	0,14257552	0,29640959	0,18269159	0,09071597	0,15308693	0,11651273
02:00	0,25725603	0,3357304	0,43384825	0,1682515	0,32448632	0,28440191
07:00	0,39893914	0,70397124	1,06580236	0,25282316	0,4703117	0,67659116
09:00	0,70121855	1,75274142	2,67431985	0,34475834	0,81559228	1,31657188
14:00	0,5858597	1,16590024	2,26728189	0,33183606	0,61131022	1,28578559
19:00	0,29441828	0,82133179	1,07989296	0,16357179	0,43796496	0,60084203
21:00	0	0				
02:00	0	0				

fcp6 Rohdatensammlung Pixelvolumen der Dot Blot auf 18S normiert (Parallelversuch)

Uhrzeit	f6/18S k	f6/18S k	f6/18S k	f6/18S L	f6/18S L	f6/18S L
07:00	2,20540585	1,01737406	1,35096535	1,50412972	1,07828643	0,92055052
09:00	2,99635497	1,43240728	1,80335287	1,8938104	1,40945484	1,13876371
14:00	3,765154	2,63773404	1,90475032	1,23637548	1,0506338	0,62491144
19:00	1,57897771	1,09827401	0,90103069	0,43736509	0,37690948	0,24932223
21:00	0,2021266	0,15560615	0,18387856	0,09379561	0,07867233	0,08523645
02:00	1,78326144	1,00281696	0,93264494	0,93973546	0,54700387	0,49090539
07:00	2,90686486	2,0622858	1,40183783	1,1186774	0,72692537	0,53886537
09:00	2,91742761	1,96252232	1,5016077	1,28477106	0,93605566	0,66062247
14:00	0,36829848	0,99697863	0,28064478	0,23446046	0,33678658	0,17847278
19:00	0,13328273	0,30482497	0,05568166	0,06273669	0,09903254	0,02617373
21:00	0,02840078	0,22701899	0,06263295	0,01124812	0,08803739	0,02479867
02:00	1,54378814	0,71385617	1,2564503	0,52589192	0,40168315	0,42769482
07:00	2,4018718	1,31749149	1,28102087	1,05771146	0,61240165	0,56347598
09:00	2,23697144	0,92769953	1,17451678	1,12162394	0,70596299	0,58829391
14:00	0,36297067	0,59595922	0,26285575	0,15739657	0,2277431	0,11384536
19:00	0,09723241	0,29613127	0,06694783	0,04190749	0,09568449	0,02880397
21:00	0,09726091	0,05294387	0,0536996	0,0428804	0,03136852	0,02364757
02:00	0,20981314	0,03812159	0,02945091	0,0969136	0,0175821	0,01358104
07:00	1,35051931	0,77657347	0,65208396	0,49364074	0,29784128	0,23802554
09:00	2,06351877	0,91420503	1,0429386	0,70420535	0,42006945	0,35547989
14:00	0,18032228	0,22716491	0,14469312	0,08916343	0,08852885	0,07144706
19:00	0,10106215	0,22289029	0,00885112	0,05111358	0,0689886	0,00446954

fcp12 Rohdatensammlung Pixelvolumen der Dot Blot auf 18S normiert (1ster Reihe)

Uhrzeit	f12/18S k	f12/18S k	f12/18S k	f12/18S k	f12/18S k
07:00	0,15239364	0,00437788	0,88567694	0,003090918	0,049501422
09:00	0,18688037	0,01615774	0,95994998	0,026845132	0,332545842
14:00	0,5586153	0,29303744	1,47347038	0,385912594	0,473690859
19:00	0,38439936	0,35870709	0,72386148	0,371072268	0,34660948
21:00	0,32791689	0,21376475	0,49308599	0,212131725	0,227117753
02:00	0,43313292	0,41034073	0,85448246	0,370033128	0,112185614
07:00	0,86872621	0,59011879	1,30236491	0,588229324	0,577542686
09:00	0,94289321	0,53430961	1,45897877	0,534566621	0,597774944
14:00	2,40134146	0,95845474	2,72264079	0,990317181	1,66036095
19:00	0,48299678	0,39187135	1,08781695	0,351597341	0,469985953
21:00	0,22834499	0,28474639	0,43511114	0,247590362	0,347662771
02:00	0,09030299	0,02302142	0,67575	0,121919943	0,17246994
07:00	0,09765393	0,00105902	0,83539878	0,00286073	0,26466803
09:00	0,19586136	0,00354934	0,25800489	0,018984625	0,011756518
14:00	1,25425329	0,44723264	1,68201203	0,551333086	0,568251807
19:00	1,28017325	0,50879656	1,16101607	0,523038336	0,356646439
21:00	0,12448903	0,1300983	0,31576225	0,138201927	0,090770739
02:00	0,16550468	0,14432399	0,43811938	0,148446984	0,068904072
07:00	0,42470521	0,25744084	1,0822715	0,292312052	0,383877027
09:00	1,23476769	0,76380377	2,03229347	0,831248054	0,773628397
14:00	1,5686745	0,81654736	1,94664827	0,898824109	0,952450617
19:00	0,4920128	0,35107134	0,35107134	0,361822876	0,233558303

fcp12 Rohdatensammlung Pixelvolumen der Dot Blot auf 18S normiert (Parallelversuch)

