

**Phytochrome in Gymnospermen:
Genfamilien, Evolution und Expression in
Pinus sylvestris L.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Marion Schmidt
aus Berlin

Köln 2000

Berichtersteller:

Prof. Dr. Hj.A.W. Schneider-Poetsch
Prof. Dr. U.-I. Flügge

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Juli 2000

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Photorezeptoren in Pflanzen	1
1.2 Phytochrome agieren als molekulare Lichtschalter	1
1.3 Die Phytochromgenfamilie	3
1.4 Strukturelle Eigenschaften von Phytochromen	5
1.5 Mögliche Wege der Signalübertragung	8
1.6 Molekulare Phylogenie	10
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Pflanzen	13
2.1.2 <i>E. coli</i> -Stämme	14
2.1.3 Vektoren	15
2.1.4 cDNA-Banken	15
2.1.5 Chemikalien	15
2.1.6 Geräte	17
2.1.7 Kultur-Medien und Lösungen	17
2.1.8 Standardisierte Zusammenstellungen von Reagenzien (Kits)	19
2.1.9 Enzyme	19
2.1.10 Synthetische Oligonukleotide	20
2.1.11 Antikörper	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	21
2.2.1.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.2.1.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.2.1.3 Expression heterologer Proteine in <i>E. coli</i>	22
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	22
2.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren	23
2.2.2.2 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten	24
2.2.2.3 Herstellung von DNA-Sonden	25
2.2.2.4 DNA-Transfer auf Nylonmembranen und Hybridisierung (Southern Hybridisierung)	26
2.2.2.5 Durchsuchen einer cDNA-Bank von <i>Pinus</i>	28
2.2.2.6 Kolonietransfer auf Nylonmembran und Hybridisierung	28

2.2.2.7	Spaltung von Gesamt-DNA aus Pflanzen mit Restriktionsendonukleasen	29
2.2.2.8	Nukleinsäure-Sequenzierungen	30
2.2.3	Biochemische Methoden	30
2.2.3.1	Extraktion von Anthocyanen	30
2.2.3.2	Extraktion von Chlorophyll <i>a</i> und <i>b</i>	31
2.2.3.3	Herstellung von Proteinrohextrakten	31
2.2.3.4	Phenolische Extraktion von Gesamtprotein aus Pflanzen	32
2.2.3.5	Phenolische Extraktion von Gesamtprotein aus <i>E. coli</i>	32
2.2.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.2.3.7	SDS-PAGE von Proteinen nach Laemmli (1970)	33
2.2.3.8	Färbung von Proteinen durch Coomassie Brilliant Blue	34
2.2.3.9	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Blot)	35
2.2.3.10	Färbung von Proteinen durch Ponceau S	35
2.2.3.11	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen	36
2.2.3.12	Anreicherung der heterolog hergestellten Proteine	36
2.2.3.13	Herstellung von polyklonalen Antiseren	37
2.2.3.14	Affinitätsreinigung von Antikörpern	37
2.2.4	Phylogenetische Analysen	38
2.2.4.1	Datenerfassung und Erstellung des Alignments	38
2.2.4.2	Phylogenetische Sequenzanalysen von Phytochromgenen	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Lichtabhängige Reaktionen in <i>Pinus sylvestris</i>	41
3.1.1	Phänotypische und biochemische Charakterisierung	41
3.1.2	Anthocyan- und Chlorophyllgehalte	43
3.1.3	Lichtabhängige Regulation von RBCL, LHCII, CHS, ALAD und β -Amylase in <i>Pinus</i> -Keimlingen auf Proteinebene	44
3.2	Phytochrome in <i>Pinus</i>	45
3.2.1	PCR-Amplifikationen von Phytochromgenfragmenten aus genomischer DNA am Beispiel von <i>Pinus</i>	45
3.2.2	Isolierung von <i>phyN</i> aus einer cDNA-Bank von <i>Pinus</i>	48
3.2.3	Lichtabhängige Regulation von Phytochrom in <i>Pinus</i>	50
3.2.4	Kreuzreaktionen von Z-3B1 mit heterolog exprimierten Phytochromfragmenten aus <i>Pinus</i> und <i>Picea</i>	52
3.2.5	Untersuchung der Antiseren pkAK-N und pkAK-P	54
3.2.6	Expression von PHYN und PHYP in <i>Pinus</i>	55
3.3	Molekulare Phylogenie anhand von Phytochromgenen	57
3.3.1	Molekulare Phylogenie der Phytochromgenfamilie Niederer und Höherer Pflanzen	58
3.3.2	Vergleich phylogenetischer Stammbäume auf der Basis von PHY-Aminosäuresequenzen bzw. <i>phy</i> -Nukleotidsequenzen: Position des <i>phyN</i> -Gens von <i>Pinus</i>	61

3.3.3	Vergleich phylogenetischer Stammbäume auf der Basis partialen <i>phy</i> -Sequenzen (2906 bzw. 570 Charaktere)	65
3.3.4	Molekulare Phylogenie der Gymnospermae anhand von partialen Phytochromgenen: <i>phyO</i> , <i>phyN</i> und <i>phyP</i>	67
3.3.4.1	Molekulare Phylogenie der Gymnospermae anhand von partialen <i>phyO</i> -Sequenzen	70
3.3.4.2	Molekulare Phylogenie der Gymnospermae anhand von partialen <i>phyN</i> -Sequenzen	72
3.3.4.3	Molekulare Phylogenie der Gymnospermae anhand von partialen <i>phyP</i> -Sequenzen	75
3.3.5	Molekulare Phylogenie der Gymnospermae anhand kombinierter Datensätze	77
3.3.5.1	<i>phyN+phyO+phyP</i>	77
3.3.5.2	<i>phyN+phyO+phyP+18S rRNA</i>	80
3.3.5.3	Zusammenfassende Darstellung der molekularen Phylogenie der Gymnospermae anhand von <i>phyN</i> , <i>phyO</i> und <i>phyP</i> sowie kombinierter Datensätze	82
3.3.6	Molekulare Phylogenie der Niederen Pflanzen anhand von partialen Phytochromgenen	84
4	Diskussion	89
4.1	ALAD, -Amylase, CHS, LHCII und RBCL werden in <i>Pinus</i> Keimlingen lichtunabhängig exprimiert	89
4.2	<i>Pinus</i> besitzt mindestens drei Phytochromgenlinien <i>phyN</i> , <i>phyO</i> und <i>phyP</i> sowie Pseudogene	91
4.3	Lichtabhängige Expression von Phytochrom in <i>Pinus</i>	93
4.4	Die Evolutionsraten von Phytochromgenen variieren zwischen Organismengruppen	95
4.5	Die Evolutionsraten von Phytochromgenen variieren zwischen den Genlinien A und B	96
4.6	Die molekulare Phylogenie anhand von Phytochromgenen entspricht der Landpflanzenevolution	98
4.7	Die molekulare Phylogenie der Gymnospermae anhand von Phytochromgenfragmenten stimmt nicht mit der klassischen Phylogenie überein aber mit anderen molekularen Daten	99
4.8	Die Phylogenie von Phytochromen unterstützt die Monophylie der Gymnospermen (inklusive Gnetales)	102
4.9	Niedere Pflanzen besitzen bis zu drei orthologe Phytochromgene und mehrere paraloge	104
5	Zusammenfassung	107
6	Literaturverzeichnis	109

7	Anhang	125
7.1	Genbank-Eintrag des partialen Phytochromgens <i>phyN</i> aus <i>Pinus sylvestris</i>	125
7.2	Genbank-Einträge der Phytochromgenfragmente	127
7.3	Funktionsspezifische Motive in <i>phyN</i> , <i>phyO</i> und <i>phyP</i> : Vergleiche mit <i>phyA</i> , <i>phyB</i> und <i>phyC</i> von Angiospermen	129

Abkürzungsverzeichnis

^{max}	Absorptionsmaximum
A	Adenin
AL	Allel
ALAD	-Aminolävulinsäure-Dehydratase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
<i>atpB1</i>	plastidäres Gen, das für die β -Untereinheit der ATP-Synthase kodiert
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovins Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	(von mRNA) kopierte DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHS	Apoprotein der Chalkonsynthase
<i>cox3</i>	mitochondriales Gen, das für die Untereinheit 3 der mitochondrialen Cytochrom-Oxidase kodiert
cpITS	Interner transkribierter Spacer der plastidären ribosomalen Operons
CPRF	promotorbindender Transkriptionsfaktor (<u>common</u> <u>promotor</u> -binding transcription factor)
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
ddNTP	2'-Dideoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DR	Dunkelrotlicht
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FG	Frischgewicht
G	Guanin
GFP	grün-floureszierendes Protein
h	Stunde
HKD	Proteindomäne mit Ähnlichkeit zu bakteriellen Histidin-Kinasen
IgG	Immunglobuline
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
J.	Jahr
kb	kilo Basenpaare
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertoni
LHCII	Chlorophyll <i>a/b</i> -bindende Proteine des Lichtsammelkomplexes von Photosystem II
<i>lhciI</i>	Genfamilie, deren Mitglieder für die plastidären, chlorophyll <i>a/b</i> -bindenden Apoproteine des Lichtsammelkomplexes von Photosystem II kodieren
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
mkAK	monoklonaler Antikörper

mRNA	messenger RNA
NBT	Nitro Blau Tetrazoliumchlorid
NDPK	Nukleosiddiphosphat-Kinase
NLS	Nukleuslokalisierungssequenz
nm	nano Meter
OD	optische Dichte
OTU	<u>o</u> perational <u>t</u> axonomic <u>u</u> nit
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAS-Domäne	Proteindomäne, die in regulatorischen Proteinen gefunden wird und Proteininteraktionen vermittelt (benannt nach den drei Proteinen: <u>P</u> ER, <u>A</u> RNT und <u>S</u> IM)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
P _{DR}	Dunkelrotlicht absorbierende Form von Phytochrom
PEST	konserviertes Motiv in kurzlebigen Proteinen
PG	Pseudogen
PHYA-E	Phytochromapoprotein A-E
<i>phyA-E</i>	Wildtypphytochromgene A-E
PIF	mit Phytochrom interagierender Faktor
pkAK	polyklonaler Antikörper
PKS1	Phytochrom Kinase Substrat 1
P _R	Rotlicht absorbierende Form von Phytochrom
<i>psbA</i>	plastidäres Gen, das für das D1-Protein des Photosystems II kodiert
R	Rotlicht
RACE	schnelle Amplifikation von cDNA-Enden
RBCL	Apoprotein der großen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
<i>rbcL</i>	plastidäres Gen, das für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase kodiert
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>rpoC1</i>	plastidäres Gen, das für die b'-Untereinheit der plastidären DNA-abhängigen RNA-Polymerase kodiert
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trimethylhydroxyaminomethan
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
x g	Gravitationskonstante (980 cm/s)
x-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- -D-Galaktosid

1 Einleitung

1.1 Photorezeptoren in Pflanzen

Pflanzen nutzen Licht in zweifacher Hinsicht: (1) in der Photosynthese zum Aufbau von organischer Substanz aus CO₂ und H₂O und (2) als Signal, das ihnen dazu dient Photosynthese, Morphologie und Physiologie den jeweiligen Lichtbedingungen optimal anzupassen. Lichtintensität, -qualität, -richtung, -periodizität und -dauer werden von Pflanzen registriert. Immer wieder aufgenommene Aktionsspektren für Anpassungsphänomene von Pflanzen zeigten drei wirksame Spektralbereiche.

UV-B-Licht wird durch einen Photorezeptor wahrgenommen, dessen molekulare Struktur bislang nicht bekannt ist (Wellmann 1983, Jenkins *et al.* 1995). UV-A- und Blaulicht werden durch Cryptochrome und Phototropin perzipiert (Ahmand und Cashmoore 1993, Christie *et al.* 1998, Lin *et al.* 1998). Cryptochrome und Phototropin sind Chromoproteine mit Flavin als chromophore Gruppe. Cryptochrome spielen eine wichtige Rolle im Verlauf der Keimlingsentwicklung und der Blütenbildung, während Phototropin das gerichtete Wachstum von Pflanzenorganen in Abhängigkeit von einer Lichtquelle bewirkt (Phototropismus). Rotes und dunkelrotes Licht wird durch das phytochrome Pigment absorbiert.

Das Zusammenspiel dieser Rezeptoren ermöglicht die Anpassung von Pflanzen an jahreszeitliche und circadiane Rhythmen, die Steuerung der Samen- bzw. Sporenkeimung, der Chloroplastenentwicklung und Pigmentierung, des Sproßwachstums, der Blüteninduktion, von Seneszenz, Tropismen und Stomatabewegungen. Alle lichtregulierten Prozesse, die die Entwicklung und Differenzierung einer Pflanze unabhängig von der Photosynthese steuern, werden unter dem Begriff Photomorphogenese zusammengefaßt.

1.2 Phytochrome agieren als molekulare Lichtschalter

1952 beschrieben Borthwick *et al.* erstmals einen hypothetischen Photorezeptor in Pflanzen, der offenbar als molekularer Schalter fungierte. Abhängig von der eingestrahlt Lichtqualität R (Rotlicht) oder DR (Dunkelrotlicht) verfolgten in Dunkelheit gewachsene Keimpflanzen unterschiedliche Entwicklungsprogramme. Ein R-Puls führte zu Kotyledonenentwicklung, Hypokotylstauchung und der Öffnung des Hypokotylhakens. Ein nachfolgender DR-Puls revertierte diese Entwicklung. Die Pflanzen entwickelten sich wie in Dunkelheit. Daß es sich um einen einzigen Photorezeptor und nicht zwei verschiedene Rezeptoren handelte, zeigten *in vivo* Absorptionsspektren (Butler *et al.* 1959). Bei Belichtung mit R verschwand der Absorptionsgipfel bei etwa 660 nm und ein neuer bei 730 nm entstand. Belichtung mit DR

kehrte im Gegenzug das Bild wieder um. Borthwick *et al.* (1954) benannten diesen Photorezeptor Phytochrom. Im Anschluß an die Identifizierung von Phytochrom folgten Bestandsaufnahmen vieler R/DR-reversibler morphologischer und physiologischer Umstimmungen in Pflanzen (für einen Überblick: Mohr 1972).

Das erste photochemisch aktive Phytochrom isolierten Butler *et al.* (1959) aus etiolierten Maiskeimlingen mit Hilfe von alkalischen Puffern. Nun stellte sich heraus, daß Phytochrom ein Chromoprotein ist, welches aus einem Proteinanteil sowie einer chromophoren Gruppe besteht und in einem pH-Bereich zwischen 6,5 und 7,5 durch Photoreversibilität nachweisbar ist. Die nachfolgenden Untersuchungen des Proteinanteils von Phytochrom durch SDS-PAGE führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einige Zeit vermutete man, daß in Pflanzen ein 'kleines Phytochrom' von 60 kDa Größe sowie ein 'großes Phytochrom' von etwa 114-118 kDa vorlag (für eine Zusammenfassung: Rüdiger und Thümmler 1991). In beiden Fällen handelte es sich jedoch um proteolytische Abbauprodukte des Photorezeptors, da bedingt durch die proteinchemische Aufarbeitungsmethode die pflanzeigenen Proteasen nicht ausreichend inhibiert wurden.

Die chemische Struktur der chromophoren Gruppe von Phytochrom wurde von Rüdiger und Correll (1969) mittels einer Nachweismethode für Tetrapyrrole aufgeklärt. So zeigte die Behandlung des Chromophors mit Chromsäure spezifische, für Tetrapyrrole typische Abbauprodukte. Die Kinetik des beobachteten Abbaus deutete zudem auf ein lineares Tetrapyrrol (Phytochromobilin) hin.

Erst 1983 gelang Vierstra und Quail die Anreicherung und Aufreinigung des kompletten Phytochromapoproteins aus etiolierten Haferkeimlingen. Sie isolierten ein 124 kDa großes Protein. Im Anschluß daran wurden molekulare Charakterisierungen intensiviert.

Obwohl Phänomene wie Polarotropismus und Chloroplastenbewegung bei Algen und Niederen Pflanzen auf einen membranständigen Photorezeptor hinwiesen (Mohr 1972, Kraml 1994), zeigten immunocytologische Analysen, daß Phytochrom in Höheren Pflanzen in der P_R-Form ein cytosolisches Protein ist (Pratt und Coleman 1974, Pratt 1994). Im Cytosol kommt es auch zur autokatalytischen Bindung des Chromophors, welcher in den Chloroplasten synthetisiert wird (Furuya und Song 1994). Phytochrome liegen als Homodimere in Lösung vor, für die anhand von niedrig auflösender Elektronenmikroskopie eine Y-Form gezeigt werden konnte (Jones und Erickson 1989).

1.3 Die Phytochromgenfamilie

Als man begann, Phytochrome nicht nur aus etiolierten Pflanzen zu isolieren, sondern auch aus ergrüneten Pflanzen, mehrten sich die Hinweise, daß es mehr als einen Typ von Phytochromen gab. Immunologische Untersuchungen zeigten, daß eine lichtlabile Form von Phytochrom in etiolierten Geweben Höherer Pflanzen vorliegt (Typ I) und eine lichtstabile

Form in grünen Geweben (Typ II) (Cordonnier *et al.* 1986, Pratt *et al.* 1991). Die Bestätigung dieser Annahme erfolgte 1989, als Sharrock und Quail durch genomische Southern Blot Experimente fünf Phytochromgene in *Arabidopsis* nachweisen konnten. Drei cDNA-Klone wurden isoliert und sequenziert: *phyA*, *phyB* und *phyC*. Diese drei Gene zeigten etwa 50% Identität auf Aminosäureebene. Die Sequenzen von zwei weiteren Phytochromgenen in *Arabidopsis*, *phyD* und *phyE*, wurden bald danach veröffentlicht (Clack *et al.* 1994). *phyE* zeigt ebenfalls etwa 50% Identität zu *phyA*, *phyB* und *phyC*, wohingegen *phyD* 76% Identität zu *phyB* besitzt und folglich ein Subtyp der B-Genlinie ist. Demnach konnten allein fünf verschiedene Phytochromgene im kleinsten bekannten Genom der Landpflanzen gefunden werden.

Expressionsstudien der einzelnen Mitglieder dieser Genfamilie belegten, daß *phyA* in etiolierten Geweben vorliegt (Quail *et al.* 1995) und dort 99% der gesamten Phytochrommenge ausmachen kann. Dies kann bei Monokotylen bis zu 1% des Gesamtproteins in dunkelgewachsenen Keimlingen entsprechen (Clough und Vierstra 1997). Eine Belichtung etiolierter Keimlinge mit Weißlicht führte zu einer bis zu 100-fachen Reduktion der Phytochrommenge. An dieser drastischen und schnellen Reaktion als Antwort auf eine Belichtung sind drei sich gegenseitig verstärkende Faktoren beteiligt:

(1) die Hemmung der *phyA* mRNA Transkription durch PHYA-P_{DR} (Autoregulation von PHYA), (2) die konstitutive Instabilität der *phyA* mRNA und (3) ein schneller proteolytischer Abbau des PHYA-P_{DR} Apoproteins (Clough und Vierstra 1997, Clough *et al.* 1999, Hennig *et al.* 1999).

Folglich entsprach die beobachtete Kinetik des Abbaus von *phyA* den lichtlabilen Typ I-Phytochromen. Hingegen machten *phyB-E* Transkripte nur 1-2% des gesamten Phytochroms in etiolierten Keimlingen aus, lagen aber in gleichen Mengen in grünen Geweben vor (Typ II-Phytochrome) (Quail *et al.* 1995). Nun war klar, daß in Höheren Pflanzen keine homogene Population von Genen für diesen Photorezeptor vorliegen kann sondern eine Familie von Photorezeptoren, die von mehreren und differentiell regulierten Genen kodiert wird (Quail *et al.* 1995, Clough und Vierstra 1997, Clough *et al.* 1999, Hennig *et al.* 1999).

Auch in anderen angiospermen Pflanzen wurden mehrere Phytochromgene gefunden, wobei die Größe der Genfamilie von drei Mitgliedern, z.B. in *Sorghum bicolor* (Alba *et al.* 2000), *Oryza sativa* (Tahir *et al.* 1998) und *Populus tremula* (Howe *et al.* 1998), bis fünf variiert z.B. *Lycopersicon esculentum* (Hauser *et al.* 1995) und *Arabidopsis thaliana* (Clack *et al.* 1994).

Für Gymnospermen wurden bisher aus cDNA-Banken von *Pinus sylvestris* (nachfolgend mit *Pinus* bezeichnet) und *Picea abies* (nachfolgend mit *Picea* bezeichnet) zwei Sequenzen isoliert, die für komplette Phytochrome kodieren (Kolukisaoglu 1997, Clapham *et al.* 1999). Die Identität der beiden Sequenzen beträgt auf Nukleinsäureebene 68,3 %. Phylogenetische Analysen, die Phytochromsequenzen von Angiospermen einbezogen, ergaben, daß das *phy*-Gen aus *Picea* ein Abkömmling der *phyA*-Genlinie und das aus *Pinus* ein solcher der *phyB*-Linie war. In phonetischer Anlehnung an A und B wurden diese beiden Gymnospermenphytochrome mit O und P benannt (Schneider-Poetsch *et al.* 1998). Zudem

wurden durch PCR-Analysen weitere Phytochromgenfragmente in *Picea* gefunden, die wohl Sublinien von *phyO* und *phyP* zugerechnet werden müssen (Thümmeler und Dittrich 1995, Clapham *et al.* 1999).

Auch für Algen und Niedere Pflanzen wurden Phytochrome beschrieben. *Mougeotia scalaris* besitzt ein Phytochromgen (Winands und Wagner 1996). Für *Mesotaenium caldariorum* wurden zwei Phytochromsequenzen aus einer genomischen Bank isoliert (Lagarias *et al.* 1995). Beide Sequenzen zeigen nur 13 Basenaustausche innerhalb eines 1723 bp überlappenden Bereiches. Genomische Southern Blot Analysen ließen vermuten, daß in *Mesotaenium* bis zu sechs Phytochromgene vorliegen, die sehr hohe Homologien zueinander besitzen, wie RT-PCR Analysen belegten (Wu und Lagarias 1997).

Aus cDNA-Banken der Moose *Physcomitrella patens* und *Ceratodon purpureus* konnte je ein Phytochromgen isoliert werden, dessen Struktur den bekannten Phytochromgenen aus Höheren Pflanzen entspricht (Kolukisaoglu *et al.* 1993, Schneider-Poetsch *et al.* 1994, Hughes *et al.* 1996). *Ceratodon* besitzt zudem ein weiteres Gen, das im N-terminalen Bereich hohe Ähnlichkeit zu Phytochromen zeigt, jedoch im C-Terminus von der bekannten Struktur abweicht. Dieser Bereich besitzt hohe Homologie zu Proteinkinasen (PHYCER2, Thümmeler *et al.* 1992).

Für den Farn *Anemia phyllitidis* wurden vier verschiedene Phytochromgene beschrieben (*Anemia phyB1-B4*: Maucher 1994), für *Adiantum capillus-veneris* drei (*Adiantum phy1-3*: Okamoto *et al.* 1993, für eine Zusammenfassung: Wada *et al.* 1997). *Adiantum phy1* und *phy2* zeigen Sequenzhomologien zu konventionellen Phytochromen. *Adiantum phy3* hingegen besitzt im C-terminalen Bereich des Apoproteins Homologie zu eukaryotischen Serin/Threonin-Proteinkinasen, vergleichbar mit PHYCER2 aus *Ceratodon*. Möglicherweise handelt es sich hier um einen chimären Phytochrom/Phototropin-Photorezeptor (Nozue *et al.* 1998). Rekonstitutionsexperimente mit heterolog hergestelltem *Adiantum phy3* belegten eine Bindung von Phycocyanobilin *in vitro*. Außerdem besitzt dieser eigenartige Photorezeptor eine mögliche Flavinbindungsstelle im C-terminalen Bereich. So könnte dieses Protein sowohl als Blau- als auch als Rotlichtsensor fungieren (Nozue *et al.* 1998).

Auch über die Expression der Phytochromgene Niederer Pflanzen liegen bereits Untersuchungen vor. Dunkeladaptation von *Mougeotia* führte zu einer Anreicherung von Phytochromtranskripten (Winands und Wagner 1996). Wurden dunkeladaptierte Algen mit R belichtet, sank die Transkriptmenge auf 10% des Ausgangswertes. Der Effekt konnte durch eine anschließende DR-Belichtung revertiert werden.

In *Mesotaenium* konnte eine lichtregulierte Expression von Phytochrom beobachtet werden, wobei nicht geklärt ist, ob mehrere Transkripte vorliegen und wenn ja, welches der Transkripte differentiell reguliert wird (Lagarias *et al.* 1995, Wu und Lagarias 1997).

In *Anemia* wurde eine lichtabhängige Regulation von PHYB1, PHYB3 und PHYB4 nachgewiesen (Maucher 1994). PHYB1 und PHYB4 Transkripte traten hauptsächlich während der Sporenkeimung auf, Transkripte von PHYB3 zeigten zu einem späteren

Entwicklungsstadium eine Lichtregulation, so daß ihnen eine Rolle während der Protonemaentwicklung dieses Farns zugeordnet werden könnte.

In *Picea* wurden die Transkriptmengen von *phyO* und einem weiteren möglichen Subtyp der A-Genlinie (Accession-Nr.: X38363) in licht- und dunkelgewachsenen Keimlingen durch RT-PCR-Experimente untersucht (Clapham *et al.* 1999). Für X38363 wurde eine geringe lichtabhängige Regulation festgestellt. So enthielten 10 Tage alte Keimlinge von *Picea*, die in Dunkelheit angezogen wurden, etwa die doppelte Transkriptmenge i.V. zu lichtgewachsenen Keimlingen. Dieser Effekt konnte in 7 Tage alten Keimlingen nicht festgestellt werden.

1.4 Strukturelle Eigenschaften von Phytochromen

Durch den Vergleich vieler Phytochromsequenzen aus dem Pflanzenreich konnten Domänen und einzelne Aminosäuren erkannt werden, die im Laufe der Evolution unverändert geblieben sind. Meist können konservierte Strukturen erste Hinweise auf wichtige strukturelle und funktionelle Eigenschaften dieses Bereiches liefern.

Zudem ermöglichte das Vorliegen von klonierten Phytochromgenen die Erzeugung transgener Pflanzen, die homologe oder heterologe Phytochromgene exprimierten. Damit lagen erstmals Systeme vor, um die biologische Aktivität einzelner Phytochromgene *in planta* zu studieren.

In vitro konnten Phytochrome durch gezielte Mutagenese verändert werden. Die Expressionsanalyse der mutierten Gene und die phänotypische bzw. physiologische Charakterisierung der transgenen Pflanzen ließen erste Rückschlüsse auf mögliche Funktionen des mutagenisierten Bereiches zu (Boylan und Quail 1991, Cherry *et al.* 1992, 1993, Stockhaus *et al.* 1992).

Diese Versuchsansätze trugen zur Aufklärung von physikochemisch bedeutenden Strukturen der Phytochromapoproteine bei. So ließen sich Bereiche kartieren, denen eine Funktion im Zusammenhang mit der Dimerisierung der Phytochrommonomere, der Chromophor/Apoprotein-Interaktionen, der Konformationsänderungen der P_R/P_{DR} -Formen und des P_{DR} -Abbaus nachgewiesen werden konnten.

Jedes Phytochrommonomer besteht aus etwa 1200 AS (je nach Organismus) und wird grundsätzlich in zwei funktionale Domänen unterteilt (Abb. 1.1): einen N-terminalen Bereich (1-647) und einen C-Terminus (675-1162) (s. Abb 1.1). Die Angaben der AS-Positionen im Phytochrom beziehen sich auch im Folgenden auf *Arabidopsis* PHYB.

Im N-terminalen Bereich des Apoproteins wird Phytochromobilin an ein konserviertes Cystein (C-374) kovalent über eine Thioetherbrücke gebunden. Die Absorption von Rotlicht führt zu einer Isomerisierung des Chromophors an der C15/C16-Doppelbindung (Farrens *et al.* 1989). Mutationsanalysen des Apoproteins zeigten, daß ein konserviertes Histidin (H-375) direkt neben dem chromophorbindenden Cystein nötig ist, um die physiologisch aktive P_{DR} -Form zu stabilisieren (Deforce *et al.* 1993).

Eine weitere für die Phototransformation essentielle Aminosäure ist Isoleucin 80. Die Propionsäureseitenketten dieser Aminosäure bedingen die korrekte Positionierung des Phytochromobilins sowie seine lichtabhängige Transformation. Die Methylierung einer Carboxylgruppe von Isoleucin verhindert die Phototransformation wobei die Bindung des Chromophors weiterhin gegeben ist. Werden beide Carboxylgruppen des Isoleucin 80 verestert wird zudem die Bindung des Chromophors unterbunden (Song 1999).

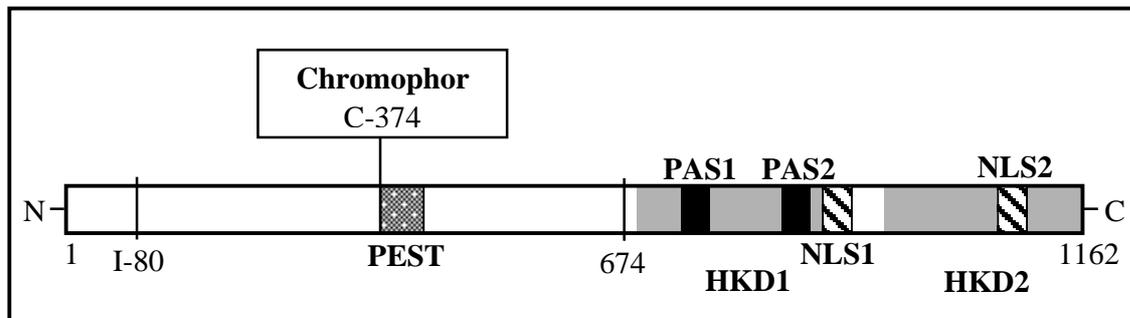


Abb. 1.1: Strukturelle Eigenschaften der Phytochrome Höherer Pflanzen am Beispiel von PHYB aus *Arabidopsis*. HKD: Domäne mit Ähnlichkeit zu bakteriellen Histidinkinasen (grau hinterlegt), NLS: Nukleus-Lokalisierungs-Signal (gestreift hinterlegt), PEST: konserviertes Motiv in kurzlebigen Proteinen (punktiert hinterlegt), PAS: mögliche Proteininteraktionsdomäne (schwarz hinterlegt). Die Zahlen geben AS-Positionen bezogen auf PHYB von *Arabidopsis* an.

Analysen transgener Pflanzen, die die N-terminale Hälfte von Phytochrom überexprimierten, belegten, daß dieses Phytochromfragment als Monomer vorlag. Wurde hingegen die C-terminale Hälfte überexprimiert, konnten in diesen *Arabidopsis*-Mutanten Homodimere nachgewiesen werden (Cherry *et al.* 1993, Wagner *et al.* 1996). Auch gezielte Mutationsanalysen im Bereich des C-Terminus (1116-1161) unterstrichen die Bedeutung des C-Terminus für die Dimerisierungseigenschaften von Phytochromen (Quail 1997).

Im Zusammenhang mit der Signaltransduktion von Phytochromen konnten zwei zweiteilige Nukleuslokalisationsdomänen (NLS1 und NLS2, Abb. 1.1) im C-terminalen Bereich des Apoproteins kartiert werden. Kircher *et al.* (1999a) zeigten anhand von *Oryza phyA*- und *Nicotiana phyB*-GFP-Fusionsproteinen, die in *Nicotiana* exprimiert wurden, eine lichtabhängige Migration dieser Photorezeptoren von ihrem Syntheseort, dem Cytosol, in den Nukleus. Für die Phytochromtypen konnte eine unterschiedliche Kinetik der Translokation experimentell nachgewiesen werden. *phyA*-GFP wurde nach einer 5 minütigen DR-Belichtung komplett im Kern nachgewiesen, wohingegen *phyB*-GFP im Anschluß an eine DR-Belichtung im Cytosol verblieb und ein Transport nur durch R-Belichtung induziert werden konnte. Eine erste Reaktion dieser Photorezeptoren auf einen Lichtreiz könnte demnach der Transport in den Zellkern sein, wodurch die Expression lichtabhängig regulierter Gene bewirkt werden kann.

Für den *phyA* spezifischen proteolytischen Abbau von P_{DR} konnten mögliche beteiligte Domänen charakterisiert werden (für eine Zusammenfassung: Clough und Vierstra 1997). Ein Teil des P_{DR} -Phytochrompools konnte durch Immunoblotanalysen als Ubiquitin-Phytochrom-

Konjugat nachgewiesen werden (Shanklin *et al.* 1987). Ubiquitinkonjugate dienen in tierischen und pflanzlichen Organismen als Erkennungssignale für proteolytische Multienzymkomplexe, den 26S Proteasomen (Hershko und Ciechanover 1992, Vierstra 1993). Aufnahmen der Abbaukinetik von P_{DR} sowie Untersuchungen zur zellulären Lokalisierung von Ubiquitin unterstützten diese Hypothese für mono- und dikotyle Pflanzen (Cherry *et al.* 1991). In diesem Zusammenhang konnte mit Hilfe computergestützter Vergleiche von AS-Sequenzen ein allgemeines Motiv definiert werden, daß konserviert in kurzlebigen Proteinen vorkommt. Langlebige Proteine enthalten dieses Motiv nicht (Rogers *et al.* 1986). Es ist eine Folge von hydrophilen Aminosäuren, die im zentralen Bereich v.a. Pro (P), Asp (D), Glu (E), Ser (S) und Thr (T) enthalten (PEST-Domäne). Im N-terminalen Bereich von Phytochromen befindet sich eine PEST-Domäne (Abb. 1.1). Diese ist konservierter für A-Phytochrome im Vergleich zu PHYB-E (Quail *et al.* 1992). Durch die Photokonversion von P_R zu P_{DR} wird diese Domäne exponiert (Grimm *et al.* 1988). Mittlerweile wird die PEST-Domäne als Erkennungssignal für das Ubiquitin-Degradationssystem diskutiert, wohingegen die Bindung von Ubiquitin am C-Terminus an einem oder mehreren zugänglichen Lysinen erfolgt (Clough *et al.* 1999). Ein experimenteller Nachweis über einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer PEST-Domäne und den dadurch bedingten Proteinabbau liegt bisher noch nicht vor, so daß die Bedeutung dieser Domäne für kurzlebige Proteine noch in Frage gestellt werden muß (Quail 1997, Clough *et al.* 1999).

Schon vor 15 Jahren wurde in aufgereinigten Phytochromextrakten Kinaseaktivität gefunden (für eine Zusammenfassung: McMichael und Lagarias 1990). Da jedoch keine Sequenzhomologien zu eukaryotischen Proteinkinasen nachgewiesen werden konnten und man die beobachtete Aktivität auf mitangereicherte Proteinkinasen zurückführte, wurde diesem Hinweis nicht weiter nachgegangen. Schneider-Poetsch und Braun (1991) konnten kurze Zeit später zeigen, daß etwa 250 AS im C-terminalen Bereich von Phytochromen Ähnlichkeit zu bakteriellen Transmittermodulen besitzen (HKD 1, Abb. 1.1, AS 890-1162). Histidin-Kinasen von Zweikomponenten-Systemen wurden jedoch nur in Prokaryoten gefunden (Kaneko *et al.* 1995).

Lagarias *et al.* (1995) identifizierten eine weitere Domäne im C-terminalen Bereich von Phytochromen, die Ähnlichkeit zu Transmittermodulen zeigt. Diese enthält zwei PAS-Domänen (PAS1 und PAS2, Abb.1.1), die von Proteinen bekannt sind, welche an Signaltransduktionswegen in Säugetieren und *Drosophila* beteiligt sind und Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen (Ponting und Aravind 1997) (HKD 2, Abb. 1.1).

In diesem Zusammenhang war die Entdeckung von cyanobakteriellen, phytochrom-ähnlichen Sequenzen ein weiterer wichtiger Schritt. So konnte in *Fremeyella* ein Photorezeptor nachgewiesen werden, welcher im N-Terminus Phytochromen ähnelt während der C-Terminus eindeutig als Histidin-Kinase identifiziert werden konnte (Kehoe und Grossmann 1996). Fast zur gleichen Zeit wurde in *Synechocystis* ein offenes Leseraster sequenziert, das Homologie zu Phytochromen besaß (Cph1: Kaneko *et al.* 1995, Hughes *et al.* 1997, Yeh *et al.*

1997). Dieses cyanobakterielle Phytochrom zeigte spektrale Eigenschaften vergleichbar mit dem pflanzlichen Photorezeptor (Hughes *et al.* 1997). Die wichtigste Entdeckung war jedoch der Nachweis einer lichtregulierten Histidin-Kinase-Aktivität von Cph1 (Yeh *et al.* 1997). Der evolutive Ursprung pflanzlicher Phytochrome könnte folglich eine lichtregulierte Histidin-Kinase cyanobakteriellen Ursprungs sein.

Mittlerweile konnten Yeh und Lagarias (1998) auch für heterolog hergestelltes Hafer- und Algenphytochrom Protein-Kinaseaktivität belegen. Die Autophosphorylierung erfolgte lichtabhängig und ist für P_{DR} stärker i.V. zu P_R . Anders als beim cyanobakteriellen 'Urphytochrom' beobachtet, wurden durch das Haferphytochrom bevorzugt Serin- oder Threonin-Reste phosphoryliert.

1.5 Mögliche Wege der Signalübertragung

Obwohl mittlerweile viele Details des Phytochrommoleküls bekannt sind, waren abgesehen von Hinweisen auf mögliche Kinaseaktivitäten, kaum Vorstellungen zur Signalweitergabe durch PHY entwickelt worden. In den letzten Jahren haben jedoch vor allem drei Ansätze neue Einsichten erbracht.

Durch die Mikroinjektion von PHY und Komponenten, die in tierischen Zellen die Signalübertragung fördern oder blockieren, in Zellen von WT und phytochromdefizienten Mutanten von *Lycopersicon esculentum*, konnten mögliche Wege der Signalübertragung aufgezeigt werden (Neuhaus *et al.* 1993, Bowler *et al.* 1994). So wurde ein Modell aufgestellt, in dem Phytochrome eine Aktivierung von heterotrimeren, GTP-bindenden Proteinen bewirken. Zwei Wege der Signalweitergabe gehen von G-Proteinen weiter aus. Der eine Weg über cGMP aktiviert beispielsweise CHS, der andere über Ca^{2+} /Calmodulin Photosystem II. Photosystem I benötigt beide Wege.

Erste Evidenzen für nukleäre Signalkaskaden ergaben immunocytologische Lokalisierungsexperimente von Arabidopsis PHYB (Sakamoto und Ngatani 1996). In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden transgene Pflanzen benutzt, die PHY-GFP-Fusionsproteine exprimierten. Mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen kann die Lokalisation von Proteinen verfolgt werden. Die Lokalisierungsexperimente mit Arabidopsis PHYB-GFP (Yamaguchi *et al.* 1999) und Nicotiana PHYB-GFP (Kircher *et al.* 1999a) belegten für die untersuchten Phytochrome eine lichtinduzierte Nukleustranslokation.

Auf diese Weise wurden auch Transkriptionsfaktoren identifiziert, die lichtabhängig cytosolisch bzw. nukleär vorlagen. Dies waren zum einen G-Box bindende Transkriptionsfaktoren (Harter *et al.* 1994) und zum anderen ein Faktor der 'allgemeinen Promotor bindenden Transkriptionsfaktorfamilie' (common promotor-binding transcription factor family, CPRF), hier CPRF2 (Kircher *et al.* 1999b). Die Nukleustranslokation von CPRF2 ist R/DR reversibel, so daß ein Zusammenhang mit der Phytochromsignalübertragung

impliziert werden kann (Kircher *et al.* 1999b). Zusätzlich wurde eine phytochrominduzierte Phosphorylierung von CPRF2 beobachtet (Wellmer *et al.* 1999).

Ein dritter Versuchsansatz wurde mit Yeast-Two-Hybrid-Systemen unternommen, um direkte Reaktionspartner von PHY ausfindig zu machen. So konnten mehrere Interaktionspartner identifiziert werden, wie z.B. PIF3 (Phytochrom interagierender Faktor 3) (Ni *et al.* 1998). Durch GFP-PIF3-Fusionsproteine wurde die konstitutive Lokalisation von PIF3 im Nukleus nachgewiesen. Datenbankvergleiche von PIF3 deuten auf DNA-bindende und dimerisierende Eigenschaften dieses Proteins hin ähnlich den basischen-Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren (Ni *et al.* 1998). PIF3 besitzt eine zweiteilige Nukleuslokalisationssequenz (NLS) sowie eine PAS-Domäne im N-Terminus. Die PAS-Domäne zeigt höchste Ähnlichkeit zu den PAS-Domänen aus Phytochromen und könnte folglich die spezifische Interaktion zwischen Phytochromen und PIF3 ermöglichen. Zudem zeigten Ni *et al.* (1999) eine photoreversible Interaktion von PIF3 mit PHYB *in vitro*. Die Bindung von PIF3 erfolgt an PHYB in der P_{DR}-Form. Die Konversion von P_{DR} zu P_R beendet die Bindung von PIF3 an PHYB. Da für PHYB eine lichtabhängige Migration in den Nukleus gezeigt werden konnte (Kircher *et al.* 1999a), wäre eine Bindung mit PIF3 im Nukleus in der P_{DR}-Form in einer lichtregulierten Weise möglich. Basische-Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren könnten dort, wie für diese Klasse von Transkriptionsfaktoren gezeigt wurde, an E-box-Motive binden, wie man sie in vielen lichtregulierten Genen findet. Das Phytochrom-PIF3-Modell war die erste Beschreibung eines direkten Interaktionspartners im Rahmen der Signaltransduktion von Phytochromen.

Choi *et al.* (1999) isolierten auf diese Weise außerdem eine cytosolische Nucleosid-Diphosphat-Kinase (NDPK), deren Interaktion mit dem C-Terminus von PHYA durch Vernetzungsexperimente unterstützt wurde. In tierischen Systemen konnte diesem Enzymtyp eine regulatorische Funktion zugeordnet werden. Mutationen in einem NDPK homologen Gen in *Drosophila* führten zu abweichender Organdifferenzierung und Zellnekrosen (Biggs *et al.* 1990).

Fankhauser *et al.* (1999) wiesen weiterhin nach, daß gereinigtes Hafer-Phytochrom *in vivo* autophosphoryliert und andere Proteine phosphoryliert. In diesem Fall wurde eine lichtabhängige Phosphorylierung von PKS1 (Phytochrom Kinase Substrat 1) durch PHYA und PHYB belegt. Die Interaktion der beiden Signaltransduktionspartner betraf *in vitro* die Histidin-Kinase ähnlichen Bereiche des C-Terminus von PHYA und PHYB (HKD1 u. 2, Abb. 1.1). Transgene Pflanzen, die PKS1 überexprimierten, zeigten ein verlängertes Hypokotyl im Rotlicht. Folglich entsprach ihr Phänotyp dem dunkelgewachsener Keimlinge trotz Belichtung mit R. Eine mögliche Funktion von PKS1 könnte somit die negative Regulation der PHY-Signaltransduktion sein (Fankhauser *et al.* 1999). PKS1-GFP-Fusionsproteine lagen konstitutiv cytosolisch vor, so daß es wahrscheinlich ist, daß Phytochrom und PKS1 im Cytosol interagieren.

Auf welche Weise die hier dargestellten nukleären und cytosolischen Komponenten der Signaltransduktion von Phytochromen untereinander und mit weiteren Photorezeptoren verknüpft sind, wird die Aufgabe zukünftiger Untersuchungen sein (für eine Zusammenfassung: Nagy und Schäfer 2000).

1.6 Molekulare Phylogenie

Seit der Zeit von Darwin und Haeckel wurde die Einordnung der Organismen nach phylogenetischen Gesichtspunkten zum Hauptanliegen der Systematik. Morphologische (rezente und fossile), physiologische und biochemische Merkmale wurden herangezogen. Heute erlauben molekulare Sequenzen und Methoden zu ihrer Verrechnung eine überaus wirkungsvolle Erweiterung und Korrektur der aufgrund dieser Merkmale getroffenen Aussagen.

Molekulare Phylogenien basieren auf Sequenzvergleichen orthologer Gene von unterschiedlichen Organismen. Jedes Nukleotid oder jede Aminosäure einer Sequenz wird dabei als einzelnes, unabhängiges Merkmal gewertet. Für phylogenetische Analysen müssen die zu vergleichenden Sequenzen möglichst zweifelsfrei in ein Alignment gebracht werden, d.h. die homologen Sequenzen werden so angeordnet, daß die größtmögliche Anzahl übereinstimmender Positionen untereinander steht. Aus diesen Datensätzen werden Rekonstruktionen der möglichen Abstammungsgeschichte der untersuchten Organismen in Form von Kladogrammen erhalten. Alle Sequenzen, deren verwandtschaftliche Beziehungen durch den Vergleich von Merkmalen bearbeitet werden sollen, werden als Ingroup bezeichnet. Eine Outgroup ist demgegenüber die Sequenz einer Spezies dessen systematische Stellung bekannt ist und die sich in den meisten Fällen sehr früh von einem gemeinsamen Vorfahren abgespalten hat. Durch den Vergleich der Merkmalskombinationen der Outgroup mit denen der Ingroup kann eine Leserichtung innerhalb der Stammbäume festgelegt werden. Grundbausteine der Kladogramme sind monophyletische Gruppen. Dies sind Schwestergruppen, die aus einer gemeinsamen Stammart hervorgegangen sind. Die Darstellung phylogenetischer Zusammenhänge in Kladogrammen erleichtert das Erkennen und Nachvollziehen evolutiver Zusammenhänge und macht Vergleiche unterschiedlicher Datensätze erst möglich, auch wenn wahrscheinlich nicht alle phylogenetischen Zusammenhänge auf monophyletische Gruppen reduziert werden können.