Uhrzeit	f12/18S L	f12/18S L	f12/18S L	f12/18S L	f12/18S L
07:00	0,08828469	0,002536135	0,512414592	0,00179063	0,02867717
09:00	0,114534876	0,009902226	0,587352466	0,01645279	0,20381005
14:00	0,328623104	0,17237344	0,86481302	0,22702528	0,27866362
19:00	0,233315258	0,217702796	0,438541576	0,22522624	0,21037829
21:00	0,171790835	0,111977568	0,257975961	0,11113269	0,11898365
02:00	0,211021806	0,199899635	0,415391883	0,18027967	0,05465669
07:00	0,57937545	0,393532246	0,866289377	0,39230499	0,38517781
09:00	0,65268537	0,369825772	1,007125177	0,37003534	0,41378913
14:00	1,489713336	0,594549422	1,683638662	0,61436024	1,03003338
19:00	0,305938229	0,248192054	0,687523095	0,22270763	0,29769696
21:00	0,122664273	0,152946952	0,233476665	0,13300266	0,1867604
02:00	0,024107257	0,00614488	0,180347876	0,03254771	0,04604252
07:00	0,051844876	0,00056221	0,442871339	0,00151877	0,14051335
09:00	0,128527557	0,002329032	0,169131708	0,01245803	0,00771483
14:00	0,715903115	0,255255759	0,957634635	0,31469008	0,32434696
19:00	0,774098211	0,307639544	0,700421726	0,31627207	0,21565782
21:00	0,07930625	0,082872406	0,200882462	0,08804211	0,05782587
02:00	0,108372385	0,094495428	0,286337878	0,09720301	0,04511835
07:00	0,269380158	0,163271613	0,684561314	0,1854064	0,24348383
09:00	0,607431744	0,375710603	0,996714093	0,40892425	0,38057883
14:00	0,888964174	0,462694613	1,099762499	0,50936152	0,53975154
19:00	0,273507831	0,195139077	0,369970033	0,20113581	0,12983407

Lichtqualitäts- und quantitäts-Experimente

Sammlung der gemittelten Pixelvolumen der Dot Blot Experimente des Lichtqualitäts- und quantitätsanzuchten. Pixelvolumen der mit den spezifischen Gensonden hybridisierten Dot Blots, der respektiven mit 18S Gensonden hybridisierten Blots, sowie der berechneten Standardabweichung

	Starklicht	Schwachlicht	Rotlicht	Blaulich	Grünlicht
fcp 2	101.885	312.235	123.607	53.237	96.100
Standard	4.835	11.295	6.642	26.200	18.714
18 S	570155	544670,333	265263	272993	265566
Standard/18S	0,00847981	0,02073734	0,02503806	0,09597339	0,0704669
fcp 2/18 S	0,17869772	0,57325489	0,46597836	0,19501399	0,36186895
	Starklicht	Schwachlicht	Rotlicht	Blaulich	Grünlicht
fcp 4	102.305	316.000	278.818	118.944	146.136
Standard	0	46.703	64.579	43.637	37.115
18 S	570155	544670,333	265263	272993	265566
Standard/18S	0	0,08574542	0,24345267	0,15984659	0,1397581
fcp 4/18 S	0,17943366	0,58016745	1,05110117	0,43570371	0,55028105
	Starklicht	Schwachlicht	Rotlicht	Blaulich	Grünlicht
fcp 6	192.499	42.597	147.526	2.189	26.376
Standard	2.696	804	12.987	1.703	2.102
18 S	570155	544670,333	265263	272993	265566
Standard/18S	0,00472867	0,00147654	0,04895896	0,00623826	0,00791517
fcp 6/18 S	0,33762515	0,07820694	0,55614993	0,00801852	0,09931994
	Starklicht	Schwachlicht	Rotlicht	Blaulich	Grünlicht
fcp 12	56.381	24.828	113.084	20.686	39.391
Standard	3.703	15.668	5.180	2.098	3.090
18 S	570155	544670,333	265263	272993	265566
Standard/18S	0,00649478	0,02876625	0,01952693	0,007684	0,01163501
fcp 12/18 S	0,09888783	0,04558277	0,42630773	0,0757748	0,14832989

Literaturverzeichnis

- **Anderson JM., Chow WS., Goodchild DJ.** (1988) Thylakoid membrane organisation in sun/shade acclimation. *Aust J Plant Physiol* **15**: 11-26
- **Anderson JM., Chow WS., Park Y-I** (1995) The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth Res* **46**: 129-139
- **Aoki S, Kato S, Ichikawa K, Shimizu M.** (2004) Circadian expression of the PpLhcb2 gene encoding a major light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* **45(1)**:68-76
- **Apt KE, Clendennen SK, Powers DA, Grossman AR** (1995) The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Mol Gen Genet* **246**: 455-464
- **Bassi, R., Sandonà, D., Croce, R.** (1997) Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. *Physiologia Plantarum* **100**: 769-779
- **Bathke, L., Rhiel, E., Krumbein, W.E., Marquardt, J.** (1999) Biochemical and immunochemical investigations on the light-harvesting system of the cryptophyte *Rhodomonas sp.*: evidence for a photosystem I specific antenna. *Plant Biol* **1**: 516-523
- **Berkaloff, C., Caron, L., Rousseau, B.** (1990) Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigment analysis. *Photosyn Res* **23**: 181-193
- **Berkaloff, C., Duval, JC., Jupin, H., Chrissovergis F., Caron, L.** (1981) Spectroscopic studies of isolated pigment-protein complexes of some brown algae thylakoids. *Photosynthesis III*. 485-494
- **Bhaya, D. and Grossman, A. R.** (1993) Characterization of gene clusters encoding the fucoxanthin Chlorophyll proteins of the diatom *Phaeodactylum tricomutum*. *Nucl. Acid. Res.* **21**: 4458-4466