Für die Untersuchung der Evolution eukaryoter pflanzlicher Organismen wurden bisher plastidäre *rbcL*- (Chase *et al.* 1993, Qiu *et al.* 1993, Hasebe *et al.* 1992, Goremykin *et al.* 1996) und *atpB*-Gene (Wolf 1997, Qiu *et al.* 1999), mitochondriale *cox3*- (Malek *et al.* 1996) und *matR*-Gene (Qiu *et al.* 1999) sowie nukleäre 18S rRNA-Sequenzen (Chaw *et al.* 1993, 1995, 1997, Soltis *et al.* 1997) verwendet, von denen große Datenmengen vorliegen.

Auch Sequenzen der kernkodierten Phytochromgene haben sich für phylogenetische Fragestellungen als geeignet erwiesen (Kolukisaoglu *et al.* 1995, Schneider-Poetsch *et al.* 1994, 1998, Mathews und Donoghue 1999, Mathews *et al.* 1995).

Analysen von kompletten Phytochromsequenzen ließen erkennen, daß nicht nur Angiospermen sondern auch Gymnospermen und Farne mehrere verschiedene Gene für Phytochrome besaßen (Kolukisaoglu *et al.* 1995, Schneider-Poetsch *et al.* 1998). Es zeigte sich, daß die Phytochrome der Farne offensichtlich nicht der A- oder B-Genlinie Höherer Pflanzen angehören. Innerhalb der Niederen Pflanzen wiesen molekulare Phylogenien anhand von Phytochromgenen dem 'Urfarn' *Psilotum* (Psilotatae) eine unerwartete Position zu. Traditionell wurde diese Spezies als nahe Verwandte der ersten Gefäßpflanzen, der Psilophytatae, angesehen und ihnen eine Sonderstellung als 'lebende Fossilien' an der Basis der Landpflanzen eingeräumt (Stewart und Rothwell 1993, Sitte *et al.* 1999). Molekulare Phylogenien der Phytochromgenfragmente hingegen zeigten, daß *Psilotum* einen gemeinsamen Vorfahren mit den echten Farnen (Filicatae) teilte (Kolukisaoglu *et al.* 1995, Schneider-Potesch *et al.* 1998). Diese Zusammenhänge konnten durch weitere molekulare Phylogenien anhand von *atpB*- (Wolf 1997) und *cox3*-Genen (Malek *et al.* 1996) bestätigt werden. Die Erkenntnisse über die mögliche Evolution der Psilotatae könnten zudem erklären, warum von den robusten Sprossen von *Psilotum* und auch von *Tmesipteris* keine Fossilien in Ablagerungen des Silur oder Devon (vor etwa 400 Mio. J.) gefunden wurden, wie es für einen Anschluß an die Urfarne zu erwarten gewesen wäre (Stewart und Rothwell 1993). Für Angiospermengruppen konnte gezeigt werden, daß phylogenetische Zusammenhänge durch jede Phytochromgenlinie *phyA-phyE* repräsentiert werden (Mathews und Sharrock 1995, Mathews *et al.* 2000). Auf der Basis dieser Untersuchungen wurden phylogenetische Analysen von Angiospermen mit den Phytochromgenlinien *phyA* und *phyC* durchgeführt (Mathews und Donoghue 1999). Dabei wurde ein Problem, das oft bei der Verwendung systematisch weit entfernter Outgroup-Organismen auftritt, auf elegante Weise umgangen. In den phylogenetischen Analysen wurden beide Phytochromgenlinien gegeneinander verrechnet, es wurde *phyC* als Outgroup zu *phyA* verwendet. So konnte die Position von *Amborella* als ursprünglichste, rezente Angiosperme bestätigt werden. Vorherige Analysen, die sich mit der stammesgeschichtlichen Position von *Amborella* befaßten, unterlagen der Problematik der Outgrouporganismen, da die nächsten Verwandten der Angiospermen, die Gymnospermen, entwicklungsgeschichtlich relativ weit entfernt sind, wodurch phylogenetische Fehlinterpretationen möglich sein können (Soltis *et al.* 1999, Qiu *et al.* 1999). Ein Vorteil, den folglich die phylogenetische Arbeit mit Genfamilien bieten kann, ist die Darstellung phylogenetischer Zusammenhänge in jeder untersuchten Genlinie.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Lichtabhängige Phänomene sind in Angiospermen eingehend untersucht worden (für eine Zusammenfassung: Tobin und Silverthorne 1985, Simpson und Herrera-Estrella 1990). Hingegen liegen wenig Daten darüber für Gymnospermen vor. Auffällig ist jedoch, daß die meisten dunkelangezogenen Keimlinge von Gymnospermen grün sind und nur eine geringe Hypokotylstreckung im Vergleich zu lichtgewachsenen Keimlingen zeigen (Fernbach und Mohr 1990, Mukai *et al.* 1992). Außerdem zeigte es sich, daß das Photosystem II in Dunkelheit ausgebildet wird (Alosi *et al.* 1990, Yamamoto *et al.* 1991, Peer *et al.* 1996).

Im Hinblick auf die Transkription von Phytochromen in Gymnospermen stellte man fest, daß sie mehr oder weniger konstitutiv ist (Clapham *et al.* 1999). Demnach scheint die Expression der Phytochromgene von dem Expressionsmuster angiospermer Pflanzen abzuweichen, da dort eine bis zu 100-fache Anreicherung von *phyA* mRNA in dunkelgewachsenen Keimlingen nachgewiesen werden kann (Quail *et al.* 1995).

Anhand dieser Daten stellten sich nun die Fragen, ob (1) eine lichtabhängige Expression von Phytochromen auf Proteinebene in *Pinus* nachweisbar ist und (2) ob Proteine, die bekanntermaßen in Angiospermen lichtabhängig exprimiert werden, in *Pinus* ebenfalls einer lichtabhängigen Regulation unterliegen.

Da zu Beginn dieser Arbeit nur eine komplette Phytochromsequenz aus *Pinus* und Teilfragmente aus *Picea* bekannt waren, wurde nach weiteren möglichen Mitgliedern der Phytochromgenfamilie von *Pinus* gesucht. Mit Hilfe von PCR-Verfahren sollten Fragmente der Phytochromgene von *Pinus* erhalten werden, die als spezifische Sonden dienen konnten.

In einer weiteren Fragestellung dieser Arbeit wurde das Potential von Phytochromgenfragmenten für molekulare Phylogenien von Gymnospermen und Pteridophyten untersucht. In diesem Zusammenhang sollte ein Verfahren erarbeitet werden, das es erlaubte, mit Hilfe von PCR-Techniken und anschließender RFLP-Analysen möglichst viele Phytochromgene einer Spezies standardmäßig zu erfassen. Anhand großer Datensätze sollte (1) ein genaueres Bild der Evolution der Phytochromgenfamilie in Gymnospermen und Pteridophyten erhalten werden und (2) die molekulare Phylogenie der Organismen anhand von Phytochromgenen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

Für phylogenetische Analysen von partialen Phytochromgenen wurde aus folgenden Spezies Gesamt-DNA isoliert. Die systematische Einteilung folgt Kramer und Tyron (1990) für Pteridophyten und Page (1990) für Gymnospermen:

<u>Bryophyta</u>	Marchantiaceae	<i>Conocephalum supradecompositum</i> (Lindb.) Stephani ①
<u>Pteridophyta/</u>		
<u>Psilotatae</u>	Psilotaceae	<i>Tmesipteris tannensis</i> s.l. Bernh.
	Psilotaceae	<i>Psilotum nudum</i> (L.) P. Beauv. ①
<u>Lycopodiatae</u>	Isoetaceae	<i>Isoetes velata</i> L. ①
<u>Equisetatae</u>	Equisetaceae	<i>Equisetum fluviatilis</i> L. ①
<u>Filicatae</u>	Blechnaceae	<i>Blechnum spicant</i> L. (Roth.) ①
	Dicksoniaceae	<i>Dicksonia antarctica</i> Labill. ①
	Marattiaceae	<i>Angiopteris evecta</i> (G. Forst.) Hoffm. ①
	Marattiaceae	<i>Marattia laevis</i> Sm. ①
	Marsileaceae	<i>Pilularia globulifera</i> L. ①
	Ophioglossaceae	<i>Botrychium lunaria</i> (L.) Sw. ①
	Ophioglossaceae	<i>Ophioglossum vulgatum</i> L. ①
	Osmundaceae	<i>Osmunda regalis</i> L. ①
	Polypodiaceae	<i>Platyserium angolense</i> Welw. ex Bak. ①
	Polypodiaceae	<i>Polypodium vulgare</i> L. ①
	Salviniaceae	<i>Salvinia natans</i> (L.) All. ①
	Vittariaceae	<i>Vittaria lineata</i> (L.) Sm. ①
	Azollaceae	<i>Azolla filiculoides</i> Lam. ①
<u>SPERMATOPHYTA/</u>		
<u>Gymnospermae/</u>		
<u>Ginkgoatae</u>	Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i> L. ①
<u>Pinatae</u>	Araucariaceae	<i>Agathis dammara</i> (Lamb.) L.C. Rich. ②
	Araucariaceae	<i>Araucaria araucana</i> (Mol.) K. Koch ①
	Cephalotaxaceae	<i>Cephalotaxus fortunei</i> Hook. ②
	Cupressaceae	<i>Thuja plicata</i> Donn ex. D. Don. ①
	Cupressaceae	<i>Chameacyparis lawsoniana</i> (A.Murr.) Parl. ①
	Cupressaceae	<i>Cupressus sempervirens</i> L. ①
	Cupressaceae	<i>Juniperus phoenicea</i> L. ①
	Phyllocladaceae	<i>Phyllocladus trichomanoides</i> D. Don. ②
	Pinaceae	<i>Larix decidua</i> Mill. ①
	Pinaceae	<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco ①
	Pinaceae	<i>Picea abies</i> (L.) Karst. ①
	Pinaceae	<i>Pinus sylvestris</i> L. ①
	Podocarpaceae	<i>Saxegothea conspicua</i> Lindl. ②
	Podocarpaceae	<i>Podocarpus neriifolius</i> D. Don. ①
	Podocarpaceae	<i>Dacrydium cupressinum</i> Soland. ex Lamb. ②
	Sciadopityaceae	<i>Sciadopitys verticillata</i> Sieb. et Zucc. ①
	Taxaceae	<i>Taxus baccata</i> L. ①
	Taxaceae	<i>Torreya nucifera</i> (L.) Sieb. et Zucc. ①
	Taxodiaceae	<i>Cryptomeria japonica</i> (L.f.) D. Don. ①

	Taxodiaceae	<i>Sequoiadendron giganteum</i> (Lindl.) Buchh. ①
	Taxodiaceae	<i>Metasequoia glyptostroboides</i> Hu et Cheng ①
	Taxodiaceae	<i>Taxodium distichum</i> (L.) L.C. Rich. ①
<u>Cycadatae</u>	Cycadaceae	<i>Cycas revoluta</i> Thunb. ①
	Stangeriaceae	<i>Stangeria eriopus</i> (Kunze) Nash ①
	Zamiaceae	<i>Macrozamia communis</i> Miq. ①
<u>Gnetatae</u>	Ephedraceae	<i>Ephedra major</i> Host ①
	Ephedraceae	<i>Ephedra foemina</i> (L.) Stapf
	Gnetaceae	<i>Gnetum gnemon</i> L. ①
	Welwitschiaceae	<i>Welwitschia mirabilis</i> Hook. f. ①

Mit ① markierte Pflanzen wurden vom Garten des Botanischen Institutes der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt. Pflanzenmaterial der Spezies, die mit ② markiert sind, wurden von Herrn Dr. Lobin (Botanischer Garten der Friedrichs-Wilhelms-Universität Bonn) freundlicherweise überlassen. Die Sidney Royal Botanic Gardens (Australien) übersendeten in Alkohol eingelegtes Material von *Tmesipteris tannensis* für diese Arbeit.

Gesamt-DNA von *Anthoceros punctatum* L. (Bryophyta, Anthocerotaceae) und *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank et Mart. (Pteridophyta, Lycopodiaceae) wurde freundlicherweise von Dr. B. Marin, Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt.

Saatgut von *Picea abies* und *Pinus sylvestris*, das für die Gewinnung von Gesamt-DNA, RNA bzw. Proteinextrakten ausgelegt wurde, wurde von der Firma Schmitz und Laux (Hilden) bezogen.

Die Anzucht von Pflanzen erfolgte in Saatschalen gefüllt mit Einheitserde Typ ED 73 (Firma Keller, Köln), die mit Leitungswasser durchfeuchtet wurden. Lichtgewachsene Keimlinge wurden im Gewächshaus unter Tag-/Nachtrhythmus (Licht-Dunkel-Wechsel: 16 h / 8 h) angezogen. Als Lichtquelle wurden Hochdruck-Natriumlampen (Tageslichtlampen), die Licht mit einem Spektralbereich von 390-750 nm emittieren (Firma Philips Licht GmbH, Köln; Produktangaben des Herstellers), verwendet. Etiolierte Keimlinge wurden in Dunkelheit angezogen.

2.1.2 *E. coli*-Stämme

Für Klonierungen von Plasmiden wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

XL1 Blue: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac* [F', *proAB, lac^q ZΔM15, Tn10(tc')*] (Promega, Mannheim)

DH5 : F , ϕ 80*dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17* (*r_k-m_k+), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169*) (Stratagene, Heidelberg)

Die Untersuchung der cDNA-Bank von *Pinus* erfolgte mit folgendem *E. coli*- Stamm:

Y1090: F⁻, $\Delta(lacU169)$, *proA*⁺, $\Delta(lon)$, *araD139*, *strA*, *supF*, *mcrA*,
 [*trpC22::Tn10(Tc)*], (*pmc9*), *hsdR* (*rk*⁻, *mk*⁺)
 (Stratagene, Heidelberg)

Die Überexpression von partialen Phytochromgenen aus *Pinus sylvestris* wurde im *E. coli*-Stamm M15[pREP4] der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt.

2.1.3 Vektoren

Für Klonierungen von DNA-Fragmenten sowie für die Expression von heterologen Proteinen in *E. coli* wurden folgende Vektoren verwendet:

pGEM-T / pGEM-T easy	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor für PCR Produkte; Promega (Mannheim)
pUC18/pUC19	<i>E. coli</i> - Klonierungsvektor, Stratagene (Heidelberg)
pQE 30/31/32	<i>E. coli</i> - Transkriptions-, Translationsvektor, Qiagen (Hilden)

2.1.4 c-DNA Banken

Die cDNA-Bank von *Pinus sylvestris* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. B. Martin, Universität Düsseldorf, für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es wurde der Phage NM1149 verwendet, ein Abkömmling des Phagen gt10.

2.1.5 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
-[³² P]-dATP	Amersham (Braunschweig)
-Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)
Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Agarose, ultrapure	Biozym (Hess Oldendorf)
APS	Amersham (Braunschweig)
Ampicillin	Sigma (München)
Bacto-Agar	Difco (Hamburg)
Bacto-Trypton	Difco (Hamburg)

BCIP	Boehringer (Mannheim)
Bind-Silan	Pharmacia (Freiburg)
Blocking-Reagenz	Boehringer (Mannheim)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
BSA	Sigma (München)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue	Serva (Heidelberg)
dNTP's	Promega (Mannheim)
DTT	Serva (Heidelberg)
DNA-Mengenstandard (-Phagen-DNA)	MBI (St. Leon-Rot)
DNA-Größenstandard (-Phagen-1kb-Leiter)	Gibco-BRL (Neu-Isenburg)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma (München)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Ficoll Typ 400	Pharmacia (Freiburg)
Formamid	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
High Range Protein Molecular Weight Marker	Promega (Mannheim)
CTAB	Serva (Heidelberg)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
IPTG	BTS (St. Leon-Rot)
Heringsperma-DNA	Promega (Mannheim)
Hefeextrakt (Bacto-Yeast-Extract)	Difco (Hamburg)
Kanamycin	Duchefa (Haarlem,NL)
Methanol	Merck (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosin	Serva (Heidelberg)
N, N*-Methylen-Bisacrylamid	Serva (Heidelberg)
TEMED	Serva (Heidelberg)
NBT	Roth (Karlsruhe)
Polyclar AT	Serva (Heidelberg)
Polyethylenglykol	Sigma (München)
Polyvinylpyrrolidon	Sigma (München)
Ponceau S	Roth (Karlsruhe)
Repell-Silan	Pharmacia (Freiburg)
Rotisol	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
SDS	Merck (Darmstadt)
Spermidin	Sigma (München)
Streptomycin	Sigma (München)
Tetracyclin	Sigma (München)
Triton X 100	Merck (Darmstadt)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma (München)
x-Gal	BTS (St. Leon-Rot)

2.1.6 Geräte

Für die Durchführung der beschriebenen Arbeitsmethoden wurden folgende Geräte verwendet:

Gerät	Hersteller	Produktbezeichnung
Thermocycler	Perkin Elmer (Weiterstadt) Biometra (Göttingen)	DNA Thermal Cycler Personal Cycler
PAA-Elektrophoresekammer (für DNA-Sequenzierungen)	Gibco-BRL (Neu-Isenburg)	Modell S2
Automatischer DNA-Sequenzierer	Perkin Elmer (Weiterstadt)	ABI PRISM 310 Genetic Analyser
Photometer	Perkin Elmer (Weiterstadt)	Lambda 15 UV/VIS Spektrophotometer
Geldokumentationsanlage	Intas (Göttingen)	Intas Video Copy System
Phospho-Imager	Molecular Dynamics (Krefeld)	Phospho-Imager Storm 860
Zentrifugen	Heraeus (Düsseldorf) Sigma (Osterode)	Labofuge GL Sigma 2K15

2.1.7 Kultur-Medien und Lösungen

E. coli-Medien

LB-Medium:

1,0% (w/v) Bacto-Trypton
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 0,5% (w/v) NaCl
 pH 7,5 mit NaOH

LB-Agar:

1,5% (w/v) Bacto-Agar
 in LB-Medium

TB-Medium:

1,0% (w/v) Bacto-Trypton
 0,5% (w/v) NaCl
 pH 7,4 mit NaOH

TB-Agar:

1,5% (w/v) Bacto-Agar
 in TB-Medium

Material und Methoden

2 x YT-Medium:

1,0 % (w/v)	Bacto-Trypton
1,6 % (w/v)	Hefeextrakt
0,5% (w/v)	NaCl
	pH 7,5 mit NaOH

Alle Medien und Lösungen wurden in ddH₂O angesetzt. Für den Gebrauch wurden diese Medien autoklaviert. Nach Abkühlen auf 50°C konnten benötigte sterilfiltrierte Antibiotika bzw. Selektionssubstrate zugegeben werden, um die angegebenen Endkonzentrationen zu erreichen:

Verwendete Antibiotika-Stammlösungen bzw. Selektionssubstrate:

Ampicillin	100	mg/ml
Kanamycin	50	mg/ml
Tetracyclin	10	mg/ml
IPTG	0,4	mg/ml
x-Gal	0,06	mg/ml

Häufig verwendete Lösungen:

20 x SSC:

3 M	NaCl
0,3 M	tri-Na-Citrat x 2 H ₂ O

50 x TAE:

2 M	Tris
1 M	Eisessig
50mM	EDTA
	pH 8,2

1 x TE:

10 mM	Tris
1 mM	EDTA
	pH 8,0 mit HCl

Denhardt's-Lösung:

1% (v/v)	Ficoll Typ 400
1% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
1% (w/v)	BSA

10 x PBS:

8% (w/v)	NaCl
0,2% (w/v)	KCl
1,44% (w/v)	Na ₂ HPO ₄
0,24% (w/v)	KH ₂ PO ₄

Hier nicht aufgeführte Lösungen und Medien werden bei der jeweiligen Methodenbeschreibung aufgeführt.

2.1.8 Standardisierte Zusammenstellungen von Reagenzien (Kits)

Es wurden verwendet:

- QiaexII-DNA-Extraktionskit, Qiagen (Hilden): Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen
- Plasmid-DNA-Isolierungskit, Qiagen (Hilden): Gewinnung von hochreiner Plasmid-DNA für Sequenzierungen bzw. Klonierungen
- SilverSequenceTM Kit, Promega (Mannheim): PCR-Amplifikationen für anschließende Sequenzierungen
- ABI PRISMTM DYE TERMINATOR Cycle Sequencing Ready Reaction KIT SF, Perkin Elmer (Weiterstadt): PCR-Amplifikationen für die automatische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTP's
- PCR DIG Probe Synthesis Kit, Boehringer (Mannheim): Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin zur Synthese spezifischer Hybridisierungssonden
- Qiaquick PCR-Extraction Kit, Qiagen (Hilden): Aufreinigung von PCR-Produkten.

2.1.9 Enzyme

Restriktionsendonukleasen:

Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Herstellern bezogen: Boehringer (Mannheim), Promega (Mannheim), MBI (St. Leon-Rot), Pharmacia (Freiburg), New England Biolabs (Schwalbach).

DNA-modifizierende Enzyme:

Alkalische Phosphatase (E.C.3.1.3.1)	Pharmacia (Freiburg)
T4-DNA-Ligase (E.C.6.5.1.1)	Promega (Mannheim)
T4-DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
Klenow Enzym (E.C.2.7.7.7)	Pharmacia (Freiburg)
Taq-DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)

Sonstige Enzyme:

Lysozym (E.C.3.2.1.17)	Merck (Darmstadt)
Proteinase K (E.C.3.4.21.14)	Boehringer (Mannheim)
RNase A	Boehringer (Mannheim)

2.1.10 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden in entsalzter Form mit entfernten Schutzgruppen bei Gibco BRL (Paisley, Schottland) oder bei NAPS (Göttingen) bestellt. Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

Für partielle Phytochromsequenzen (degenerierte Oligonukleotide):

S705 5' TATGAYAGGGTKATGGCTTATAAGTTCCATG 3'
A1308N 5' GCRGCTCCATCACATTTTCACMAGRTCCAT 3'
SP-A 5' TATGAYMGGGTIATGGYITAYAARTTYCAYG 3'
SP-S 5' GCWGCTCCATCACATTTTCACMAGRTCCAT 3'
SHAR-S 5' CAYTAYYCIGCIACIGAYATHCC 3'
SHAR-A 5' CRCAIGCRTAICKIARIGGRWAIGG 3'
PIPS 5' GSDWTGGTVATAGAYTTTGAGCC 3'
PIPA 5' GCMWRCAATCGCARATCATTC 3'

Folgender Code wurde für o. a. gemischte Basen verwendet: Y=C+T; K=T+G; R=A+G; M=A+C; W=A+T; H=A+T+C; D=A+T+G; V=A+C+G; I=Desoxyinosin.

Für Sequenzierungen:

pUC/M13 forward 5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'
pUC/M13 reverse 5' TCACACAGGAAACAGCTATGAC 3'
T7 5' GCGCTGTAATACGACTCACTATAG 3'
SP6 5' ATTTAGGTGACACTATAGAATACTP 3'
pQE/Type III/IV 5' CGGATAACAATTTTCACACAG 3'

2.1.11 Antikörper

Anti-DIG-AP-Fab-Fragment	Boehringer (Mannheim)
Ziege Anti-Kaninchen IgG-AP-Konjugat	Serva (Heidelberg)
Ziege Anti-Maus IgG-AP-Konjugat	Serva (Heidelberg)
NiNTA-AP-Konjugat	Qiagen (Hilden)
Maus Anti-His ₅	Qiagen (Hilden)
Kaninchen Anti-Petersilie-CHS	Schröder <i>et al.</i> (1979)
Maus Anti-Mais-PHYA Z3B1	Schneider-Poetsch <i>et al.</i> (1988)
Kaninchen Anti-Spinat-ALAD	Labor Prof. Schneider-Poetsch
Kaninchen Anti-Bohne- -Amylase	Labor Prof. Schneider-Poetsch
Kaninchen Anti-Gerste-LHCII	Labor Prof. Schneider-Poetsch
Kaninchen Anti-Gerste-RBCL	Labor Prof. Schneider-Poetsch

Der pkAK Kaninchen Anti-Petersilie-CHS wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Hahlbrock, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Köln), für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Sofern nicht gesondert aufgeführt erfolgten alle Arbeiten mit *E. coli*-Stämmen nach Sambrook *et al.* (1989).

2.2.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

TSS:

10% (w/v)	PEG 8000
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
5% (v/v)	DMSO
	in LB-Medium pH 6,5-6,8

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte entsprechend einem veränderten Protokoll nach Hanahan (1983).

0,3 ml einer *E. coli*- Übernachtskultur wurden zu 30 ml vorgewärmten LB-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 bei 37°C im Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 2500 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Sediment in 3 ml kaltem TSS vorsichtig resuspendiert. 100 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

SOB:

2,0% (w/v)	Bacto-Trypton
0,5% (w/v)	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgSO ₄
10 mM	MgCl ₂

SOC:

0,4% (v/v)	Glukose
	in SOB

Die Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli*-Zellen erfolgte entsprechend einem veränderten Protokoll nach Hanahan (1983). 100 µl kompetenter *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und bis zu 50% des Ligationsansatzes bzw. 1-2 ng Plasmid-DNA zugegeben.

Dieser Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, danach 1 min bei 42°C und anschließend 2 min auf Eis gestellt. Es wurden 900 µl SOC zugegeben und die Zellen für 60 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nun wurden die Zellen bei 2000 g und RT für 1 min zentrifugiert und das Bakteriensediment in 100 µl 10 mM MgSO₄ aufgenommen. Das Ausstreichen der Suspension erfolgte auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion der Transformanten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3 Expression heterologer Proteine in *E. coli*

Die Herstellung heterologer Proteine in *E.coli* mit Hilfe des pQE[pREP4]-Expressionssystems erfolgte entsprechend der Produktangaben von Qiagen (Hilden) mit folgenden Spezifikationen:

Für die Vorkulturen wurden frisch transformierte *E.coli*-Klone in LB-Medium ü.N. mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin angezogen. Für die Expressionskultur wurde vorgewärmtes 2xYT-Medium, das mit Antibiotika (s.o.) versetzt worden war, 1:20 (v/v) mit einer frischen Vorkultur angeimpft und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend erfolgte die Induktion der Überexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Diese Kultur wurde für weitere 3 h auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 5000 g und RT für 10 min wurden die *E.coli*-Zellen sedimentiert, der Überstand verworfen und bis zur Aufarbeitung des überexprimierten Proteins bei -20°C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Allgemein übliche molekularbiologische Methoden wurden entsprechend den Angaben von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Zu diesen Methoden gehören u.a. die elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen bzw. denaturierenden PAA-Gelen, die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen unter anderem für RFLP-Analysen von Phytochromgenfragmenten, die Extraktion von DNA mit Phenol, PCI und CI, Fällungen, Dephosphorylierungen, Auffüllreaktionen sowie Ligationen von DNA-Fragmenten in Klonierungs- bzw. Expressionsvektoren.

2.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Ausgangsmaterial für die Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen war in den meisten Fällen junges Blattmaterial des Sporophyten. Bei *Conocephalum supradecompositum*, *Anthoceros punctatum* und *Huperzia selago* wurde DNA des Gametophyten isoliert. Die Isolierung erfolgte modifiziert nach Doyle und Doyle (1990), wie bei Hanelt (1994) beschrieben. Für Restriktionsanalysen von Gesamt-DNA wurde im Anschluß an ihre Isolierung zusätzlich eine PCI-Extraktion durchgeführt.

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse entsprechend Birnbaum und Doly (1979) mit folgenden Änderungen:

Im Anschluß an die Renaturierung der Plasmid-DNA durch Kalium-Acetat wurde dem Überstand 2,5 Vol. kaltes, absolutes Ethanol zugegeben und die Plasmid-DNA 30 min bei -20°C gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 18000 g und 4°C wurde das Sediment mit 80% Ethanol und anschließend mit absolutem Ethanol gewaschen und in 50 μl ddH₂O aufgenommen. Plasmid-DNA dieser Reinheitsstufe wurde für Restriktionsanalysen verwendet. Für Sequenzierungen wurde die so gewonnene Plasmid-DNA 1 h bei 37°C mit RNase A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert und anschließend eine PCI-Extraktion durchgeführt. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C .

Die Amplifizierung von λ -Phagen sowie die Isolation von DNA aus λ -Phagen erfolgte wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. An die Präparation der DNA schloß sich eine PCI- und CI-Extraktion an, um Stoffe zu entfernen, die den folgenden Restriktionsverdau störten. Zur Entfaltung der Phagen-DNA wurde dem Spaltungsansatz 1 mM Spermidin zugegeben.

Die Bestimmung der Reinheit und der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte sowohl spektrophotometrisch durch Messung der OD₂₆₀ und OD₂₈₀ als auch durch Vergleich der in einem Agarosegel aufgetrennten und mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente mit einem Nukleinsäure-Mengenstandard.

2.2.2.2 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

PCR-Amplifikationen wurden mit Taq-DNA-Polymerase der Firma Promega (Mannheim) im Personal Cycler von Biometra (Göttingen) oder DNA Thermal Cycler von Perkin Elmer (Weiterstadt) nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

Reaktionsansatz:

200-300 ng	Gesamt-DNA oder
1-10 ng	Plasmid-DNA
50 pmol	pro Oligonukleotid (Primer)
200 µmol	dNTP
1,25 mM	MgCl ₂
1 x	Taq-DNA-Polymerasepuffer
2,5 U	Taq-DNA-Polymerase

Temperaturprofil:

2 min	94°C	Denaturierung
30-40 x		
30 sec	94°C	Denaturierung
30 sec	45-52°C	Annealing (Bindung der Primer an die DNA-Matrize)
60 sec	72°C	Elongation
abschließend		
10 min	72 °C	Endelongation

Die Temperatur für die optimale Bindung der Oligonukleotide und somit saubere Amplifikationen kann in Annäherung nach folgender Formel errechnet werden:

$$T_m = (G+C) \times 4^\circ\text{C} + (A+T) \times 2^\circ\text{C} \quad T_m = \text{Schmelztemperatur}$$
$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C} \quad T_a = \text{Hybridisierungstemperatur}$$

Für jede verwendete DNA-Matrize und verwendete Primer mußte die optimale Annealingtemperatur ermittelt werden. Sie lag zwischen 45 und 55°C.

2.2.2.3 Herstellung von DNA-Sonden

Lösung A:	1,25 M 125 mM 2% (v/v) je 0,5 mM	Tris/HCl pH 8,2 MgCl ₂ -Mercaptoethanol dCTP, dGTP, dTTP
Lösung B:	2 M	HEPES/NaOH pH 6,6
Lösung C:	3,6 µg/µl	Hexadesoxynukleotide (dN ₆)
OLB-Puffer:	Lösung A : Lösung B : Lösung C 1 : 2,5 : 1	

Die Herstellung von DIG-markierten Sonden erfolgte mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit von Boehringer (Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers.

In den Reaktionsansatz wurde 1 ng Plasmid-DNA als Matrize eingesetzt. Die durch PCR-Amplifikation gewonnene Sonde wurde im Agarosegel von unspezifischen DNA-Fragmenten und amplifizierten Oligonukleotiden getrennt. Das DNA-Fragment der erwarteten Größe wurde ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert.

Radioaktiv markierte Sonden wurden nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983, 1984) durchgeführt. Die Matrizen-DNA wurde denaturiert und der komplementäre DNA-Strang von einer DNA-Polymerase synthetisiert. Als Primer wurden hexamere Oligonukleotide mit zufälliger Sequenz verwendet, die an zufällig komplementäre Positionen des DNA-Matrizenstranges binden (random priming). Durch Verwendung eines radioaktiv markierten Desoxynukleotids entsteht eine DNA-Sonde mit einer hohen spezifischen Aktivität.

Für diesen Reaktionsansatz wurden 50 ng Matrizen-DNA mit 10 µl OLB-Puffer für 10 min bei 95 °C denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden 2 µl BSA (1 mg/ml), 20-30 µCi [³²P]-dATP und 3 U Klenow-Fragment zugegeben. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 4 h bei 37°C oder ü.N. bei 30°C durchgeführt. Die Effektivität des Einbaus der Radioaktivität wurde durch eine TCA-Fällung eines Aliquots des Ansatzes überprüft. Hierzu wurden 1,5 µl des Reaktionsansatzes mit 100 µl ddH₂O, 50 µg Heringsperma-DNA und 150 µl 10% (v/v) TCA gemischt. Dieser Ansatz wurde 1-2 min bei RT inkubiert und anschließend für 14 min bei 1500 g zentrifugiert. Ein Vergleich der Aktivitäten in Sediment und Überstand ließ eine prozentuale Abschätzung des Einbaus von [³²P]-dATP zu. Die Aufreinigung der DNA-Sonde zur Entfernung von nicht eingebautem [³²P]-dATP erfolgte über eine Microspin S-200 HR Säule von Pharmacia (Freiburg) entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.2.2.4 DNA-Transfer auf Nylonmembranen und Hybridisierung (Southern-Hybridisierung)

DNA-Fragmente, die in Agarosegelen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden, können auf Nylonmembranen übertragen werden, von der sie irreversibel gebunden werden. Der Transfer wird durch einen Flüssigkeitsstrom senkrecht zur Geloberfläche bewerkstelligt. Durch Hybridisierung mit markierten Sonden können dann spezifische DNA-Fragmente nachgewiesen werden.

Der Transfer der Nukleinsäurefragmente erfolgte hier nach Southern (1974) in alkalischer Lösung (0,4 N NaOH) auf eine positiv-geladenene Nylonmembran (Boehringer, Mannheim). Im Anschluß an den Transfer wurde die Nylonmembran in 2 x SSC gewaschen und konnte nun hybridisiert werden.

Hybridisierungen mit DIG-markierten Sonden:

Hybridisierungspuffer:

5x	SSC
5x	Denhardt's Lösung
5,0% (w/v)	Blocking-Reagenz
0,1% (v/v)	N-Lauroylsarcosin
0,02% (w/v)	SDS
50% (v/v)	Formamid
40 µg/ml	Kalbthymus-DNA

Alkalische-Phosphatase-Puffer:

100 mM	Tris
100 mM	NaCl
50 mM	MgCl ₂
	pH 9,5 mit HCl

BCIP-Lösung:

5% (w/v)	BCIP in
100%	DMF

NBT-Lösung:

5% (w/v)	NBT in
70% (v/v)	DMF

Die Hybridisierungstemperatur lag zwischen 37-42°C (meist 39°C). Die Membranen wurden für 2 h bei entsprechender Temperatur prähybridisiert (d.h. restliche Bindungsstellen der Membran für DNA wurden abgedeckt) und anschließend 16 h mit einer DIG-markierten Sonde inkubiert. Pro 50 ml Hybridisierungslösung wurden 10 µl aufgereinigte Sonde eingesetzt. Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, erfolgten Waschungen der Membranen für 2x 10 min in 2x SSC, 0,1% (w/v) SDS bei RT und anschließend 2x für 15 min bei 65-68°C in 0,5x SSC, 0,1% (w/v) SDS. Die weitere Entwicklung wurde entsprechend

den Angaben des Herstellers mit Anti-DIG-AP-Fab-Fragmenten durchgeführt. Der Farbnachweis erfolgte durch Inkubation mit BCIP/NBT (35 µl BCIP-Lösung, 45 µl NBT-Lösung in 10 ml AP-Puffer). NBT dient als Substrat der alkalischen Phosphatase und wird zum schwerlöslichen Formazan reduziert. DNA-Fragmente, die mit markierten Sonden hybridisierten, werden so durch das violette Formazan angefärbt. Durch Ausdünnen des Substrates in ddH₂O wurde die Reaktion abgestoppt.

Hybridisierungen mit radioaktiv-markierten Sonden:

Hybridisierungspuffer:

1,0 mM EDTA
0,5 M NaPi; pH 7,2
7 % (w/v) SDS

Prähybridisierungen für 2 h und Hybridisierungen für 16 h wurden bei 65°C in einem Drehrollofen durchgeführt (Church und Gilbert, 1984). Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die Membranen nach folgendem Protokoll gewaschen:

6x SSC, 0,5% SDS	5 min	RT
4x SSC, 0,5% SDS	5 min	RT
2x SSC; 0,5% SDS	5 min	RT
2x SSC, 0,5% SDS	15 min	65°C

Für stringente Bedingungen wurde die SSC-Konzentration in weiteren Waschschritten bei 65°C bis zu 0,1x SSC reduziert.

Die Membranen wurden über Nacht auf einem Storage Phosphor Screen von Kodak exponiert und das Ergebnis am folgenden Tag mit Hilfe des Phospho-Imager Storm 860 von Molecular Dynamics (Krefeld) dokumentiert. Die Auswertung erfolgte an einem Macintosh Power PC mit dem Computerprogramm Image Quant (Version 1.2).

2.2.2.5 Durchsuchen einer cDNA-Bank von *Pinus*

Das Durchmusteren einer cDNA-Bank von *Pinus* erfolgte wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben.

Der Transfer der Phagen-DNA erfolgte auf Nitrozellulosemembranen von Schleicher und Schuell (Dassel). Phagenplaques, die in einer primären Durchmusterung ein positives Hybridisierungssignal zeigten, wurden durch zweimaliges Replattieren vereinzelt.

Die Hybridisierung der Membranen wurden mit DIG-markierten DNA-Sonden (s. 2.2.2.3) durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur lag unter stringenten Bedingungen bei 40°C. Die Membranen wurden im Anschluß an die Hybridisierung zweimal 5 min in 2x SSC, 0,1% (w/v) SDS bei RT gewaschen. Daran schlossen sich zwei Waschschrte für jeweils 10 min bei 68°C in 0,5x SSC, 0,1% (w/v) SDS an. Für weniger stringente Bedingungen wurden die Membranen bei 37°C hybridisiert und die abschließenden Waschungen erfolgten bei 65°C.

Die Entwicklung der hybridisierten Nitrozellulosemembranen erfolgte mit Hilfe von Anti-DIG-AP-Fab-Fragmenten von Boehringer (Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers. Als Substrat für die alkalische Phosphatase dienten BCIP und NBT (s. 2.2.2.4). Die Reaktion wurde durch Überführen der Membran in ddH₂O abgestoppt

2.2.2.6 Kolonietransfer auf Nylonmembranen und Hybridisierung

Denaturierungslösung:

0,5 N NaOH
1,5 m NaCl

Neutralisierungslösung:

1 M Tris/HCl pH 7,5
1,5 M NaCl

PCR-Amplifikationen mit Gesamt-DNA führten bei instringenter Hybridisierung mit degenerierten Oligonukleotiden zu einem Gemisch von DNA-Fragmenten der Phytochromgenfamilie. So wurde im Anschluß an die PCR-Amplifikationen der Reaktionsansatz elektrophoretisch in einem nativen Agarosegel aufgetrennt und DNA-Fragmente mit einer Größe von etwa 650 bp aus dem Gel eluiert. Die Amplifikate wurden in den Klonierungsvektor pGEM-T easy von Promega (Mannheim) ligiert. 3 µl des Ligationsansatzes wurden für die Transformation kompetenter *E. coli* XL1 Blue-Zellen verwendet. Die erhaltenen Klone wurden mit Hilfe einer Strichmustervorlage auf Selektionsmedium (LB-Agar + 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und ü. N. bei 37°C inkubiert. Diese Kolonien wurden auf ungeladene Nylonmembranen von Qiagen (Hilden) transferiert. Dazu wurden die ü.N. gewachsenen Kolonien auf 4°C abgekühlt. Die Nylonmembran wurde luftblasenfrei für 1-2 min auf die Kolonien aufgelegt. Wurde dies mit

einer neuen Membran wiederholt, so verlängerte sich die Inkubation auf 3 min. Der Filter wurde vorsichtig heruntergezogen und kurz getrocknet. Nun wurde der Filter (mit der Seite an der die Bakterien gebunden, waren nach oben weisend) 15 min in Denaturierungslösung gelegt, anschließend für 15 min in Neutralisierungslösung und abschließend 10 min in 2x SSC geschwenkt. Es schloß sich eine zweiminütige UV-Fixierung (350 nm) der DNA auf den Nylonmembranen an. Die Membranen wurden für 1 h bei 37 °C mit Proteinase K (2 mg/ml) in 2x SSC behandelt. Danach wurden Zellreste, die nach dieser Behandlung an der Membran gebunden waren, mit feuchtem Filterpapier abgewischt. Die so erhaltenen Membranen konnten getrocknet aufbewahrt werden oder nach Anfeuchten mit 2x SSC prähybridisiert und mit einer spezifischen Sonde inkubiert werden (s. 2.2.2.4).

2.2.2.7 Spaltung von Gesamt-DNA aus Pflanzen mit Restriktionsendonukleasen

Für genomische Southern-Blot-Analysen wurden 15-30 µg Gesamt-DNA in einem Gesamtvolumen von 300 µl enzymatisch geschnitten. Pro µg Gesamt-DNA wurden 10 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Die DNA wurde für 10 min in dem für das jeweilige Enzym spezifischen Puffer bei 37°C präinkubiert. Anschließend wurde das Restriktionsenzym zugegeben und der Reaktionsansatz bei 37°C ü.N. inkubiert. Es erfolgte eine Fällung der DNA durch Zugabe von 30 µl 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 750 µl absolutem Ethanol bei -20°C für 30 min. Durch Zentrifugation bei 4°C und 18000 g für 30 min wurde die DNA sedimentiert, mit 80%igem (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Dann wurden erneut 40 µl 1x Restriktionspuffer/ddH₂O zugegeben und die DNA über mehrere Stunden bei 4°C gelöst. Um eine komplette Spaltung der Gesamt-DNA sicherzustellen, wurde ein zweiter Restriktionsverdau mit diesem Ansatz durchgeführt (5 U Restriktionsenzym pro µg DNA, Gesamtvolumen von 50 µl, 5 h, 37°C). Nach der Denaturierung des Ansatzes für 10 min bei 65°C wurde der komplette Ansatz auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und ü.N. bei 35 V (5V/cm) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Depurinierung erfolgte durch 10 minütige Inkubation des Agarosegels in 1%iger (v/v) HCl-Lösung. Diese Reaktion wurde durch Schwenken des Agarosegels in ddH₂O abgestoppt. Die aufgetrennte Gesamt-DNA wurde wie unter 2.2.2.4 beschrieben durch Kapillarkraft-getriebenen Aufwärtstransfer in 0,4 N NaOH auf positive Nylonmembran von Boehringer (Mannheim) übertragen. Es schloß sich eine Hybridisierung der Membran mit radioaktiv markierten DNA-Sonden an (s. 2.2.2.4).

2.2.2.8 Nukleinsäure-Sequenzierungen

Generell basieren die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen von DNA auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977). Bei dieser Methode kommt es durch Verwendung von ddNTP's zu zufälligen Abbrüchen der von einer Polymerase am Primer verlängerten Stränge. Wir benutzten zur Strangverlängerung PCR-Amplifikationen. Je nach Sequenziermethode wird für jedes ddNTP eine separate PCR-Amplifikation durchgeführt oder es werden in einer PCR-Amplifikation ddNTP's eingesetzt, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und automatisch von einem Fluoreszenz-Detektiersystem eingelesen werden können.

Zu Beginn dieser Arbeit erfolgten Sequenzierungen mit dem Silver SequenceTM-Kit von Promega (Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers. Hier wurden pro Sequenzieransatz vier PCR-Amplifikationen mit entsprechenden ddNTP's durchgeführt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden in einem denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt, durch Silbernitrat angefärbt und ‚von Hand‘ gelesen.

Die automatische DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyser der Firma Perkin Elmer (Weiterstadt). Die PCR-Amplifikation wurde entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem ABI PRISMTMDYE TERMINATOR Cycle Sequencing Ready Reaction KIT SF von Perkin Elmer (Weiterstadt) durchgeführt. In Abhängigkeit von der Länge des zu sequenzierenden DNA-Fragmentes wurden 1-2 µg gereinigte Plasmid-DNA als Matrize für die PCR verwendet.

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgt durch Elektrophorese in einer Kapillare. Die markierten DNA-Fragmente passieren ein Sichtfenster und werden von einem Argonlaser zur Aussendung von Fluoreszenzstrahlung angeregt. Diese Lichtsignale werden in digitalisierter Form auf einen Power PC Macintosh Computer übertragen und gespeichert. Die Korrekturlesung erfolgte von Hand mit Hilfe des Programms Edit View (Version 1.0).

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Extraktion von Anthocyanen

7 Tage alte Keimlinge von *Pinus* wurden einzeln gewogen und in 1,2 ml angesäuertem Methanol (0,3% HCl v/v) für 24 h bei RT unter Lichtausschluß schüttelnd inkubiert. Nun wurden 0,9 ml ddH₂O und 2,4 ml Chloroform zugegeben und eine Zweiphasenextraktion durchgeführt. Die Proben wurden bei 2000 g 30 min zentrifugiert. Die Absorption der

Oberphase wurde bei 535 nm spektrophotometrisch gemessen. Die relativen Anthocyanengehalte wurden auf das Frischgewicht bezogen (Folch *et al.* 1957).

2.2.3.2 Extraktion von Chlorophyll *a* und *b*

7 Tage alte Keimlinge von *Pinus* wurden einzeln gewogen und in 2 ml DMSO 12 h in Dunkelheit bei RT geschüttelt. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 65°C. Nach Abkühlung auf 20°C wurden die Absorptionen bei 649 nm und 665 nm gemessen. Die Menge von Chlorophyll *a* und *b* wurde nach Lichtenthaler und Wellburn (1983) für Ethanol bestimmt und auf das Frischgewicht bezogen (Kerckhoff 1996, Dissertation Universität Wageningen).