- **Brinker, M., Klaff, P., Wissel, K., Kellmann, J.W., Piechulla, B.** (2001) Distinct Lhc mRNA stabilities in several vascular plant species. *J Plant Physiol* **158**: 1479-1485
- **Brock, T.D., Madigan, M.T., Parker, J.** (1994) *Biology of Microorganisms*, Seventh Edition Prentice-Hall International, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey
- **Büchel, C.** (2003) Fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms: 18 and 19 kDa subunits assemble into different oligomeric states. *Biochemistry*. 42(44):13027-34
- **Bünning, E.** (1977) Wirkung der Temperatur. *In* E Bünning, ed. *Die Physiologische Uhr*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 47-60
- **Caron, L., Remy, R., Berkaloff, C.** (1988) Polypeptide composition of light-harvesting complexes from some brown algae and diatoms. *FEBS Lett* **229**: 11-15
- **Chitnis, PR., Thornber, JP.** (1988) The major light-harvesting complex of photosystem II: aspects of its molecular and cell biology. *Photosyn Res* **16**: 41-63
- **Chirgwin, JM., Preybia, AI., Mac Donald, RJ., Rutter, WJ.** (1979) Isolation of biological active ribonucleic acids from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **79**: 5224-5229
- **De Boer, AD., Weisbeck, PJ.** (1991) Chloroplast protein topogenesis import, sorting and assembly. *Biochim Biophys Acta* 1071: 221-254
- **Dolganov, NAM., Bhaya, D., Grossman, AR.** (1995) Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants: Evolution and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **92**: 636-640
- **Durnford, DG. and Green, BR.** (1995) Characterization of cDNA encoding a fucoxanthin-chlorophyll protein from the chromophyte alga *Heterosigma carterae*. *In* *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Vol. I (Mathis, P., ed.), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 963-966

- **Duval, J.C. Jupin, H., Berkaloff, C.** (1983) Photosynthetic properties of plastids isolated from macrophytic brown seaweeds. *Physiol. Veg* **6**: 1145-1157

- **Eppard M, Rhiel, E.** (1998) The genes encoding light-harvesting subunits of *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae) constitute a complex and heterogeneous family. *Mol Gen Genet* **260**: 335-345

- **Eppard, M., Krumbein, W.E., von Haeseler, A., and Rhiel, E.** (2000) Characterization of *fcp4* and *fcp12*, two additional genes encoding light-harvesting proteins of *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae) and phylogenetic analysis of this complex gene family. *Plant Biology* **2**: 283-289.

- **Eppard, M., Rhiel, E., Marquardt, J., Mörschel, E., Krumbein, W.E.** (1997) The light harvesting system of the diatom *Cyclotella cryptica*. Isolation and Characterization of the main light harvesting complex and evidence for the existence of minor pigment proteins. *Botanica Acta* **110**: 109-117

- **Eppard, M., and Rhiel, E.** (2000) Investigations on gene copy number, introns and chromosomal arrangement of genes encoding the fucoxanthin Chlorophyll *a/c*-binding proteins of the centric diatom *Cyclotella cryptica*. *Protist* **151**: 27-39

- **Freeman, W. M., Walker, S. J., and Vrana, K. E.** (1999) Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potentials. *Bio Techniques* **26**,112-125

- **Friedman, AL., Alberte, RS.** (1984) A Diatom Light-harvesting Pigment-Protein Complex. Purification and Characterization, *Plant Physiol.* **76**: 483-489

- **Friedman, AL. and Alberte, RS.** (1986) Biogenesis and light regulation of the major light harvesting chlorophyll-protein of diatoms. *PlantPhysiol.* **80**: 43-51

- **Gallagher, J.C., Wood, AM., Alberte, RS.** (1984) Ecotypic differentiation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Marine Biology* **82**: 121-134

- **Gagne, G. and Guertin, M.** (1992) The early genetic response to light in the green alga *Chlamydomonas eugametos* grown under light/dark cycles involves genes that represent direct responses to light and photosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **18**: 429-445
- **Green, BR., Pichersky, E., Kloppstech, K.** (1991) Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family. *Trends Biochem Sci* **16**: 181-186
- **Green, BR., Durnford, DG.** (1996) The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of oxygenic Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 685-714
- **Grevby, C., Sundqvist, C.** (1992) Characterization of light-harvesting complex in *Ochromonas danica* (Chrysophyceae). *Journal of Plant Physiology* **140**: 414-420
- **Grossman, AR., Manodori, A., and Snyder, D.** (1990) Light-harvesting proteins of diatoms: Their relationship to the Chlorophyll *a/b*-binding proteins of higher plants and their mode of transport into chloroplast. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 91 -100
- **Grossman AR, Bhaya D, Apt KE, Kehoe DM** (1995) Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control, and evolution. *Annual Rev Genetics* **29**: 231-288
- **Guilano, G., Hoffmann, NE., Ko K., Scolnik, PA., Cashmore, AR.** (1988) A light-entrained circadian clock controls transcription of several plant genes. *EMBO J* **7**: 3635-3642
- **Gugliemelli, LA.** (1984) Isolation and Characterization of Pigment-Protein Particles from the Light-Harvesting Complex of *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochim Biophys Acta* **766**: 45-50
- **Häder, DP.** (1999) Einführung in die Photosynthese. In: „Photosynthese“ (Häder DP ed.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, XIII