2.2.3.3 Herstellung von Proteinrohextrakten

Rohextraktpuffer (REP):

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
50 mM	-Mercaptoethanol

2x SDS-Probenpuffer:

125 mM	Tris-H ₂ SO ₄ pH 6,8
20% (w/v)	Glycerin
4,0% (w/v)	SDS
3,0% (w/v)	DTT
0,002% (w/v)	Bromphenolblau

Frisch geerntetes Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Mörser unter steter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Das gemörserte Pflanzenmaterial wurde 1:2 (w/v) mit REP versetzt und 5 min bei 18000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 1:2 (v/v) SDS-Probenpuffer zugegeben. Bevor die Rohextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte eine Denaturierung der Proben für 5 min bei 95°C.

2.2.3.4 Phenolische Extraktion von Gesamtprotein aus Pflanzen

Extraktionslösung:

2 M Saccharose
50 mM Tris/HCl pH 8,0
5 mM EDTA
5 mM DDT

Fällungslösung:

15 mM NH₄-Acetat
5 mM DTT
in Methanol

Hochkonzentrierte und durch proteolytischen Abbau kaum beeinträchtigte Gesamtproteinextrakte aus Pflanzen wurden durch eine phenolische Aufarbeitung von Frischmaterial gewonnen (Dr. Weber, pers. Mitteilung).

Es wurden 100-200 mg Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu Pulver zerstoßen. Das gemörserte Pflanzenmaterial wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 750 µl Tris-äquilibriertes Phenol mit 5 mM DTT hinzugegeben und kräftig geschüttelt.

Anschließend erfolgte eine Extraktion durch Zugabe von 750 µl Extraktionslösung und eine Phasentrennung durch Zentrifugation bei 18000 g für 5 min. Die phenolische Oberphase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 3 Vol. Fällungslösung wurden die Proteine gefällt. Die Proteine wurden durch eine Zentrifugation bei 18000 g für 5 min sedimentiert und anschließend zweimal in 75% (v/v) Ethanol mit 5 mM DTT gewaschen. Um restliches Ethanol zu entfernen, wurden die Proben kurz getrocknet. Abschließend wurden die Proben in 50-100 µl 2x Probenpuffer aufgenommen. So gewonnene hochkonzentrierte Gesamtproteinextrakte aus Pflanzen konnten bis zu zwei Monate bei -20°C gelagert werden.

2.2.3.5 Phenolische Extraktion von Gesamtprotein aus *E. coli*

Von einer 5 ml ü.N.-Kultur von *E. coli* wurde 1 ml abgenommen und die enthaltenen Zellen durch Zentrifugation bei 10000 g sedimentiert. Das Sediment wurde in 350 µl ddH₂O resuspendiert und es wurde 350 µl Phenol (pH 7,5) zugegeben. Das Gemisch wurde 3 min geschüttelt und anschließend wurden die beiden Phasen durch eine Zentrifugation für 5 min bei 18000 g und RT getrennt. Die untere, phenolische Phase wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 875 µl absolutem Ethanol mit 20 mM NH₄-Acetat wurden die Proteine gefällt und durch eine Zentrifugation für 20 min bei 18000 g sowie 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal mit 75% (v/v) Ethanol gewaschen. Nachdem das Ethanol verdunstet war konnten die Proteine in 100 µl 2x Probenpuffer aufgenommen werden.

2.2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Färbelösung:

0,5% (w/v) Amidoschwarz

90% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

90% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

Um die Spuren eines SDS-PAGE mit vergleichbaren Mengen Gesamtprotein zu beladen, wurde die Konzentration von Proteinextrakten in 2x SDS-Probenpuffer nach Neuhoff *et al.* (1979) ermittelt.

Es wurden 2-10 µl der Proben auf SM 11200 Cellulose-Acetat-Membranen von Satorius (Göttingen) aufgetragen. Die Färbung der Proteine erfolgte durch eine 2 minütige Inkubation der Membran in der Färbelösung, die Entfärbung durch dreimalige Inkubation in frischer Entfärbelösung für jeweils 5 min. Die Cellulose-Acetat-Membranen wurden, nachdem der Hauptteil der Flüssigkeit verflüchtigt war, in Reagenzgläser gegeben und mit 1 ml DMSO bedeckt. Diese Ansätze wurden geschüttelt bis die Membranen sich vollständig aufgelöst hatten, was nach etwa 15-20 min der Fall war. Abschließend wurde die Absorption dieser Lösungen spektrophotometrisch bei 630 nm gemessen. Durch Vergleich mit einer zuvor aufgestellten Eichkurve konnten Proteinmengen zwischen 0,5 und 20 µg bestimmt werden. Pro Proteinextrakt wurden mindestens zwei Parallelmessungen durchgeführt.

2.2.3.7 SDS-PAGE von Proteinen nach Laemmli (1970)

Acrylamid-/Bisacrylamidstammlösung:

30% (w/v) Acrylamid

0,8% (w/v) Bisacrylamid

4x Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

4% (w/v) SDS

4x Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris/H₂SO₄ pH 6,8

10x Elektrodenpuffer:

250 mM Tris

192 mM Glycin

0,5% (w/v) SDS

Sammelgel:

4,5% (w/v) Acrylamid
0,12% (w/v) Bisacrylamid
0,03% (w/v) APS
0,13% (v/v) TEMED
in 1x Sammelgelpuffer

Trenngel:

12,5% (w/v) Acrylamid
0,33% (w/v) Bisacrylamid
0,05% (w/v) APS
0,05% (v/v) TEMED
in 1x Trenngelpuffer

Durch SDS denaturierte Proteingemische wurden in Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli 1970). Die Proben wurden in einem 4,5%igen Sammelgel, pH 6,8, fokussiert und in 8-12,5%igen Trenngelen, pH 8,8, aufgetrennt. Es wurde die Gelapparatur Mini Protean II von Bio-Rad (München) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel.

2.2.3.8 Färbung von Proteinen durch Coomassie Brilliant Blue

Färbelösung:

0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue
80% (v/v) Methanol

Fixierlösung:

20% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

10% (v/v) Essigsäure
50% (v/v) Methanol

Proteine wurden im Anschluß an eine elektrophoretische Auftrennung mit Coomassie Brilliant Blue von Serva (Heidelberg) nach Weber und Osborne (1969) in PAA-Gelen in einem Schritt fixiert und gefärbt. Hierfür wurden Färbelösung und Fixierlösung vor der Verwendung im Verhältnis 1:2 (v/v) gemischt. Das PAA-Gel wurde in dieser Lösung in Abhängigkeit von seiner Dicke 20 min bis 1 h geschwenkt. Anschließend wurde der nicht an Proteine gebundene Farbstoff durch wiederholtes Waschen des Gels mit Entfärbelösung entfernt. So wurde der Farbstoff aus den Gelteilen gelöst, die keine Proteine enthalten, und die Proteine wurden sichtbar.

Präparative PAA-Gele für die Gewinnung von reinem Protein, das für die Immunisierung von Kaninchen verwendet wurde, wurden in 0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue in ddH₂O gefärbt und in ddH₂O entfärbt ohne gleichzeitig fixiert zu werden. Die auf diese Weise lokalisierte Proteinbande wurde ausgeschnitten.

Zur Dokumentation wurden PAA-Gele fotografiert oder zwischen zwei Cellophanfolien gespannt und auf einer Glasplatte für 2-3 Tage getrocknet.

2.2.3.9 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Blot)

Blotpuffer:

25 mM	Tris
187 mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol

Im Anschluß an eine SDS-PAGE wurden Proteine durch elektrischen Transfer auf Nitrozellulosemembranen immobilisiert und einer immunologischen Detektion zugänglich gemacht. Der Transfer erfolgte in 4°C kaltem Blotpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA für 1-2 h. Es wurde die Mini Trans-Blot Cell Apparatur von Bio-Rad (München) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.2.3.10 Färbung von Proteinen durch Ponceau S

Ponceau S Lösung:

0,5% (w/v)	Ponceau S Reagenz in
1% (v/v)	Essigsäure

Proteine, die an Nitrozellulosemembranen gebunden vorlagen, wurden reversibel durch Ponceau S angefärbt. Die Membran wurde 2 min in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mit ddH₂O gespült. Die Entfärbung der Proteine erfolgte in 1x PBS.

2.2.3.11 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

PBT:

0,05% (v/v) Tween 20
1% (w/v) BSA
in 1x PBS

Im Anschluß an einen Elektrotransfer der Proteine wurden restliche Bindungsstellen der Nitrozellulosemembranen für mindestens 1 h in Blotto, das sind 5% (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS, abgesättigt. Nach Abspülen der Membranen in 1x PBS erfolgte die Inkubation in primärer AK-Lösung in PBT für 1,5 h bei leichtem Schütteln eingeschweißt in kleine Plastikbeutel minimalen Volumens. Anschließend wurden die Membranen 3x je 15 min in PBST (0,1% (v/v) Triton X 100 in 1x PBS) gewaschen und danach kurz mit PBS abgespült. Die Inkubation mit sekundärer AK-Lösung glich der mit dem primären AK. Der Titer des AK wurde entsprechend der Angaben des Herstellers gewählt. Bei den sekundären Antikörpern handelte es sich um Ziege Anti-Kaninchen bzw. Ziege Anti-Maus IgG von Serva (Heidelberg), die an eine alkalische Phosphatase gekoppelt vorlagen. Wieder wurden die Membranen nach der Inkubation in sekundärem Antikörper 3x für 15 min in PBST gewaschen und mit PBS abgespült. Zur Umpufferung wurden die Membranen 5 min in AP-Puffer geschwenkt. Die Färbereaktion erfolgte durch Inkubation in Substratlösung (35 µl BCIP-Lösung, 45 µl NBT-Lösung in 10 ml AP-Puffer, s. 2.2.2.4). Die Reaktion wurde in ddH₂O abgestoppt.

2.2.3.12 Anreicherung von heterolog hergestellten Proteinen

Lysozypuffer:

50mM NaH₂PO₄ pH 8,0
300 mM NaCl
1 mg/ml Lysozym

TBS:

150 mM NaCl
20 mM Tris/HCl pH 7,9

Lysispuffer:

8 M Harnstoff
100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris/HCl pH 8,0

Die Anreicherung von heterolog hergestelltem Protein wurde in Anlehnung an die Methode von Fischer *et al.* (1992) durchgeführt. Die überexprimierten Fusionsproteine lagen in *E. coli*

in denaturierter Form innerhalb von Inklusionskörpern vor, die nach folgendem Protokoll angereichert werden konnten.

Sedimentierte *E. coli*-Zellen einer Expressionskultur, wie unter 2.2.1.3 beschrieben, wurden zweimal in 50 mM Tris/HCl gewaschen (8000 g, 10 min, 4°C). Die Zellen wurden nun in Lysozypuffer (10% des Ausgangsvolumens) für 30 min bei 4°C inkubiert. Es folgten anschließend bis zu 7 Zyklen Ultraschallbehandlungen mit Hilfe eines Bransson Sonifier 250. Durch 10 min Zentrifugation bei 8000 g und 4°C wurden die Zellfragmente und Inklusionskörper sedimentiert. Das Sediment wurde wiederholt in TBS gewaschen wobei die Zentrifugalkräfte in jedem Sedimentationsschritt bis zu 5000 g reduziert wurden. Die gereinigten Inklusionskörper wurden in 100-200 µl Lysispuffer aufgenommen und bei leichtem Schütteln für 30-60 min bei RT inkubiert, mindestens bis das Sediment vollständig gelöst war. Im Anschluß an eine Bestimmung der Proteinmenge nach Neuhoff *et al.* (1979) (s. 2.2.3.6) folgte eine präparative SDS-PAGE.

2.2.3.13 Herstellung von polyklonalen Antiseren

Die Produktion der Antiseren wurde von der Firma Biogenes (Berlin) durchgeführt. Pro Antigen wurden zwei Kaninchen immunisiert. Das Antigen lag in ausgeschnittenen PAA-Gelstreifen vor oder gebunden an Nitrozellulosemembranen und wurde Trägergebunden injiziert. Nach vier Wochen wurden jedem Kaninchen 20 ml Antiserum entnommen. Die Seren wurden gegen Gesamtprotein aus *E. coli* absorbiert.

2.2.3.14 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Glycinpuffer:

5 mM Glycin
0,5 M NaCl
pH 2,8 und pH 2,0

Zur Affinitätsreinigung der erhaltenen Antiseren wurde eine präparative SDS-PAGE mit 100-1000 µg Antigen durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrozellulose übertragen und mit Ponceau S angefärbt. Der Teil der Membran, der das immobilisierte Antigen trug, wurde aus der Membran ausgeschnitten und für mindestens 1 h in Blockierungslösung (PBS mit 0,5 % (w/v) Casein) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranstücke mit 1-5 ml Antiserum für 3 h bei RT oder ü.N. bei 4°C. Danach wurde das Antiserum abgenommen und bei 4°C gelagert. Die Membranen wurden 5 mal für 2 min mit Blockierungspuffer gewaschen und mit ddH₂O abgespült. Die Elution der

vom Antigen spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte durch Inkubation der Membranstücke in 1 ml Glycinpuffer (pH 2,8) für 3 min auf einem Rotationsschüttler (300 rpm) bei 4 °C. Im Anschluß wurde das Eluat mit 100 µl 1 M Tris/HCl (pH 8,5) neutralisiert, mit 2 µl 10% (w/v) BSA stabilisiert und bei 4°C gelagert. Eine zweite Elution der Antikörper wurde mit 1 ml Glycinpuffer (pH 2,0) unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Membranen wurden nun mit ddH₂O abgespült und 3 mal für 2 min in Blockierungspuffer gewaschen. Anschließend wurde das zu Beginn abgenommene Antiserum erneut mit den gleichen Membranen inkubiert.

Die beschriebenen Inkubationen und Elutionen wurden bis zu 8 mal wiederholt. Nach 5-6 Zyklen wurde das verwendete Antiserum durch einen Western-Blot, auf dem das Antigen immobilisiert vorlag, überprüft. So wurde kontrolliert, ob die spezifischen Antikörper komplett aus dem Serum entfernt worden waren. Wenn in dem verwendeten Serum keine Antikörper mehr nachgewiesen werden konnten, wurden die Eluate der einzelnen Zyklen, deren Glycinpuffer den gleichen pH-Wert hatte, vereinigt. Mit Mikrokonzentrationsgefäßen Centricon YM-30 (Millipore, Eschborn) wurden die vereinigten Eluate auf ein Volumen von etwa 500 µl eingengt. Die aufgereinigten Antikörper wurden in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.4 Phylogenetische Analysen

Molekulare Sequenzen haben phylogenetischen Analysen neue Möglichkeiten eröffnet. Mehr und mehr können Klassifikationen, die auf den Ähnlichkeiten morphologischer und ontogenetischer Merkmale beruhen, durch den Vergleich von Aminosäuren- und Nukleotidsequenzen ergänzt und korrigiert werden. Beim Fehlen einer ausreichenden Anzahl an morphologischen, physiologischen und biochemischen Merkmalen sind sie die einzige Möglichkeit phylogenetische Zusammenhänge abzuleiten.

2.2.4.1 Datenerfassung und Erstellung des Alignments

Von allen hier mitgeteilten Sequenzen wurde der kodierende und nicht-kodierende DNA-Strang sequenziert. Das Programmpaket Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, das vom Rechenzentrum der Universität Köln zur Verfügung gestellt wird, erleichterte die Handhabung dieser Daten.

Ihre Anordnung nach der größten Anzahl übereinstimmender Charaktere (Alignment) leistete das Programm Pileup im GCG-Programmpaket. Das erstellte Alignment wurde manuell korrigiert.

2.2.4.2 Phylogenetische Sequenzanalysen von Phytochromgenen

Für die Bearbeitung der Nukleinsäurealignments wurden drei verschiedene phylogenetische Analysemethoden verwendet:

Distanz-Matrix-Methode:

Diese Methode basiert auf der Ermittlung von prozentualen Übereinstimmungen bzw. Abweichungen zweier Sequenzen, die in eine evolutionäre Distanz für dieses Sequenzpaar umgeschrieben werden. Abhängig von dem verwendeten Algorithmus können Transitionsereignisse und Transversionsereignisse unterschiedlich gewichtet werden (z.B. Kimura-2-Parameter-Modell: Verhältnis Transitionen zu Transversionen = 2; Jukes-Cantor-Modell: Verhältnis Transitionen zu Transversionen = 1). Die Distanzberechnungen erfolgten mit dem Programm DNAdist im Phylip-Programmpaket 3.5c (Felsenstein 1993).

Aus den errechneten Distanzen wurden Stammbäume mit Hilfe des Neighbor-Joining-Algorithmus nach Saitou und Nei (1987) erstellt. Die Baumkonstruktion wurde mit den Programmen Neighbor und Drawgram in Phylip 3.5c ausgeführt. Distanzanalysen, bei denen konstante Charaktere des Alignments ausgeschlossen wurden, konnten im Programmpaket PAUP* 4.03 (Swofford 1999) mit den gleichen Algorithmen durchgeführt werden.

Parsimony-Methode:

Nach Hennig (1966) geht die Evolution geizig bzw. sparsam mit Parallellismen, Reversionen und Konvergenzen um. Parsimony-Analysen basieren daher auf der Annahme, daß die geringste Anzahl evolutiver Schritte, die benötigt werden um einen phylogenetischen Stammbaum zu berechnen, die wahrscheinlichste ist (parsimonious = engl.: geizig). Maximum-Parsimony-Analysen wurden mit PAUP* 4.03 (Swofford 1999) durchgeführt unter Ausschluß von konstanten und Parsimony-uninformativen Charakteren. Es wurden heuristische Suchen mit der Option ‚branch-swapping: tree bisection-reconnection (TBR)‘ und der Option ‚save all minimal trees (MULPARS)‘ durchgeführt.

Um die Wahrscheinlichkeiten der erhaltenen Stammbaumtopologien statistisch erfassen zu können, wurden Bootstrap-Analysen von Distanz- und Parsimony-Berechnungen durchgeführt (Felsenstein 1985). Für diese Methode werden aus dem vorliegenden Datensatz 100 neue Datensätze erzeugt, indem zufällig Teilbereiche ausgeschlossen werden, wohingegen andere doppelt oder mehrfach verrechnet werden. So kann für jede monophyletische Gruppe (jeden ‚Ast‘) eines Stammbaumes ein Bootstrapwert angegeben werden, der anzeigt, wie oft diese Gruppierung während der Bootstrap-Analyse auftrat. Bootstrapwerte 95% gelten als signifikant, wohingegen Werte 50% keine Berücksichtigung finden. Bootstrap-Analysen

konnten sowohl in Phylip 3.5c mit dem Programm SEQboot als auch in PAUP* 4.03 durchgeführt werden.

Maximum-Likelihood-Methode:

Die Maximum-Likelihood-Methode (Felsenstein 1981, Kishino und Hasegawa 1989) ermittelt die Wahrscheinlichkeit einer Stammbaumtopologie, die mit Hilfe eines phylogenetischen Modells, z.B. Kimura-2-Parameter-Algorithmus, erhalten wurde. Durch Variation der Topologie des Stammbaums wird die höchstmögliche Wahrscheinlichkeit angestrebt. Maximum-Likelihood-Berechnungen sind aufgrund des zugrundeliegenden Algorithmus sehr zeitaufwendig und daher Bootstrap-Analysen nur bei kleinen Datensätzen durchführbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Maximum-Likelihood-Analysen mit dem Programm DNAML im Programmpaket Phylip 3.5c durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Lichtabhängige Reaktionen in *Pinus sylvestris*

Über die Wirkungen von Phytochromen in Gymnospermen ist wenig bekannt. Doch Phänomene wie das gesteigerte Streckungswachstum des Hypokotyls von dunkelgewachsenen *Pinus*-Keimlingen im Vergleich zu lichtgewachsenen (Fernbach und Mohr 1990) sowie die lichtabhängige Regulation der Chlorophyllbiosynthese und der *lhcII*-Gene wurden bei einigen Gymnospermen (z.B. *Ginkgo biloba*, *Pseudotsuga menziesii*) beobachtet (Alosi und Neal 1992, Chinn und Silverthorne 1993, Mukai *et al.* 1992).

Einführend greift die vorliegende Arbeit einige durch Licht-/Dunkelexperimente bedingte Phänomene nochmals auf. Untersucht wurde: (1) die Streckung des Hypokotyls, (2) der Chlorophyllgehalt, (3) der Anthocyangehalt sowie (4) die Regulation von LHCII, CHS, RBCL, ALAD und -Amylase in licht- und dunkelgewachsenen Keimlingen von *Pinus*.

3.1.1 Phänotypische und biochemische Charakterisierung

Verglich man 7 Tage alte Keimlinge von *Pinus*, die im Licht-/Dunkelwechsel des Tages oder im Dauerdunkel gewachsen waren, so konnten lichtabhängige phänotypische und biochemische Unterschiede bonitiert werden (Abb. 3.1 und 3.2).

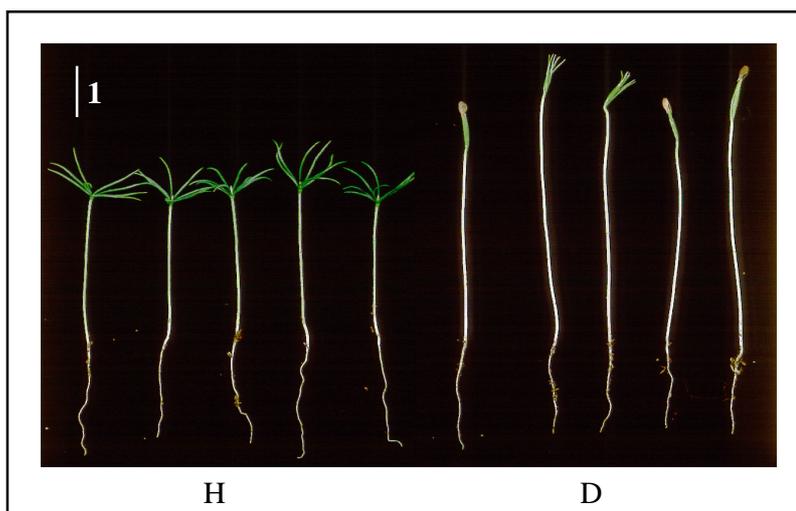


Abb. 3.1:

Gezeigt ist der Phänotyp von 7 Tage alten *Pinus*-Keimlingen, die im Hell-/Dunkelwechsel des Tages (H) bzw. in Dunkelheit (D) angezogen wurden.

Abbildung 3.1 zeigt den Phänotyp der untersuchten Keimlinge. Wie zu erkennen ist, sind auch dunkelgewachsene Keimlinge grün. Folglich ist *Pinus* in der Lage in Abwesenheit von Licht Chlorophyll zu synthetisieren, eine Tatsache die in den meisten angiospermen Pflanzen nicht beobachtet werden kann (für eine Zusammenfassung: Armstrong 1998). Es fällt weiterhin auf, daß das Hypokotyl dunkelgewachsener Keimlinge im Vergleich zu den im Tagesgang des Lichtes gewachsenen Keimlingen verlängert ist (Faktor 0,25) (Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Die Kotyledonen der lichtgewachsenen Keimlinge sind entfaltet, stärker pigmentiert und größer im Verhältnis zu dunkelgewachsenen Keimlingen.

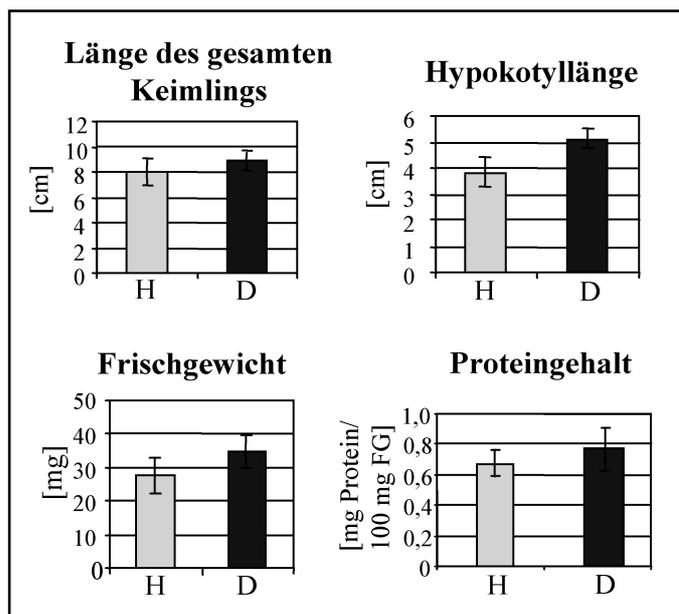


Abb. 3.2:

Phänotypische und biochemische Charakterisierung von 7 Tage alten *Pinus*-Keimlingen, die im Hell-/Dunkelwechsel des Tages (H) bzw. in Dunkelheit (D) angezogen wurden. Bestimmt wurde die Länge des gesamten Keimlings, die Hypokotyllänge, das Frischgewicht sowie die Gesamtproteinmenge bezogen auf das Frischgewicht. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Analyse von 10 Keimlingen.

Von Bedeutung für nachfolgende Untersuchungen waren v.a. Proteingehaltmessungen bezogen auf das Frischgewicht, da die Proteinmengen als Bezugsgröße für Immunoblotuntersuchungen verwendet werden sollten. Diese Messungen zeigten eine starke Schwankungsbreite, die eventuell auf die Heterogenität des Saatgutes zurückgeführt werden könnte. Außerdem variierten die Auflaufraten der ausgelegten Saatgutes extrem in Abhängigkeit vom Aussaatzeitpunkt. So wurden in Frühjahrsmonaten im Vergleich zu Wintermonaten wesentlich bessere Auflaufraten erreicht, obwohl die Anzuchtammer klimatisiert war und konstante Temperaturen hielt. Diese Beobachtung ließ sich sowohl für hell- als auch für dunkelausgelegtes Saatgut machen.

Aus den gemessenen Daten konnte festgehalten werden, daß der Proteingehalt bezogen auf das Frischgewicht in dunkelgewachsenen *Pinus* Keimlingen etwa 13% höher liegt, was jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung keinen signifikanten Unterschied darstellt.

3.1.2 Anthocyan- und Chlorophyllgehalte

Wie in Abb. 3.1 bereits erkennbar, haben dunkelgewachsene Keimlinge von *Pinus* grüne Kotyledonen. Der biochemische Nachweis ergab, daß der Chlorophyllgehalt in dunkelgewachsenen Keimlingen um etwa 50 % bezogen auf lichtgewachsene Keimlinge reduziert war (870 µg Chlorophyll *a/b* pro g FG im Licht i.V. zu 410 µg Chlorophyll*a/b* pro g FG in etiolierten Keimlingen) (Abb. 3.3). Bezieht man die Ergebnisse der Frischgewichtsbestimmung von licht- und dunkelgewachsenen *Pinus*-Keimlingen mit ein, so würde sich der beobachtete Effekt noch erhärten, da Dunkelkeimlinge im Verhältnis zu Lichtkeimlingen ein größeres Frischgewicht besaßen (etwa 20%). Somit kann für das Vorliegen von Chlorophyll *a* und *b* ein lichtabhängiger Unterschied beobachtet werden.

Vergleichbare Daten ließen sich auch für die untersuchten Anthocyanmengen ermitteln. Dunkelgewachsene Keimlinge enthalten etwa 80% der Anthocyanmenge von lichtgewachsenen Keimlingen (Abb. 3.3).

Folglich liegt in licht- und auch in dunkelgewachsenen Keimlingen von *Pinus* Chlorophyll- und Anthocyanbiosynthese vor, wobei in dunkelgewachsenen Keimlingen geringere Mengen Anthocyane (80% i. V. zu H) bzw. Chlorophylle (50% i. V. zu H) bestimmt werden konnten.

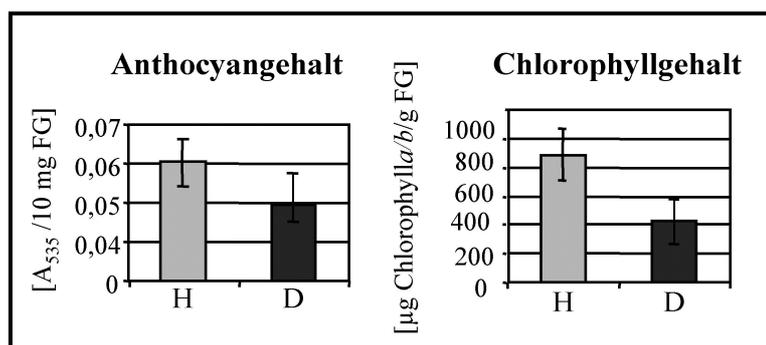


Abb. 3.3: Anthocyan- [A₅₃₅ / 10 mg FG] und Chlorophyllgehalte [µg Chlorophyll*a/b* / g FG] von 7 Tage alten *Pinus*-Keimlingen, die im Licht-/Dunkelwechsel des Tages (H) bzw. in Dunkelheit (D) angezogen wurden. FG: Frischgewicht. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Analyse von 10 Keimlingen.

Wie hier bei *Pinus* konnte auch für *Larix decidua* und *Picea abies* die Biosynthese von Chlorophyllen in dunkelgewachsenen Keimlingen nachgewiesen werden (Mariani *et al.* 1990). Diese Tatsache steht im Kontrast zu Beobachtungen in Angiospermen, deren Chlorophyll- und Anthocyanbiosynthese durch Licht drastischer induziert wird. In etiolierten angiospermen Keimlingen sind die mRNA-Gehalte von Komponenten des Photosyntheseapparates, des Anthocyanstoffwechsels und der Nitratassimilation im Vergleich zu lichtgewachsenen Keimlingen stark reduziert (für einen Überblick: Westhoff 1996).

3.1.3 Lichtabhängige Regulation von RBCL, LHCII, CHS, ALAD und β -Amylase in *Pinus*-Keimlingen auf Proteinebene

Dunkelgewachsene Keimlinge von angiospermen Pflanzen zeigen eine verringerte Expression von photosynthetischen Komponenten (z.B. LHCII, RBCS, RBCL) (für eine Zusammenfassung: Tobin und Silverthorne 1985), Enzymen des Anthocyanstoffwechsels (z.B. CHS) (Ehmann *et al.* 1991, Frommeyer *et al.* 1992), der Chlorophyllbiosynthese (z.B. ALAD) (Kaczor *et al.* 1994) und von stärkegradierenden Enzymen (z.B. β -Amylase) (Sharma und Schopfer 1987).

Mit heterologen polyklonalen Antikörpern (s. 2.1.11) wurde die lichtabhängige Regulation der α -Aminolaevulinsäure-Dehydratase (ALAD), der β -Amylase, der großen Untereinheit der Rubisco (RBCL), der Chlorophyll-*a/b*-bindenden Proteine des Photosystems II (LHCII) und Chalkonsynthase (CHS) in licht- (Tag-/Nacht-Rhythmus) und dunkelgewachsenen Keimlingen von *Pinus* untersucht.

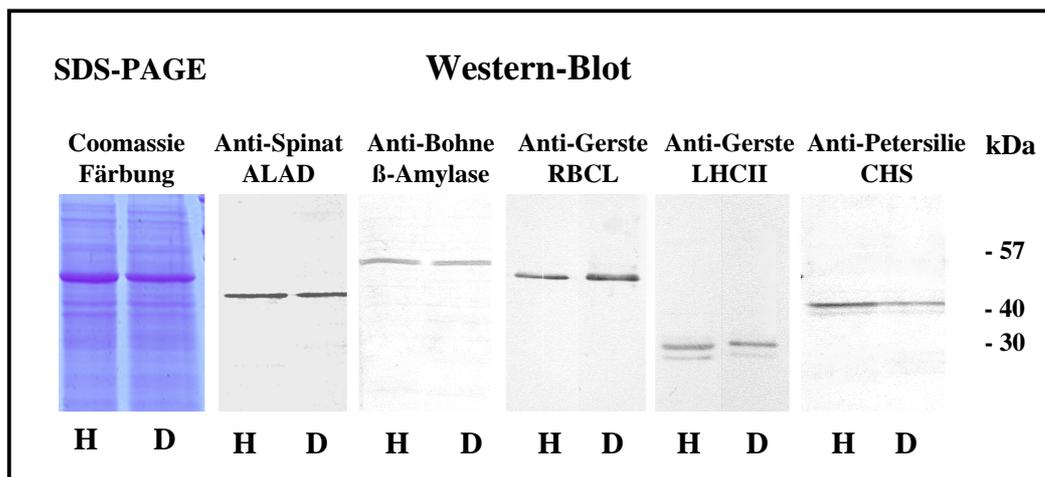


Abb. 3.4: Lichtabhängige Expression von ALAD, β -Amylase, RBCL, LHCII und CHS: Gesamtproteinextrakte von 7 Tage alten Keimlingen von *Pinus*, die in Dunkelheit (D) bzw. im Tag-/Nacht-Rhythmus (H) angezogen wurden. Die Proteinextrakte wurden mittels einer 10%igen SDS-Page aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Inkubation der Membranen erfolgte in den entsprechenden pkAK. Es wurden für D- und H- Proben gleiche Mengen Gesamtprotein aufgetragen. Die gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren wurde parallel mit einer Coomassie Färbung überprüft. (35 μ g Gesamtprotein für ALAD, β -Amylase, LHCII und CHS; 10 μ g Gesamtprotein für RBCL).

Die Immunoblotanalysen von licht- bzw. dunkelgewachsenen *Pinus*-Keimlingen zeigten, daß keine signifikante lichtabhängige Regulation für RBCL, ALAD, β -Amylase, CHS und LHCII erkennbar ist (Abb. 3.4). Die Analysen wurden dreimal mit unterschiedlichen Proteinextrakten wiederholt und für RBCL und LHCII wurden zudem Verdünnungsreihen der Proteinextrakte mit 100, 10, 1 und 0,1 μ g Gesamtprotein durchgeführt, um eine mögliche

Sättigung der Substratreaktion des Immunoblots ausschließen zu können (Daten nicht gezeigt). In keinem der Fälle konnte eine lichtabhängige Zunahme der untersuchten Proteine gefunden werden. Die Intensitäten der einzelnen Proteinbanden des Immunoblots wurden densitometrisch mit dem Programm NIH-Image bestimmt. Für RBCL, LHCII, β -Amylase, CHS und ALAD konnte keine Zunahme der Proteinmenge im Licht gemessen werden. Die detektierten Unterschiede befinden sich im Rahmen der angegebenen Schwankungsbreite dieses Messsystems.

Zusätzlich wurden für die untersuchten Proteine Kontrollen mit licht- und dunkelgezogenen Keimlingen von *Zea mays* durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es konnten eindeutige lichtabhängige Zunahmen der Apoproteine von ALAD, β -Amylase, LHCII, CHS, und RBCL nachgewiesen werden.

3.2 Phytochrome in *Pinus sylvestris*

In Gymnospermen konnten bisher zwei komplette Phytochromgene gefunden werden. Es wurde eine cDNA aus *Picea abies* sequenziert, die für ein Gen kodiert, das der *phyA*-Genlinie aus Angiospermen angehört (Clapham *et al.* 1999). In *Pinus* wurde eine Sequenz beschrieben, die größte Identität zu *phyB*-Phytochromen aus Angiospermen zeigt (64%) (Kolukisaoglu 1997, Schneider-Poetsch *et al.* 1998). Weitere Sequenzinformationen, v.a. auf der Basis von PCR-Amplifikationen genomischer DNA von *Picea*, deuten auf mindestens ein weiteres Phytochromgen in Gymnospermen hin (Thümmler und Dittrich 1995, Schneider-Poetsch *et al.* 1998, Clapham *et al.* 1999).

Da zu Beginn dieser Arbeit nur eine komplette Phytochromsequenz aus *Pinus* und Teilfragmente aus *Picea* bekannt waren, wurde nach weiteren möglichen Mitgliedern der Phytochromgenfamilie von *Pinus* gesucht.

3.2.1 PCR-Amplifikationen von Phytochromgenfragmenten aus genomischer DNA am Beispiel von *Pinus*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch das breite Amplifikationsspektrum der degenerierten Oligonukleotide SP-S/SP-A (s. 2.1.8) 84 Phytochromgenfragmente von Gymnospermen, Pteridophyten und Bryophyten amplifiziert, kloniert und sequenziert. Da im Verlauf der Arbeit für das Auffinden und die Identifizierung von *phy*-Sequenzen eine Standardprozedur entwickelt worden war, wird diese anhand der *phy*-Sequenzen von *Pinus* exemplarisch beschrieben. Sie gilt beispielhaft für alle bearbeiteten Spezies (Tab. 2.1 unter 2.1.1).

Mit Hilfe des SPS/SPA-Primerpaares (s. 2.1.8), die die konservierte DNA-Sequenz der Chromophorbindungsstelle von Phytochromgenen flankieren (AS 271-460 *Arabidopsis* PHYB), wurden PCR-Amplifikationen, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, durchgeführt. In die

PCR-Reaktion wurde 200 ng genomische DNA von *Pinus* eingesetzt. Die PCR wurde bei 48°C und 51°C Annealingtemperatur durchgeführt. Durch die Wahl niedriger Annealingtemperaturen sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, möglichst viele unterschiedliche Fragmente von *phy*-Genen zu amplifizieren, ohne dabei zu viele unspezifische Amplifikate zu erhalten. Die Annealingtemperaturen mußten daher für jede untersuchte Spezies getestet werden.

Ein Aliquot der Reaktionsansätze wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, um zu prüfen, ob DNA-Fragmente der erwarteten Größe vorlagen (Abb 3.5 A). Anschließend wurde ein weiteres Aliquot der PCR-Reaktion, die bei der niedrigsten verwendeten Annealingtemperatur noch spezifische DNA-Fragmente zeigte, mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Auswahl dieser Restriktionsendonukleasen beruhte auf der Kartierung von konservierten und variablen Restriktionsschnittstellen innerhalb bekannter Phytochromgene. So konnten Restriktionsendonukleasen ermittelt werden, die die Identifizierung von unterschiedlichen Phytochromgenen ermöglichen sollten. Die RFLP-Analysen wurden zumeist mit EcoRI, FokII, HaeII, HincII, HindIII, NcoI, PvuII und TaqI durchgeführt. Die PCR-Amplifikate der Reaktion bei 48°C Annealingtemperatur von *Pinus* wurden mit EcoRI, HaeII, HindIII und NcoI gespalten (Abb. 3.5 B), da bei diesem PCR-Ansatz eine intensivere spezifische Amplifikation im Vergleich zu der Reaktion bei 51°C stattgefunden hatte.

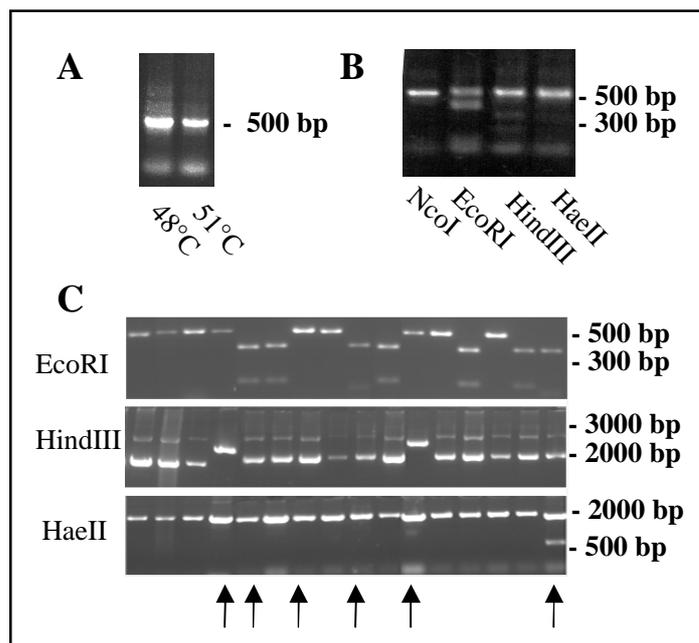


Abb. 3.5: Standardprozedur für das Auffinden und die Identifizierung von verschiedenen partialen *phy*-Sequenzen am Beispiel von *Pinus*.

A: PCR-Amplifikationen genomischer DNA von *Pinus* mit den Primern SPS/SPA bei 48°C und 51°C Annealingtemperatur. Es wurden 10 µl des Gesamtansatzes in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

B: Restriktionsspaltung von jeweils 5 µl des PCR-Ansatzes mit EcoRI, HaeII, HindIII und NcoI.

C: RFLP-Analyse der in pGEM-T easy klonierten PCR-Fragmente mit EcoRI, HindIII und HaeII. Die Pfeile markieren unterschiedliche Klone, die sequenziert wurden.

Die Aufspaltung der PCR-Produkte mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen in ungeschnittene und geschnittene Fragmente ließ darauf schließen, daß unter den Amplifikaten verschiedene Sequenzen vorlagen (Abb. 3.5 B).

Der Rest des PCR-Ansatzes wurde erneut in einem Agarosegel aufgetrennt, die DNA-Fragmente von etwa 600 bp Größe aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Die DNA-Fragmente wurden in pGEM-T easy ligiert und in *E. coli* (XL1-Blue) transformiert. Von den erfolgreich transformierten Klonen wurden zunächst 24 untersucht. Die Plasmid-DNA wurde mit EcoRI, HindIII und HaeII gespalten. Anhand des RFLP-Musters konnten sechs unterschiedliche Klone identifiziert werden (Abb. 3.5 C). Die Sequenzierung der Klone und ein anschließender Vergleich der Sequenzdaten gegen bekannte Phytochromgene zeigte, daß fünf verschiedene Phytochromgenfragmente vorlagen.

Wie phylogenetische Analysen (s. 3.3.2) bestätigen, weisen Identitäten von über 80% auf Sublinien bzw. Allele einer Phytochromgenlinie von Gymnospermen hin. Niedrigere Werte sprechen für unterschiedliche Genlinien (*phyO* und *phyP*: 68% Identität).

Drei Genfragmente zeigten geringe Identitäten zu *phyO* sowie Identitäten von 60-66% zu *phyP*. Sie wurden durch phylogenetische Analysen einer neuen Genlinie zugewiesen (s. 3.3.4). Eine dieser Sequenzen zeigt 74,7% Identität zu *phyO* und 62,9% Identität zu *phyP* (s. Tab. 3.1). Hier handelt es sich um eine bislang unbekannte Genlinie in Gymnospermen, die weiterhin mit *phyN* bezeichnet wird.

phyN-AL zeigt 94,9% Identität zu dem zuvor beschriebenen *phyN*-Fragment. Es handelt sich hier möglicherweise um ein Allel.

Ein weiteres Phytochrom-Genfragment mit hoher Ähnlichkeit zu *phyN* (87,6%) besitzt mehrere Stopcodons im wahrscheinlichen Leseraster (Position 106, 109, 436, 475, 481), so daß dieses Gen nicht in Volllänge translatiert wird. Offensichtlich handelt es sich um ein Pseudogen, bezeichnet mit *phyN*-PG.

Ein Fragment, hier mit *phyP*-AL bezeichnet, wurde sequenziert, das eine Identität von 86,2 % zu dem bereits bekannten *phyP* aus *Pinus* besitzt (Kolukisaoglu 1997, Schneider-Poetsch *et al.* 1998). Auch hier könnte es sich möglicherweise um ein Allel von *phyP* handeln, daß bereits aus einer cDNA-Bank von *Pinus* isoliert wurde.

Zudem wurde ein Fragment sequenziert, welches hohe Identität (93,9 %) zu *phyO* aus *Picea* besitzt (Accession-Nr.: U60264, Clapham *et al.* 1999). Der Unterschied zwischen diesen Sequenzen könnte auf gattungsspezifischen Variationen beruhen. Phylogenetische Analysen belegen, daß es sich um ein Genfragment der *phyO*-Genlinie handelt (s. 3.3.4 und 3.3.5), folglich um ein orthologes Gen zu *phyO* aus *Picea*.

In Tabelle 3.1 sind die prozentualen Identitäten auf Nukleotidebene der einzelnen Genfragmente zueinander dargestellt:

Tab. 3.1: Vergleich der partialen Phytochromgene von *Pinus* auf Nukleinsäureebene.

Angegeben sind die prozentualen Identitäten. AL: Allel, PG: Pseudogen

	<i>phyN</i>	<i>phyN-PG</i>	<i>phyN-AL</i>	<i>phyO</i>	<i>phyP</i>	<i>phyP-AL</i>	Länge [bp]
<i>phyN</i>		87,6	94,9	74,7	66,1	62,9	573
<i>phyN-PG</i>			87,4	67,6	60,5	57,7	564
<i>phyN-AL</i>				72,8	64,4	62,1	573
<i>phyO</i>					68,3	67,0	576
<i>phyP</i>						86,2	564
<i>phyP-AL</i>							564

So wurden über PCR-Amplifikationen und anschließenden RFLP-Analysen sechs Phytochromgenfragmente für *Pinus* gefunden, die drei Genlinien zugeordnet werden können.