- **Hahn, D. and Kuck, U.** (1999) Identification of DNA sequences controlling light- and chloroplast-dependent expression of the *Ihcbl* gene from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* **34**: 459-466

- **Harmer SL, Hogenesch JB, Straume H, Chang HS, Han B, Zhu T, Wong X, Kreps JA, Kay SA** (2002) Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by circadian clock. *Science* **290**: 2110-2113

- **Hiller, RG., Anderson, JM., Larkum, AWD.** (1991) The chlorophyll-protein complexes of algae. *Ref.* **150a**, pp.529-547

- **Hiller, RG., Wrench, PM., Gooley, AP., Shoebridge, G., Breton, J.** (1993) The major intrinsic light-harvesting protein of *Amphidinium*: characterization and relation to other light-harvesting proteins. *Photochem. Photobiol.* **57**: 125-131

- **Hoffrogge R, Mikschofsky H, Piechulla B** (2003) Surface plasmon resonance spectroscopy (SPR) interaction studies of the circadian-controlled tomato LHCa4*1 (CAB11) protein with its promotor. *Chronobiology International* **20**(4): 543-558

- **Holzwarth, AR.** (1999) Die primären Prozesse der Photosynthese. In: „Photosynthese“ (Häder DP ed.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, Kapitel 1: 1-20

- **Houlne G, Schanz R** (1993) Expression of polyproteins in *Euglena*. *Crit Rev Plant Sci* **12**: 1-17

- **Horton, P., Ruban, A.V., Walters, R.G.** (1996) Regulation of light-harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 655-684

- **Huang, T-C, Chow, T-J** (1986) New type of N₂-fixing unicellular cyanobacterium. *FEMS Microbiol Lett* **36**: 109-110

- **Huang, T-C, Chow, T-J, Hwang, I.S.** (1988) The cyclic synthesis of the nitrogenase of *Synechococcus* RF1 and its control at the transcriptional level. *FEMS Microbiol Lett* **50**: 127-130

- **Hust, M.** (1999) Molekularbiologische Untersuchungen zu Diversität von Diatomeenarten und Nachweis der Expressionsraten von Diatomeen *fcp* Genen im Wattsediment. Diplomarbeit
- **Jansson, S., Pichersky, E., Bassi, R., Green, BR., Ikeuchi, M., Melis, A., Simpson, DJ., Spangfort, M., Staehelin, LA., Thornber, JP.** (1992) A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll *a/b*-binding proteins of higher plants. *Plant Mol Biol Rep* 10: 242-253
- **Jansson, S.** (1994) The light-harvesting Chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1184**: 1–19
- **Jansson, S., Stefánsson, H., Nyström, U., Gustafsson, P., Albertsson, P-A** (1997) Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochim Acta* **1320**: 297-309
- **Jeffrey, S.W.** and Humphrey, G.F. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higherplants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **167**: 191-194
- **Katoh, T., Ehara, T.** (1990) Supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes isolated from the brown alga *Petalonia fascia*: Electron microscopic studies. *Plant Cell Physiol* **31**: 439-448
- **Katoh, T., Mimuro, M., Takaichi S.** (1989) Light-harvesting particles isolated from a brown alga *Dictyota dichotoma*: A supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes. *Biochem Biophys Acta* **976**: 233-240
- **Kellmann, J.-W., Merforth, N., Wiese, M., Pichersky, E., and Piechulla, B.** (1993) Concerted circadian oscillations in transcript levels of nineteen *Lha/b (cab)* genes in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Mol. Gen. Genet.* **237**: 439-448
- **Keegstra, K.** (1989) Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell* **56**: 253-266

- **Kindle KL.** (1986) Expression of a gene for light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein in *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of light and acetate. *Plant Mol Biol* **9**: 547-563
- **Kloppstech, K.** (1985) Diurnal and circadian rhythmicity in the expression of light-induced plant nuclear messenger RNAs. *Planta* **165**: 502-506
- **Kloppstech, K., Montané, M.H., Dreyer, S., Triantaphylidès, C.** (1997) Early light-inducible proteins during long-term acclimation of barley to photooxidative stress caused by light and cold: high level of accumulation by posttranscriptional regulation. *Planta* **202**: 293-302
- **Knippers, R.**, (1995) *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- **Kondo, T., Strayer, CA. Kulkarni, RD., Taylor W., Ishiura, M., Golden, SS., Johnson, CH.** (1993) Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5672-5676
- **Kühlbrandt, WK., Wang, DN.** (1991) Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. *Nature* **350**: 130-134
- **Kühlbrandt, WK., Wang, DN., Fujiyoshi, Y.**, (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**: 614-621
- **Künne, A., Pistorius, E., Kloppstech, K., and deGroot, E.** (1998) Circadian synthesis of light-harvesting-chlorophyll-proteins in *Euglena gracialis* is under translational control. *Z. Naturforsch.* **53 c**: 1017-1026
- **Kuno, N., Muramatsu, T., Hamzato, 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.* 2000 Jan **122**: 15-24

- **La Roche SD., Leisinger T.** (1991) Identification of *dcmR*, the regulatory gene governing expression of dichloromethane dehalogenase in *Methylobacterium sp.* strain DM4. J Bacteriol. 1991 November; **173** (21): 6714–6721
- **La Roche, J., Henry, D., Wyman, K., Sukenik, A., and Falkowski, P.** (1994) Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding a major fucoxanthin-, Chlorophyll a/c-containing protein from the chrysophyte *Isochrysis galbana*: implications for evolution of the *cab* gene family. Plant Mol. Biol. **25**, 355 – 368
- **Lavaud, J., Rousseau, B., van Gorkom, H., Etienne, AL.** (2002) Influence of the Diadinoxanthin Pool Size on Photoprotection in the Marine Planktonic Diatom *Phaedactylum tricornutum*. Plant Physiol. **129**: 1398-1406
- **Lavaud, J., Rousseau, B., Etienne, AL.** (2003) Enrichment of the Light-Harvesting Complex in Diadinoxanthin and Implications for the Nonphotochemical Fluorescence Quenching in Diatoms. Biochemistry **42**, 5802-5808
- **Leblanc, C., Faiciatore, A., Watanabe, M., and Bowler, C.** (1999) Semi-quantitative RT-PCR analysis of photoregulated gene expression in marine diatoms. Plant Mol. Biol. **40**: 1031 -1044
- **ten Lohuis MR., Miller, DJ.** (1998) Light-regulated transcription of genes encoding peridinin chlorophyll a proteins and the major intrinsic light-harvesting complex proteins in the dinoflagellate *Amphidinium carterae hultbert* (Dinophyceae). Plant Physiol. (1998) **117**: 189-196
- **Link, G.** (1999) Molekulargenetik des Photosyntheseapparates. In: „Photosynthese“ (Häder DP ed.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, Kapitel 13: 216-229
- **Manzara, T. Carrasco, P., Gruissem, W.** (1991) Developmental and organ-specific changes in promoter DNA-protein interaction in the tomato *rbc S* gene family. Plant Cell **3**: 1305-1316

- **Melis, A.** (1984) Light regulation of photosynthetic membrane structure, organization, and function. *J Cell Biochem* **24**(3): 271-285

- **Meyer, T., Hust, M., Marquardt, J., Krumbein, WE., Rhiel, E.** (2003) A methodological approach to investigate steady state fucoxanthin chlorophyll *a/c* binding protein mRNA levels in Wadden Sea sediments. *Int Microbiol. Mar*; **6**(1):33-39. Epub 2003 Feb 07

- **Mimuro, M., Katoh, T., Kawai, H.** (1990) Spatial arrangement of pigments and their interaction in the fucoxanthin-chlorophyll *a/c* protein assembly (FCPA) isolated from *Dictyota dichotoma*: Analysis by means of polarized spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **1015**: 450-456

- **Mörschel E.** (1999) Architektur des Photosyntheseapparates. In: „Photosynthese“ (Häder DP ed.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, Kapitel **3**: 48-64

- **Mülhardt, C.** (2002) Der Experimentator: Molekulabiologie/Genomics, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin

- **Nagy, F., Kay, S.A., Chua, N-H.** (1988) A circadian clock regulates transcription of the wheat *Cab-1* gene. *Genes Dev.* **2**: 376-382

- **Nultsch, E.** (1986) Allgemeine Botanik. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

- **Owens, TG.** (1986) Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol.* **80**: 732-738

- **Owens, TG., Wold, E.R.** (1986) Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* II – Distribution of excitation energy between the two photosystems. *Plant Physiol.* **80**: 732-738

- **Passaquet, C., Thomas, JC., Caron, L., Hauswirth, N., Puel, F., Berkaloff, C.** (1991) Light harvesting complexes of brown algae: biochemical characterization and immunological relationships. *FEBS Letters* **280**: 21-26

- **Passaquet C., Lichtlé C.** (1995) Molecular study of a light-harvesting apoprotein of *Giraudyopsis stellifer* (Chrysophyceae). *Plant Mol Biol* **29**: 135-148
- **Peyriere, M., Caron, L., Jupin, H.** (1984) Pigment complexes and energy transfer in brown algae. *Photosynthetica* **18**: 184-191
- **Piechulla, B., Gruissem, W.** (1987) Diurnal mRNA fluctuations of nuclear and plastid genes in developing tomato fruits. *EMBO J.* **6**: 3593-99
- **Piechulla, B., Riesselmann, S.** (1990) Effect of Temperature Alterations on the Diurnal Expression Pattern of the Chlorophyll *a/b* Binding Proteins in Tomato Seedlings. *Plant Physiol.* **94**: 1903-1906
- **Piechulla, B.** (1993) Circadian clock directs the expression of plant genes. *Plant Mol Biol* **22**: 533-542
- **Piechulla, B., Merforth, N., Rudolph, B.** (1998) Identification of tomato *Lhc* promoter regions necessary for circadian expression, *Plant Molecular Biology* **98**: 655-662
- **Piechulla, B.** (1999) Circadian Expression of the Light-Harvesting Complex Protein Genes in Plants, *Chronobiology International*, **16(2)**, 115-128
- **Pinkey, J., Zingmark, RG.** (1993) Photophysiological responses of intertidal benthic microalgal communities to in situ light environments: Methodological considerations, *Limnol. Oecnaogr.* (193), **38**: 1373-1383
- **Prioul, JL., Reyss, A.** (1987) Acclimation of ribulose bisphosphate carboxylase and mRNA to changing irradiance in adult tobacco leaves. *Plant Physiol* **84**: 1238-1243
- **Rhiel, E., Marquardt, J., Eppard, M., Mörschel, E., Krumbein, W.E.** (1997) The light-harvesting system of the diatom *Cyclotella cryptica*. Isolation and characterization of the main light-harvesting complex and evidence for the existence of minor pigment proteins. *Bot Acta* **110**: 109-117