3.2.2 Isolierung von *phyN* aus einer cDNA-Bank von *Pinus*

Ausgehend von den unter 3.1.1 beschriebenen Sequenzdaten war nun bekannt, daß in *Pinus* mindestens drei verschiedene Phytochromtypen vorliegen. Daher wurde eine cDNA-Bank von *Pinus* mit homologen Sonden der *phyN*- und *phyO*-Genfragmente untersucht. Für die Analyse der cDNA-Bank wurden 1 Mio. unabhängiger Plaques ausplattiert. Durch einen Screen mit einer *phyN* Sonde konnten sechs positive Phagen-Plaques nach dreimaligem Replattieren isoliert werden. Restriktionsspaltungen zeigten, daß vier gleiche Klone mit einem inserierten DNA-Fragment von etwa 3000 bp Länge vorlagen und zwei Klone mit dem bereits bekannten *phyP* von *Pinus*. Auch durch wiederholtes Durchsuchen der cDNA-Bank konnte nur ein Teillängenklon von 3023 bp Länge von *phyN* isoliert werden. Nach seiner Sequenzierung stand fest, daß etwa 800 bp des 5'-Bereiches fehlen. Die Teilsequenz ist unter der Accession-Nummer AJ271627 in EMBL veröffentlicht (Genbank-Eintrag s. 7.1).

5'-RACE-Experimente mit Gesamt-RNA sowie mRNA von dunkelgewachsenen *Pinus*-Keimlingen ergaben bisher nicht des gesuchte 5'-Ende des *phyN*-Gens.

In Tabelle 3.2 sind die prozentualen Identitäten von *phyN*-, *phyO*- und *phyP*-Sequenzen zu Phytochromgenen von *Arabidopsis*, *Physcomitrella* und *Adiantum* aufgelistet.

Tab. 3.2: Prozentuale Identitäten der *Pinus phyN*-Teilsequenz (2906 bp) auf Nukleinsäureebene im Vergleich mit bekannten Phytochromgenen von Angiospermen, Gymnospermen und Niederen Pflanzen. P.s.: *Pinus sylvestris*; P.a.: *Picea abies*; A.t.: *Arabidopsis thaliana*; P.p.: *Physcomitrella patens*; A.c.: *Adiantum capillus-veneris*.

	P.s. phyN	P.a. phyO	P.s. phyP	A.t. phyA	A.t. phyB	A.t. phyC	A.t. phyD	A.t. phyE	P.p. phy	A.c. phy1	A.c. phy2
P.s. phyN		72,0	63,1	62,7	60,2	59,9	59,1	58,0	60,7	59,5	61,5
P.a. phyO			64,5	62,1	58,1	58,7	56,5	57,0	61,7	60,9	62,6
P.s. phyP				59,0	64,0	57,9	62,7	59,9	63,8	61,6	63,6
A.t. phyA					54,9	55,4	55,1	54,7	57,7	57,9	59,4
A.t. phyB						56,9	76,5	59,3	58,7	57,0	57,8
A.t. phyC							55,3	55,1	56,7	55,0	56,1
A.t. phyD								58,3	57,4	56,4	58,2
A.t. phyE									54,9	54,0	56,8
P.p. phy										60,6	61,3
A.c. phy1											60,9

phyN von *Pinus* zeigt mit 72,0 % die höchste Identität zu *phyO* von *Picea* und lediglich 63,1 % Identität zu *Pinus phyP*. Wie phylogenetische Analysen auf Nukleinsäureebene zeigten, entstammen *phyN* und *phyO* einer gemeinsamen Genlinie, die der Angiospermen *phyA*-Linie entspringt (Abb. 3.12). Betrachtet man die Identitäten der Phytochromgene der Gymnospermen *phyN*, *phyO* und *phyP* untereinander, so sind die Unterschiede im Vergleich zu den Phytochromen von Angiospermen geringer. *phyN* und *phyO* besitzen 72,0% Identität, wohingegen *Arabidopsis phyA* zu *phyC* nur 55,4% Identität besitzen. Auffällig ist auch, daß die bekannten Sequenzen aus Gymnospermen ähnliche Identitäten zu Niederen Pflanzen (64-70%) wie zu Höheren Pflanzen (57-63%) zeigen. Demnach scheinen die Phytochrome von Gymnospermen eine mittlere Entwicklungsstufe zwischen Niederen Pflanzen- bzw. Angiospermen-Phytochromen einzunehmen.

3.2.3 Lichtabhängige Regulation von Phytochrom in *Pinus*-Keimlingen

Die Entwicklung von Pflanzen im Keimlingsstadium wird in Angiospermen hauptsächlich von PHYA beeinflusst. PHYA reguliert die Keimungsaktivität und unterdrückt das Streckungswachstum des Hypokotyls etiolierter Pflanzen im Licht. Außerdem wird durch PHYA das Blühen adulter Pflanzen verzögert (Smith 1995). Die entscheidende Rolle von PHYA für die lichtabhängige Entwicklung von Pflanzen impliziert eine differentielle Regulation der Menge und Aktivität von PHYA, die von verschiedenen Mechanismen abhängt (Pratt 1995, Quail *et al.* 1995). So konnte gezeigt werden, daß PHYA einem lichtinduzierten, proteolytischen Abbau unterliegt (Clough und Vierstra 1997). Die Halbwertszeit für die lichtlabile Form P_{DR} ist >100-fach höher im Vergleich zur Dunkelisoform P_R von PHYA (Quail *et al.* 1973, Hennig *et al.* 1999). Im Gegensatz dazu konnte für *phyB-phyE* kein Abbau im Anschluß an eine Belichtung nachgewiesen werden und es sind relativ konstante Mengen dieser Proteine während des gesamten Lebenszyklus von angiospermen Pflanzen vorhanden (Wagner *et al.* 1991, Quail 1997).

Für Gymnospermen wurden bisher keine Untersuchungen bezüglich des Abbaus des lichtlabilen Phytochromtyps durchgeführt. In einem ersten experimentellen Ansatz wurden Gesamtproteinextrakte von licht- und dunkelgewachsenen Keimlingen von *Pinus* durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit dem monoklonalen Antikörper Z-3B1, der gegen PHYA aus *Zea mays* gerichtet ist, entwickelt (Abb 3.6 A).

Abb. 3.6 A zeigt die spezifische Reaktion des mkAK Anti-Mais PHYA Z-3B1 mit einem Protein aus *Pinus* mit einer Größe von etwa 120 kDa. Die beiden Spuren am linken Rand zeigen die Immunreaktion mit Proteinextrakten aus *Pinus* Keimlingen, die im Dauerdunkel bzw. im Licht-/Dunkelwechsel des Tages angezogen werden. Deutlich erkennt man eine Anreicherung des 120 kDa großen Proteins in dunkelangezogenen Keimlingen im Vergleich zu lichtgewachsenen Keimlingen. Es kann gefolgert werden, daß es sich bei dem nachgewiesenen Protein um ein Phytochrom handelt, das einer vergleichbaren Dunkelanreicherung wie PHYA in Angiospermen unterliegt.

Weiterhin wurde der zeitliche Verlauf des Abbaus dieses Phytochroms durch Western-Blot-Experimente untersucht (Abb. 3.6 A). Die relativen Mengen des Proteins wurden mit Hilfe des Programms NIH-Image durch die Intensität der Färbung der Proteinbanden ermittelt. Diese Ergebnisse sind in Abb. 3.6 B dargestellt. In Dunkelheit konnte eine bis zu 3,5-fach höhere Menge von Phytochrom im Vergleich zu lichtgewachsenen Keimlingen ermittelt werden. Nach 2 h Belichtung wurden noch 64 % der Phytochrommenge aus dunkelgewachsenen Keimlingen gemessen, nach 4 h etwa die Hälfte (+/- 52 %). Die Halbwertszeit dieses Phytochroms beträgt somit etwa 4 h. Der weitere Abbau des Phytochroms verläuft langsamer. Nach 8 h Belichtung konnten noch 44 % des Ausgangswertes bestimmt werden. Nach 24 h liegen etwa 28 % des Ausgangswertes vor, nach 48 h 18 %. Da die gemessenen Werte von 24 h und 48 h keinen signifikanten Unterschied zeigen, ist

anzunehmen, daß eine Gleichgewichtseinstellung zwischen Phytochromabbau und *de novo* Synthese nach 24 h eingetreten ist. Überführt man im Anschluß an eine 24 stündige Belichtung einen Teil der Keimlinge für weitere 24 h in die Dunkelheit, so läßt sich eine Anreicherung von Phytochrom in Dunkelheit feststellen, die bei einem Faktor von etwa + 2,3 liegt (bezogen auf den Lichtwert).

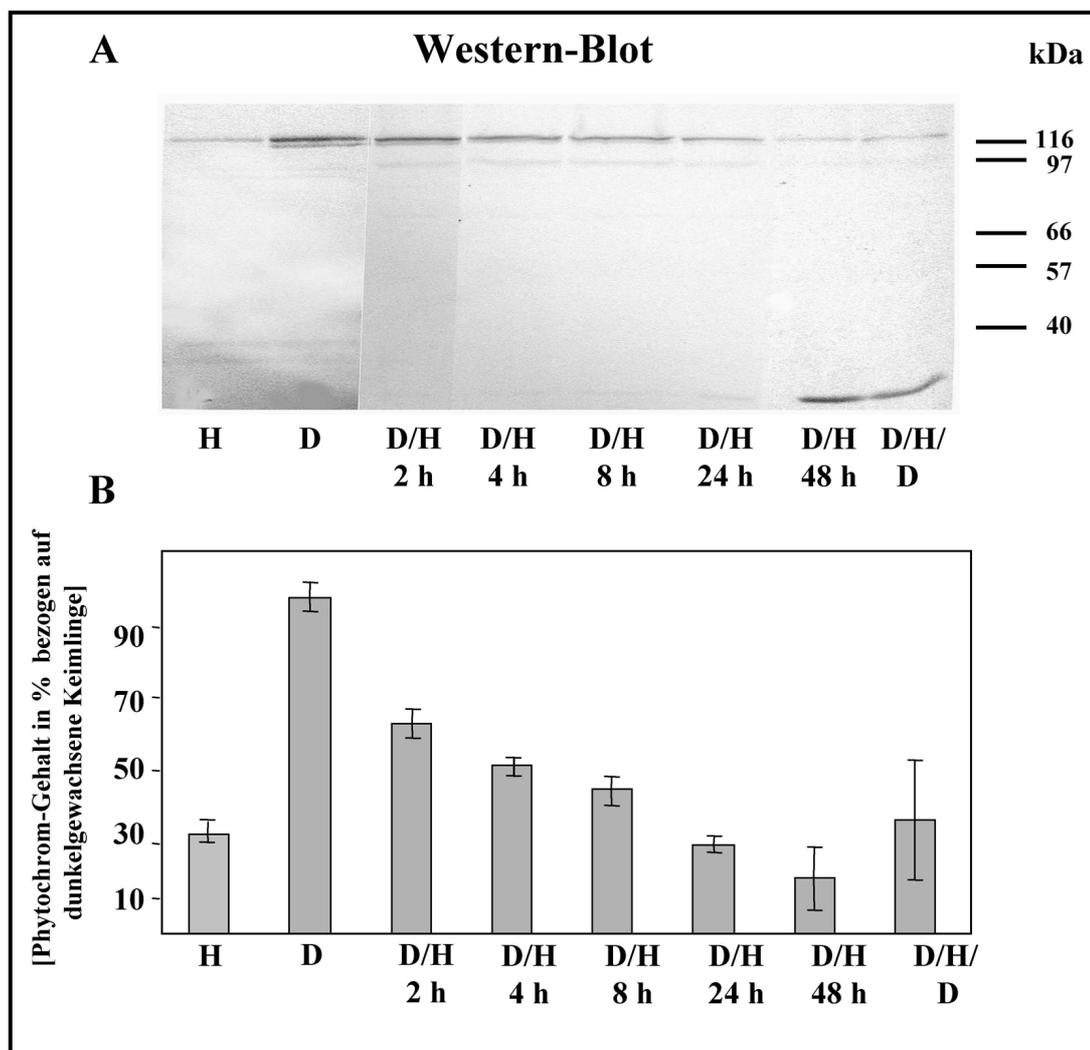


Abb. 3.6 A: Lichtabhängige Expression von Phytochrom in *Pinus*-Keimlingen.

Pro Spur wurden 85 µg Gesamtprotein mittels einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden mit dem mkAK Anti-Mais PHYA Z-3B1 (1:50 (v/v) in PBT) inkubiert. H: im Licht-/Dunkelwechsel des Tages gewachsene Keimlinge; D: dunkelgewachsene Keimlinge; D/H 2 h: Keimlinge wurden in Dunkelheit angezogen und im Anschluß an eine zweistündige Dauerbelichtung geerntet. Zusätzlich wurde nach 4 h, 8 h, 24 h und 48 h Dauerbelichtung geerntet (D/H 4 h, D/H 8 h, D/H 24 h, D/H 48 h). D/H/D: dunkelangezogene Keimlinge wurden für 24 h belichtet, im Anschluß daran für 24 h dunkelinkubiert und anschließend geerntet.

B: Densitometrische Auswertung der Banden des Western-Blots aus A.

Das hier immunologisch nachgewiesene Phytochrom zeigt somit ähnliche für PHYA aus Angiospermen beschriebene physiologische Reaktionen der Dunkelanreicherung und der lichtabhängigen Degradation. Diese Abbaukinetik konnte durch drei untersuchte Versuchsreihen bestätigt werden und die densitometrische Auswertung belegt nur eine geringe Standardabweichung.

Auch für *Picea abies* konnte ein vergleichbarer lichtinduzierter Abbau von Phytochrom mit Z-3B1 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde ein etwa 20 kDa großes Protein durch Z-3B1 markiert, das gegenläufig zum beobachteten Phytochromabbau angereichert wird (Abb. 3.6 A). Es könnte sich hier um eines der Abbauprodukte des Phytochroms handeln, daß das Bindungsepitop von Z-3B1 enthält.

3.2.4 Kreuzreaktionen von Z-3B1 mit heterolog exprimierten Phytochromfragmenten aus *Pinus* und *Picea*

Für den verwendeten monoklonalen Antikörper Z-3B1 wurden bereits Kreuzreaktionen mit Proteinen der gleichen Größe wie Phytochrom aus anderen Spezies nachgewiesen, wie zum Beispiel weiteren Monokotyledonae sowie Laubmoosen, Lebermoosen und Farnen (Schneider-Poetsch *et al.* 1988). Weitergehende Analysen lokalisierten das Bindungsepitop von Z-3B1 im N-terminalen Bereich von *Zea mays* PHYA (Bonenberger *et al.* 1992).

Für *Pinus* und *Picea* konnten nun insgesamt drei exprimierte Phytochromgene *phyN*, *phyO* und *phyP* nachgewiesen werden, über deren physiologische Funktionen keine Daten vorliegen und die nachweislich drei verschiedenen Genlinien angehören (s. 3.3.2 und 3.3.4). Da nicht bekannt war, mit welchem dieser Phytochrome Kreuzreaktionen mit Z-3B1 zu erwarten sind, wurden C-terminale Fragmente von *phyN*, *phyO* und *phyP*, die das Bindungsepitop von Z-3B1 enthalten, in den Expressionsvektor pQE kloniert (Abb. 3.7 A). Die Phytochromfragmente wurden in *E. coli* durch IPTG-Induktion überexprimiert. Die immobilisierten und auf Nitrozellulosemembranen übertragenen Gesamtproteinextrakte aus *E. coli* wurden immunologisch mit dem mkAK Anti-His₅ und in einem weiteren Ansatz mit dem mkAK Anti-Mais PHYA Z-3B1 (s. 2.1.11) entwickelt. Die spezifischen Reaktionen sind in Abb. 3.7 B dargestellt.

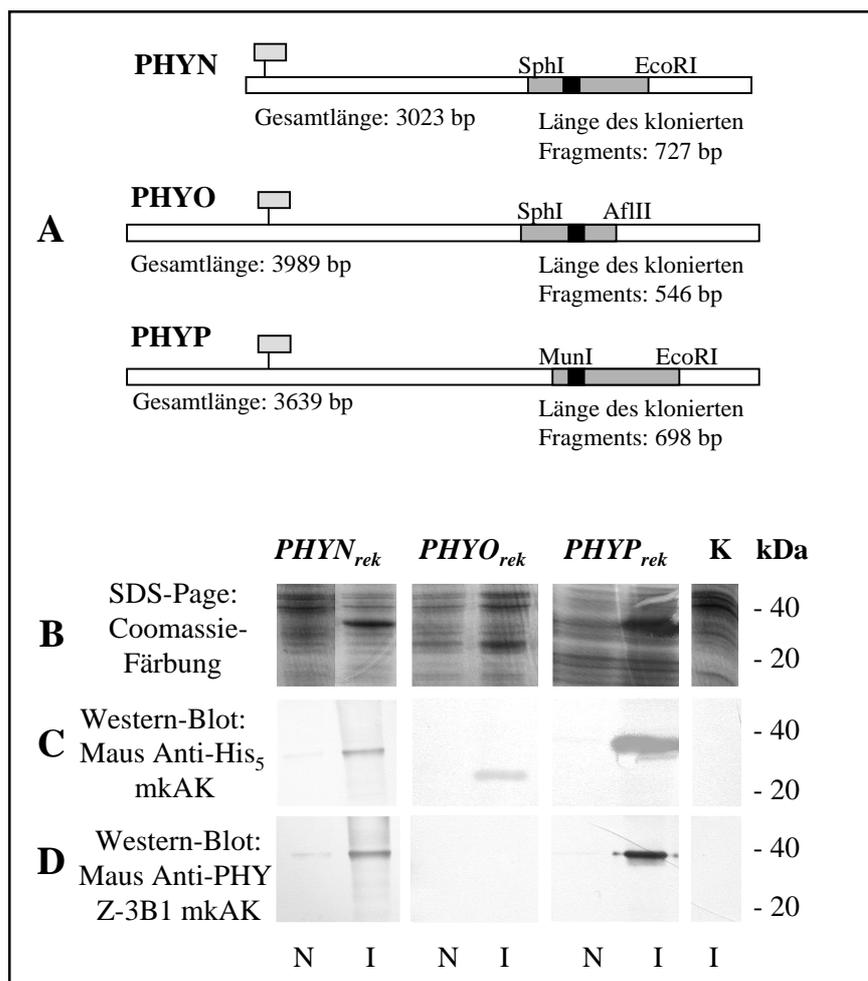


Abb. 3.7 A: Klonierungen der C-terminalen Bereiche von *phyN* und *phyP* aus *Pinus* sowie *phyO* aus *Picea*. Der grau hinterlegte Bereich markiert die in pQE klonierten und anschließend überexprimierten Genfragmente, der schwarze Kasten stellt das Bindungsepitop des mkAK Anti-Mais PHYA Z-3B1 dar.

B: 10%ige SDS-PAGE der Gesamtproteinextrakten von *E. coli* Expressionskulturen.

C: Western-Blot der Gesamtproteinextrakte aus *E. coli*. Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Gesamtproteinextrakte aus *E. coli* wurden auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die Inkubation der Membran erfolgte mit dem mkAK Anti-His₅ (1:1000 (v/v) in PBT).

D: Wie C, die Inkubation der Membran erfolgte mit dem mkAK Anti-Mais PHYA Z-3B1 (1:100 (v/v) in PBT). *PHYN/O/P_{rek}*: Gesamtproteinextrakte der *PHYN/O/P* überexprimierenden *E. coli*-Klone, K: Gesamtproteinextrakt von *E. coli*-Zellen, die den leeren Ausgangsvektor (pQE) enthalten als Kontrolle. N: nicht induzierte Expressionskultur, I: induzierte Expressionkultur (1 mM IPTG).

Abb. 3.7 B zeigt, daß in den induzierten Proteinextrakten jeweils ein Protein der erwarteten Größe mit einem Histidin-Antikörper nachgewiesen werden konnte. Eine Entwicklung der Proteinextrakte gegen Z-3B1 zeigte eine eindeutige Reaktion für PHYN und PHYP aus *Pinus*. Der unter 3.2.3 beschriebene lichtabhängige Abbau von PHY kann folglich auf diese beiden Phytochromtypen bezogen werden, da auch in Proteinextrakten von *Picea* der Abbau belegt

wurde (Daten nicht gezeigt). Es schloß sich nun eine Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen PHYN und PHYP aus *Pinus* an, um die Aussage auf einen Phytochromtyp spezifizieren zu können.

Im Anschluß an die oben dargestellten Experimente wurden die heterologen *PHY*-Fusionsproteine angereichert (s. 2.2.3.12) und einer Firma übergeben, die kommerziell AK herstellt (s. 2.2.3.13).

3.2.5 Untersuchung der Antiseren pkAK-N und pkAK-P

Um die lichtabhängige Expression von PHYN und PHYP in *Pinus* charakterisieren zu können, wurden pkAK gegen beide Phytochrome hergestellt. Hierzu wurden etwa 1000 µg der heterologen Fusionsproteine angereichert und für die Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen verwendet. Die Immunisierung wurde von der Fa. Biogenes (Berlin) durchgeführt. Dazu wurden die Kaninchen in vier Schritten einmal pro Woche immunisiert. Nach vier Wochen wurden 20 ml Serum abgenommen. Die Antiseren wurden zunächst in verschiedenen Konzentrationen gegen die entsprechenden Fusionsproteine getestet.

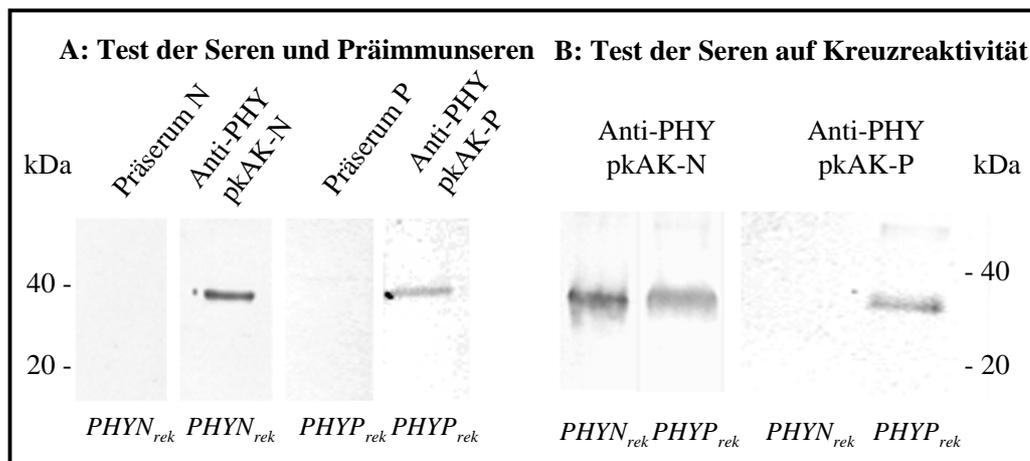


Abb. 3.8: Test der Antiseren pkAK-N bzw. pkAK-P

A: Test der Antiseren (pkAK-N bzw. pkAK-P) i.V. zu den Präimmunsereen (Präserum N bzw. Präserum P): Pro Spur wurden 250 ng Fusionsprotein *PHYN_{rek}* bzw. *PHYP_{rek}* mittels einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt (Mengenschätzung im Anschluß an eine Coomassie-Färbung) und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Inkubation der Membranen erfolgte mit den Antiseren pkAK-N bzw. pkAK-P 1:100 (v/v) in PBT.