- **Richter, G.** (1996) Biochemie der Pflanzen. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- **Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T.** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- **Savard F, Richard C, Guertin M** (1996) The *Chlamydomonas reinhardtii* LI818 gene represents a distant relative of the *cabi/II* genes that is regulated during the cell cycle and in response to illumination. Plant Mol Biol **32**: 461-473
- **Schindler, U., Cashmore, AR.** (1990) Photoregulated gene expression may involve ubiquitous DNA binding proteins. EMBO J **9**: 3415-3427
- **Scheer, H.** (1999) Pigmente und Antennenkomplexe. In: Photosynthese (Häder DP ed.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, Kapitel 4: 65-88
- **Schlösser, U. G.** (1994) SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen. Catalogue of strains. Bot. Acta **107**,113 -186
- **Schmidt, GW., Mishkind** (1986) The transport of proteins into chloroplasts. Annu Rev Biochem **55**: 879-912
- **Sheen, J.** (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. Plant Cell **2**: 1027-1038
- **Sherman, L.A., Meunier, P., Milagros, S.C-L.** (1998) Diurnal rhythms in metabolism: A day in the life of a unicellular diazotrophic cyanobacterium. Photosynthesis Research **58**: 25-42
- **Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A.** (1998) Strasburger Lehrbuch der Botanik, 34. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg, Berlin
- **Stryer, L.** (1995) Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford

- **Svensson AS, Rasmusson AG.** (2001) Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves. *Plant J.* **28(1)**:73-82

- **Sweeney, BM** (1987) *Rhythmic Phenomena in Plants*. Academic Press, San Diego

- **ten Lohuis MR., Miller DJ.** (1998) Light-regulated transcription of genes encoding peridinin chlorophyll *a* proteins and the major intrinsic light-harvesting complex proteins in the dinoflagellate *amphidinium carterae hultburt* (Dinophyceae). Changes in cytosine methylation accompany photoadaptation. *Plant Physiol* **117(1)**: 189-196

- **Teramoto, H., Nakamori, A., Minagawa, J., Ono, TA.** (2002) Light-intensity-dependant expression of Lhc gene family encoding light-harvesting chlorophyll a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **130(1)**: 325-333

- **Terzaghi, WB., Cashmore, AR.** (1995) Light-regulated transcription. *Annu Rev Plant Mol Biol* **46**: 445-474

- **Ting, CS., Owens, TG.** (1993) Photochemical and Nonphotochemical Fluorescence Quenching Processes in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.* 101: 1323-1330

- **Ting, CS., Owens, TG.** (1994) The effects of Excess Irradiance on Photosynthesis in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.* 106: 763-770

- **Van den Hoek, C., Jahns, HM., Mann, DG.** (1993) *Algen*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

- **Wallen, DG., Geen, GH.** (1971a) Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. *Mar. Biol.* **10**, 34-43

- **Wallen, DG., Geen, GH.** (1971b) Light quality and concentration of proteins, RNA, DNA and photosynthetic pigments in two species of marine plankton algae. *Mar. Biol.* 10, 44-51

- **Werner, D.** (1969) Silicoborate als erste nicht C-haltige Wachstumsfaktoren. Arch. Mikrobiol. 65, 258-274
- **Werner, D** (1977) The Biology of Diatoms, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne
- **Wilhelm, C.** (1999) Photosynthese der Algen. In: „Photosynthese“ (Häder DP ed.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, Kapitel 14: 230-243
- **Williams, ME., Foster, R., Chua, NH.** (1992) Sequences flanking the hexameric G-box core ,ACGTTG‘ affect the specificity of protein binding. Plant Cell 4: 485-496
- **Wu, MW., Xian, LJ., Li, XM., Pasquale, I., Francis, L.** (2004) Circadian Expression of Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Thymidylate Synthase, c-myc and p53 mRNA in Mouse Liver Tissue. Ai Zheng Mar; 23(3):235-42

Chemikalienverzeichnis

- Agarose, Serva
- Bromphenolblau, Serva
- Caesiumchlorid, Sigma
- Chloroform, Merck
- Diethylpyrocarbonat, Sigma
- DIG Luminescent Detection Kit, Boehringer Mannheim
- DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung, Boehringer Mannheim
- DIG Wash and Block Buffer Set, Boehringer Mannheim
- EDTA, Roth
- Eisensulfat, Merck
- Ethanol, Scharlau
- Ethidiumbromid, Serva
- Formaldehyd (36,5%), Riedel de Hën
- Formamid, Bio-Rad
- Glycerin, Serva
- Guanidiniumthiocyanat, Appli Chem
- Isobutanol, Chemikalienlager
- Kalciumdichlorid, Merck
- di-Kaliumhydrogenphosphat, Merck
- Kaliumbromid, Merck
- Kaliumnitrat, Merck
- Magnesiumsulfat, Merck
- β -Mercaptoethanol, Hanssen Chimica
- Natriumacetat, Merck
- Natriumchlorid, Merck
- Natriumcitrat, Merck
- PCR DIG Probe Synthesis Kit, Boehringer Mannheim
- Salzsäure, Fluka & Merck
- Schwefelsäure (95-97%), Merck
- Sodium Lauryl Sarcosinat
- Stickstoff, flüssig (Chemikalienlager)
- Tris, Sigma
- Vitaminlösung ((Thiamin (B1), Biotin (H), Cobalamin (B12) 50 mg/l))
- Wasserstoffperoxid, Scharlau Chemie S.A.
- Xylencyanol

Spurenelementlösung

- SE I: $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (1×10^{-5} mol/l)
- H_3bBO_3 ($2\text{-}3 \times 10^{-3}$ mol/l)
- $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (1×10^{-3} mol/l)
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_4\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (1×10^{-5} mol/l)
- $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (1×10^{-3} mol/l)
- SE II: AlCl_3 (1×10^{-4})
- $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (1×10^{-4})
- $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (1×10^{-4})
- Kbr (1×10^{-4})
- KJ (1×10^{-4})
- RbCl (1×10^{-4})
- $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ (1×10^{-4})

Lösungen für Hybridisierungsexperimente:

Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure
 0,15 M NaCl
 pH 7,5 (+20°C)

Waschpufferlösung/Washing Buffer:

0,3% Tween werden
 dem Maleinsäurepuffer
 hinzugefügt

Geräteverzeichnis

- J2-21 Centrifuge, Beckman
- Ja-14, Beckman
- L8-M Ultracentrifuge, Beckman
- Li-Cor Model LI-185B Quantum/Radiometer/Photometer, Licor
- LI-192SB Underwater Quantum Sensor, Licor
- Minifold I Dot-Blot System, Schleicher & Schuell
- TURBOBLOTTER Rapid Downward Transfer Systems, Schleicher & Schuell
- Model 200/2.0 Power Supply, Bio-Rad
- Model TJ-6 Centrifuge, Beckman
- REX Leuchtplatte Gr. 1E, REX, Meßinstrumentenbau
- RH-3 Illuminationskammer, Herolab
- Rollertubes, Biometra
- Biometra Compact Line OV4
- SW-40, Beckman
- Ti 70.1, Beckman
- U-3000 Spectrophotometer, Hitachi
- F-4500 Fluoreszenzphotometer, Hitachi
- Type 429h Easy CCD Camera, Herolab
- UVT-20M Illuminator
- Pumpe, Isamtec IPC
- Om-E Hybaid
- Feather Volt, Stratagene, USA
- Röntgenfilm Lumi Film Chemiluminescent Detection Film (18 x 24), Boehringer Mannheim
- PALL Membran, Pall Gelman Laboratory, USA

Danksagung

Zu allererst gilt mein Dank Herrn Dr. Erhard Rhiel für seine intensive Betreuung und der tatkräftigen Förderung der Arbeit.

Dem ehemaligen Leiter der Arbeitsgruppe Geomikrobiologie; Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Krumbein, möchte ich für die Bereitstellung und Nutzung der Labore und aller nötigen Arbeitsmittel danken.

Für die freundliche Unterstützung bei Fragen und Problemen aller Art gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe Geomikrobiologie.

Für die Nutzung der Klimakammern und Bereitstellung von Arbeitsplätzen und technischer Ausrüstung danke ich Herrn Prof. Vareschi und seiner Arbeitsgruppe.

Besonders möchte ich Michael Pilzen für seine Hilfe bei der Aufzucht der Versuchskulturen und Erklärungen bei der Nutzung der verschiedenen Geräte danken.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter und meinem Vater, die mich immer unterstützt und mich bei meiner Entwicklung geleitet haben. Auch meiner Schwester gilt mein Dank dafür, daß sie mich in meinen Entscheidungen bestärkt hat.

Erklärung nach § 9, Absatz 2

Hiermit erkläre ich, daß ich die Arbeit selbstständig verfaßt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Oldenburg im Juni 2004

Wissenschaftlicher Werdegang

Studium

Im Sommersemester 2000 habe ich an der Carl von Ossietzky Universität den Studiengang Biologie belegt und mein Vordiplom in den Prüfungsfächern Zoologie, Botanik, Mikrobiologie, Chemie und Physik mit der Gesamtnote „gut“ bestanden. Mein Interesse konzentrierte sich im Hauptstudium auf das Hauptfach Mikrobiologie und die Nebenfächer Biochemie, Botanik und Kunst. Mein Diplom habe ich mit der Gesamtnote „gut“ abgeschlossen.

Diplomarbeit

Die Diplomarbeit wurde im Hauptfach Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe Geomikrobiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Krumbein und Dr. Rhiel angefertigt. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (DNA-Isolation, PCR und Agarosegelelektrophorese) wurden die Einflüsse des Lichtklimas auf die Expression des *fcp2* Gens der Diatomee *Cyclotella*, welche in Reinkulturen angezogen wurde, näher charakterisiert.

Während meiner Diplomarbeit erarbeitete ich mir darüberhinaus umfangreiche Computerkenntnisse.

Promotion

Mein Interesse an der Molekularbiologie, Biochemie, Genetik und deren Methoden führte unmittelbar nach Abschluß der Diplomarbeit zur wissenschaftlichen Mitarbeit im Rahmen des von der DFG finanzierten Projektes „Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen an den Fucoxanthin/Chlorophyll *a/c* bindenden Proteinen (Fcps) der zentralen Diatomee *Cyclotella cryptica*“. Das Projekt wird in der Arbeitsgruppe Geomikrobiologie von Dr. Rhiel geleitet. In dieser Arbeit konnte mit der Spektroskopie, Hybridisierung mit genspezifischen Sonden eine genaue Charakterisierung von 4 verschiedenen Fucoxanthin/Chlorophyll *a/c* bindenden Proteinen einen deutlichen Einfluß des Lichtes auf die Expression der untersuchten *fcp* Gene bei Kieselalgen bewiesen werden. Meine Kenntnisse über biochemische und molekularbiologische Methoden wie Northern-Blot Techniken, RNA-, DNA- und Plasmid-Isolation, DNA-Hybridisierung, Erstellen einer cDNA-Genbank und

verschiedene Methoden der Gelelektrophorese konnten erfolgreich erweitert und vertieft werden. Die Ergebnisse konnten in insgesamt 2 Publikationen veröffentlicht werden. Desweiteren habe ich als Aussteller und Vortragsredner an verschiedenen internationalen Tagungen der Botanik und Phykologie teilgenommen.

Lehre

Neben meiner Forschungstätigkeit nahm ich auch Aufgaben im Bereich der Lehre wahr. Hierzu zählten die Betreuung von Praktika, Diplomanden in molekularbiologischen und biochemischen Methoden und Analysetechniken (Computer).

Lebenslauf



Zur Person

Andreas Oeltjen
Heideweg 23 c
26127 Oldenburg
geboren am 09.04.1973
in Oldenburg (Nds.)
ledig

Beruflicher Hintergrund

06/2000 – 06/2003

wissenschaftlicher Mitarbeiter der AG Geomikrobiologie,
Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg. Promotion bei
Prof. Dr. Wolfgang E. Krumbein
Thema: Untersuchungen zur Expression der Gene, die für die
Fucoxanthin Chlorophyll *a/c* bindenden lichtsammelnden
Polypeptide der centriscen Diatomee *Cyclotella cryptica*
codieren

Besondere Kenntnisse

Englisch: Fließend sprechen und lesen, ausreichend für wissenschaftliche
Diskussionen.
Französisch: Sprechen und lesen, ausreichend für einfache Briefe
EDV: Microsoft Office, insbesondere Word, Excel und Powerpoint
Staroffice
Systat (Programm zur Erstellung statistischer Übersichten)
Sigma Plot (Programm zur Verarbeitung von Daten, ähnlich Excel)
Internetsuche
Photoshop (Programm zur Bildbearbeitung)
Laborkenntnisse: Mikrobiologisches Arbeiten , DNA-/RNA-Extraktion und Sequenzierung, PCR,
Gelelektrophorese, Kulturanzuchten, Medienherstellung, steriles Arbeiten
Grundkenntnisse im Gerätetauchen (SCUBA)

Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

Weiterbildung

Sommer 1995	„Einführung in Software-Anwendungen für Biologen“, Carl-von-Ossietsky Universität, Oldenburg (Nds.)
August/September 1998	Workshop Aquatische Ökologie an der Interuniversity of Eilat, Israel Forschung über Riffpopulation und Schadstoffanalysen
März 1999	Tagung der Sektion Physiologie der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bad Münster am Stein
1999	Kurs im Maschinenschreiben an der VHS Oldenburg (Nds.)
September 2000	Botanikertagung Jena 2000 (Aussteller)
Februar 2001	8. Wissenschaftliche Tagung der Sektion Phykologie in der Deutschen Botanischen Gesellschaft (Vortragsredner)
September 2002	Botanikertagung Freiburg 2002 (Aussteller)

Schulische und berufliche Ausbildung

Okt. 1993 – Mai 2000	Studiengang Diplom Biologe an der Carl-von-Ossietsky Universität, Oldenburg (Nds.) Diplomthema: „Untersuchungen zur Expression der <i>fcp2</i> Genfamilie von <i>Cyclotella cryptica</i> “
Aug. 1979 – Juni 1983	Grundschule Ofenerdiek (Stadt Oldenburg/ Nds.)
Aug. 1983 – Juni 1985	Orientierungsstufe Ofenerdiek (Stadt Oldenburg/ Nds.)
Aug. 1985 – Juni 1992	Herbartgymnasium (Stadt Oldenburg/Nds.)

Grundwehrdienst:

Oktober 1992 – Oktober 1993	Grundausbildung in Kreyenbrück, Oldenburg (Nds.) Grundwehrdienst in Kreyenbrück, Oldenburg (Nds.) Ausbildung zum Funker
-----------------------------	---

Eigene Veröffentlichungen

Oeltjen, A., Krumbein, W.E., Rhiel, E.: Investigations on transcript sizes, steady state mRNA concentrations and diurnal expression of genes encoding fucoxanthin chlorophyll *a/c* light harvesting polypeptides in the centric diatom *Cyclotella cryptica*. *Plant Biology*, 4(2), 250-257 (2002)

Oeltjen A, Marquardt J, Rhiel E.: Differential circadian expression of genes *fcp2* and *fcp6* in *Cyclotella cryptica*. *Int Microbiol.* 2004 Jun;7(2):127-31

Hobbys

Zeichnen, Lesen, Kochen, Karate