B: Test der Antiseren pkAK-N und pkAK-P auf Kreuzreaktivität. Durchführung wie unter A beschrieben.

Abb. 3.8 zeigt den Test der erhaltenen Antiseren, die eine stärkere Immunreaktion hatten, und der entsprechenden Präimmunseren gegen die Fusionsproteine $PHYN_{rek}$ und $PHYP_{rek}$ (Antigene).

Es ist erkennbar, daß in beiden Fällen eine Immunreaktion der Kaninchen gegen das Antigen erfolgte, da die Präimmunseren keine Reaktion mit dem Antigen zeigen. Da die Nachweisreaktion der Fusionsproteine nur bei einer Antigenmenge von etwa 250 ng und einer Serumkonzentration von 1:100 (v/v) eindeutig war, wurde eine Affinitätsreinigung der Seren durchgeführt (s. 2.2.3.14).

Abb. 3.8 B zeigt weiterhin einen Kreuzreaktivitätstest der Antiseren. Der immunologische Nachweis der Fusionsproteine $PHYN_{rek}$ und $PHYP_{rek}$ führte bei Inkubation mit pkAK-N für beide Fusionsproteine zu einem Signal, demnach liegt hier eine Kreuzreaktivität vor. Hingegen wurde durch pkAK-P nur das für die Immunisierung eingesetzte Fusionsprotein, nämlich $PHYP_{rek}$, nachgewiesen. Aus dieser Beobachtung ergab sich Möglichkeit, die lichtabhängige Regulation von PHYP in Gesamtproteinextrakten von *Pinus* spezifisch nachweisen zu können.

3.2.6 Expression von PHYN und PHYP in *Pinus*

Die Expression von PHYN und PHYP sollte in Proteinextrakten von *Pinus* Keimlingen bestimmt werden, die in Dunkelheit bzw. im Licht-/Dunkelwechsel des Tages angezogen wurden. Die Proteine wurden aus 7 Tage alten Keimlingen extrahiert (s. 2.2.3.4), elektrophoretisch aufgetrennt, und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden in pkAK-N bzw. pkAK-P 1:100 (v/v) in PBT inkubiert.

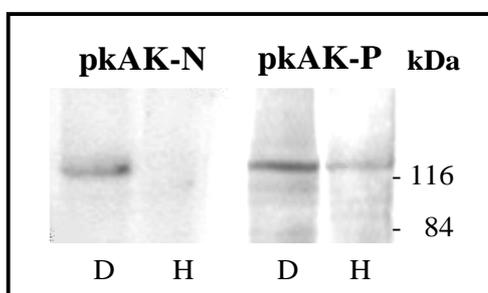


Abb. 3.9:

Expression von PHYN bzw. PHYP in Gesamtproteinextrakten von 7 Tage alten *Pinus*-Keimlingen, die in Dunkelheit (D) bzw. im Licht-/Dunkelwechsel (H) des Tages angezogen wurden.

Die Proteinextrakte wurden mittels einer 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden 1:100 (v/v) in PBT mit pkAK-P und pkAK-N inkubiert.

Pro Spur wurden 200 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Wie das Westernblotexperiment in Abb. 3.9 belegt, kann mittels pkAK-N und pkAK-P ein Protein mit einer Größe von etwa 120 kDa in Gesamtproteinextrakten von 7 Tage alten *Pinus*-Keimlingen markiert werden. Folglich kann mit diesen pkAK Phytochrom in *Pinus* nachgewiesen werden. Wie vorangegangene Kreuzreaktivitätstests, die mit den heterolog hergestellten Fusionsproteinen durchgeführt wurden, jedoch ergaben (Abb. 3.8), markiert pkAK-N auch PHYP. Es muß also davon ausgegangen werden, daß durch pkAK-N möglicherweise das lichtabhängige Vorliegen von zwei Phytochromen gemessen wird.

Eindeutig kann man jedoch erkennen, daß mit pkAK-N in dunkelgewachsenen Keimlingen von *Pinus* mehr Phytochrom i.V. zu lichtgewachsenen nachgewiesen wird (Abb. 3.9). Betrachtet man demgegenüber die Expression von PHYP, so läßt sich hier eine geringere Abhängigkeit von der Belichtung erkennen und es liegt auch in Proteinextrakten von lichtgewachsenen *Pinus*-Keimlingen PHYP vor.

Zusammenfassend belegen die dargestellten immunologischen Untersuchungen zur lichtabhängigen Expression von Phytochrom in *Pinus* erstmals, daß in Gymnospermen ebenfalls Typ I (lichtlabile) und Typ II (lichtstabile) Phytochrome vorliegen (Abb. 3.6), wie sie für Angiospermen beschrieben sind (Quail *et al.* 1995, Clough und Vierstra 1997, Clough *et al.* 1999, Hennig *et al.* 1999). Eine eindeutige Spezifizierung der Phytochromdegradation bei Gymnospermen auf einen Phytochromtyp (PHYN, PHYO oder PHYP) ist bis zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig möglich. Erste Western-Blot Experimente mit spezifischen pkAK deuten jedoch an, daß PHYN einer lichtinduzierten Degradation unterliegt (Abb. 3.9).

3.3 Molekulare Phylogenie anhand von Phytochromgenen

Die im Folgenden dargestellten Analysen wurden durchgeführt, um das phylogenetische Potential von Phytochromsequenzen zu untersuchen. Den Ausgangspunkt für diese Fragestellung bildet ein phylogenetischer Stammbaum, der anhand von Aminosäuresequenzen (PHY) aller zu diesem Zeitpunkt bekannten, kompletten Phytochrome von Niederen und Höheren Pflanzen erstellt wurde (37) (s. 3.3.1 Abb. 3.10). Diese sind in Tab. 3.3 angegeben.

Das Verzweigungsmuster des erhaltenen Stammbaumes wurde mit den Topologien von Stammbäumen verglichen, die auf der Basis von partialen Nukleotidsequenzen (*phy*) (2906 bp bzw. 570 bp) berechnet wurden (s. 3.3.2, 3.3.3). Die Analysen dienten außerdem dazu, die Genlinie *phyN* von *Pinus* im Zusammenhang mit der generellen Phylogenie der Phytochromgenfamilie darzustellen (3.3.2).

Bei den durchgeführten Berechnungen wurden einzelne Parameter der zugrundeliegenden Taxa und Charaktere variiert. So wurden für bestimmte Analysemethoden die Datenmasken verändert, d.h. bestimmte Charaktere des Alignments ausgeschlossen. Distanzanalysen wurden unter Ausschluß der konstanten Charaktere, Parsimony-Analysen unter Ausschluß konstanter und parsimony-uninformativer Charaktere durchgeführt. Maximum-Likelihood-Analysen wurden für alle Charaktere berechnet.

Der Einfluß der Outgroup auf die phylogenetischen Analysen wurde überprüft, indem unterschiedliche Outgroup-Organismen ausgewählt wurden. Hypervariable Bereiche innerhalb des Alignments wurden nur eingefügt, wenn homologe Positionen möglichst eindeutig zugeordnet werden konnten, wie dies für den hypervariablen Bereich partialer *phy*-Sequenzen von Gymnospermen zutrifft. Die entsprechenden Parameter, die den phylogenetischen Analysen zugrundeliegen, werden jeweils angegeben.

Um die Stammbaumtopologien statistisch abzusichern, wurden Bootstrap-Analysen für Distanz- und Parsimony-Berechnungen von mindestens 100 Datensätzen durchgeführt. Im Text werden die entsprechenden Bootstrapwerte in Klammern angegeben, wobei normalgedruckte Werte Distanzanalysen und kursivgedruckte Werte Parsimonyanalysen entstammen. Zusätzlich wurden phylogenetische Analysen für alle Datensätze nach Distanz-, Parsimony- und Maximum-Likelihood-Methoden erstellt und die erhaltenen Topologien verglichen.

3.3.1 Molekulare Phylogenie der Phytochromgenfamilie Niederer und Höherer Pflanzen

Wie einleitend erläutert, wurden zu Beginn dieser Arbeit phylogenetische Analysen anhand von kompletten Aminosäuresequenzen durchgeführt. Es wurde erwartet, daß die molekulare Phylogenie der Phytochromgenfamilie im Pflanzenreich erhalten wird und daß diese auf den einzelnen Genlinien der stammesgeschichtlichen Entwicklung der Organsimen entspricht. Folgende Sequenzdaten wurden verwendet:

Tab. 3.3: PHY-Vollängensequenzen und Accession-Nummern, die für die Analyse der Phylogenie der Phytochromgenfamilie im Pflanzenreich verwendet wurden.

<u>Spermatophyta/</u>		<u>Accession-Number</u>
<u>Angiospermae/</u>		
<u>Dicotyledonae/</u>		
<u>Rosopsida/Asteridae:</u>		
<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.)Nym. Ex A.W.Hill.	<i>phyA</i>	X75412
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	<i>phyA</i>	X66784
<i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>phyB</i>	L10114
	<i>phyA</i>	S84872
<i>Pharbitis nil</i> (L.)Choisy	<i>phyB</i>	S51538
	<i>phyE</i>	U39787
<u>Rosopsida/Rosidae:</u>		
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	<i>phyA</i>	X17341
	<i>phyB</i>	X17342
	<i>phyC</i>	X17343
	<i>phyD</i>	X76609
	<i>phyE</i>	X76610
<i>Cucurbita pepo</i> L.	<i>phyA</i>	M15265
<i>Glycine max</i> (L.)Merr.	<i>phyA</i>	L34844
	<i>phyB</i>	L34843
<i>Lathyrus sativus</i> L.	<i>phyA</i>	U84970
<i>Pisum sativum</i> L.	<i>phyA</i>	M37217
<i>Populus tremula</i> L.	<i>phyA</i>	AJ001318
<u>Monokotyledonae</u>		
<i>Avena sativa</i> L.	<i>phyA</i>	M18822
<i>Oryza sativa</i> L.	<i>phyA</i>	X14172
	<i>phyB</i>	X57563
	<i>phyC</i>	AB018442
	<i>phyA</i>	U56729
<i>Sorghum bicolor</i> (L.)Moench	<i>phyB</i>	U56730
	<i>phyC</i>	U56731
	<i>phyA</i>	(Christensen und Quail 1989)
<i>Zea mays</i> L. Off.		
<u>Gymnospermae / Coniferophytina</u>		
<i>Picea abies</i> L.	<i>phyO</i>	U60264
<i>Pinus sylvestris</i> L.	<i>phyP</i>	X96738
<u>Pteridophyta/ Filicatae</u>		
<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	<i>phy1</i>	D13519
	<i>phy2</i>	AB016232
<i>Anemia phyllitidis</i> (L.)Sw.	<i>phy3</i>	(Maucher 1994)
	<i>phy4</i>	(Maucher 1994)

<u>Psilotatae</u>	<i>Psilotum nudum</i> (L.)P.Beauv.	<i>phy1</i>	X74930
<u>Lycopodiatae</u>	<i>Selaginella martensii</i> Spring	<i>phy1</i>	X98700
<u>Bryophyta/</u>	<i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp.	PpphyL1	X75025
	<i>Ceratodon pupureus</i> (Hedw.) Brid.	Cpphy1	U87632
<u>Chlorophyta/</u>	<i>Mougeotia scalaris</i> Hassall	MspHYL1	X95550
	<i>Mesotaenium caldariorum</i>	McPHYL1	U31284

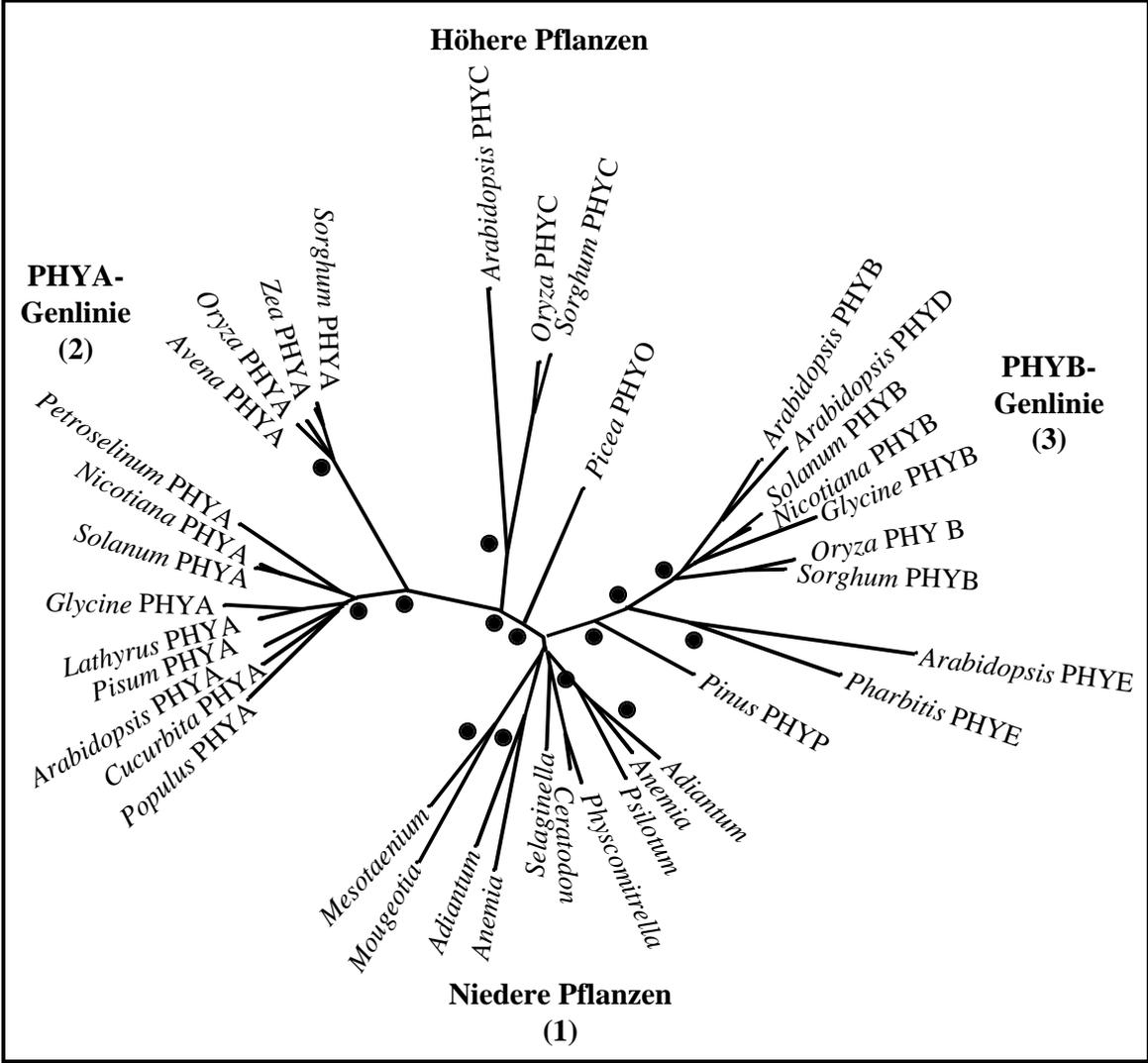


Abb. 3.10: Ungewurzelter, phylogenetischer Stammbaum errechnet aus 37 PHY-Vollängensequenzen mit *Mesotaenium* und *Mougeotia* als Outgroup (Kimura-2-Parameter-Distanzmatrix, Neighbor-Joining-Baumkonstruktionsmethode, 1325 AS). Die an den Knoten eingezeichneten Punkte entsprechen einer Bootstrapunterstützung dieser Verzweigung von 100. Bootstrapwerte < 100 sind nicht gezeigt, werden aber im Text erläutert. Die Werte beziehen sich auf eine Bootstrapanalyse von 1000 berechneten Datensätzen.

Der in Abb. 3.10 dargestellte Stammbaum zeigt die Phylogenie der Phytochromgenlinien. Grundsätzlich ist eine Auftrennung der Phytochrome in drei große Gruppen zu erkennen: (1) die Phytochrome der Niederen Pflanzen bilden eine Gruppe verwandter Sequenzen (einen Cluster), (2) die A-Phytochromgenlinie sowie (3) die B-Phytochromgenlinie der Höheren Pflanzen zwei weitere.

Liest man diesen Stammbaum ausgehend von den Niederen Pflanzen, so erkennt man, daß die Moose (*Ceratodon* und *Physcomitrella*) einen gemeinsamen Vorfahren mit den Lycopodiatae (*Selaginella*) teilen (98). Dieser Verzweigungspunkt entspricht dem Ursprung der Landpflanzenevolution und markiert den Beginn der kormophytischen Organisationsform.

Unaufgelöst ist die Stellung der Algen *Mougeotia* und *Mesotaenium* zum Gesamtsystem anhand dieser Daten. Die Bootstrapwerte liegen bei jeder verwendeten Analysemethode <70. Sie münden nicht an dem Ursprungspunkt der Landpflanzenevolution Bryatae/Lycopodiatae ein, so daß diese Algen hier als entferntere Verwandte aller Landpflanzen zu betrachten sind.

Auffällig ist, daß *Anemia* und *Adiantum* (Filicatae) jeweils zweimal vertreten sind. Bei einem gemeinsamen Vorfahren der beiden Gattungen kam es offensichtlich zu einer Genduplikation der Phytochrome (100), so daß sie in diesem Stammbaum durch jeweils zwei Genlinien vertreten sind. Auf einer der Genlinien teilt *Psilotum* einen gemeinsamen Vorfahren mit *Anemia* und *Adiantum*. Diese Position erweckt Zweifel an der bisherigen systematischen Stellung von *Psilotum* als nächster Verwandter der Urlandpflanzen (Schneider-Poetsch *et al.* 1998).

Liest man diesen Stammbaum ausgehend von dem Punkt, an dem alle Niederen Pflanzen abzweigen, weiter zu den Höheren Pflanzen, so stellt das erste Aststück das 'Urphytochromgen' der Höheren Pflanzen dar. Einige Zeit später erfolgte die erste Genduplikation in die Phytochromlinien A und B der Spermatophyta (94). Auf beiden Genlinien erfolgte eine zweite Genduplikation (A/C und B/E) nach der Auftrennung der Angio-/Gymnospermae. Die Gymnospermen sind in diesem Stammbaum durch PHYP von *Pinus* und PHYO von *Picea* vertreten. Hier wird deutlich, daß PHYO ein Abkömmling der A-Genline ist und PHYP einer der B-Genlinie. Das Vorkommen der beiden Gattungen, die systematisch in einer Familie der Gymnospermen zusammengefaßt werden, auf zwei verschiedenen Ästen entspricht folglich nicht ihrer systematischen Verwandtschaft, sondern der Tatsache, daß sie in diesen phylogenetischen Analysen durch zwei verschiedene Genlinien vertreten sind.

Betrachtet man die aus diesem Datensatz erhaltene Phylogenie der Phytochrome, so spiegelt sie für die einzelnen Genlinien die Evolution der Landpflanzen wider.

Niedere Pflanzen stellen als entwicklungs geschichtlich sehr alte Gruppe innerhalb der Landpflanzen eine eigene Abteilung dar. Phylogenetische Analysen von Phytochromsequenzen ordnen allen Niederen Pflanzen in einem Cluster zusammen, getrennt von den Angiospermen. Die Lycopodiatae (*Selaginella*) vertreten in diesem Stammbaum eine ursprüngliche Farngruppe. Phytochromgene belegen hier die nahe Verwandtschaft zu den Moosen (*Ceratodon* und *Physcomitrella*). Liest man von diesem Verzweigungspunkt

(Bryatae/Lycopodiatae) weiter, folgt *Psilotum* gemeinsam mit *Anemia* und *Adiantum*, beides Vertreter der echten Farne (Filicatae). Die überraschende Stellung von *Psilotum* wurde einleitend bereits erwähnt.

Liest man den Stammbaum weiter in Richtung zur Genduplikation in die PHYA- und PHYB-Genlinie der Höheren Pflanzen, so zweigen auf beiden Genlinien als erstes Gymnospermensequenzen ab (je 100). Dies entspricht ihrer systematischen Stellung als ursprünglichste rezente Spermatophyten.

Innerhalb beider Phytochromlinien der Angiospermen kam es zu einer weiteren Genduplikation in PHYA/C und PHYB/E (je 100). Die Genduplikation PHYB/E erfolgte wahrscheinlich ausschließlich bei einem gemeinsamen Vorfahren der Dikotyledonae. In den bislang untersuchten monokotylen Pflanzen konnten nur PHYA, PHYB und PHYC gefunden werden (Mathews und Sharrock 1996, Childs *et al.* 1997). Lediglich im Genom von *Zea mays* wurde ein zweiter *phyB* Locus kartiert. Ob es sich dabei jedoch tatsächlich um ein Gen der PHYE-Genlinie handelt oder aber um einen PHYB-Subtyp, der nur in Mais vorliegt, bleibt noch zu klären. In *Sorghum bicolor* beispielsweise wurde nur ein *phyB* Locus gefunden (Childs *et al.* 1997). Die molekulare Phylogenie der Phytochrome ordnet alle monokotylen Pflanzen auf jeder Genlinie in eine Gruppe, die einem gemeinsamen Vorfahren entstammt (Monophylum) (je 100).

Ebenso werden Dikotyledonae zusammen angeordnet. Innerhalb der Dikotyledonae ist die grundsätzliche Einteilung der hier analysierten Rosopsida in Rosidae (*Arabidopsis*, *Cucurbita*, *Glycine*, *Lathyrus*, *Pisum*, *Populus*) und Asteridae (*Petroselinum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Pharbitis*) erhalten (The Angiosperm Phylogeny Group 1998, Sitte *et al.* 1999). Aufgrund geringer phylogenetischer Information ist die Autrennung der jüngeren Gruppen der Spermatophyta mit nur niedrigen Bootstrapwerten abgesichert ist (z.B. Trennung *Populus/Cucurbita* <50). Für phylogenetische Analysen stammesgeschichtlich junger Gruppen, die zudem systematisch nah verwandt sind, scheinen PHY-Vollängensequenzen zu konserviert zu sein.

3.3.2 Vergleich phylogenetischer Stammbäume auf der Basis von PHY-Aminosäuresequenzen bzw. *phy*-Nukleotidsequenzen: Position des *phyN*-Gens von *Pinus*

Die Analyse von Makromolekülen für die Bearbeitung phylogenetischer Fragestellungen ist mit Problemen verbunden, die die zugrundeliegende Datenmatrix betreffen. Ein Problem kodierender Nukleotidsequenzen ist der unterschiedliche Informationsgehalt der einzelnen Nukleotide innerhalb eine Codons bzw. Triplets. Der genetische Code ist degeneriert, d.h. es kodieren synonyme Codons für dieselbe Aminosäure. Nur für Tryptophan und Methionin kodiert ein spezifisches Triplett. Mit Ausnahme von Leucin werden die Aminosäuren durch

die ersten beiden Positionen der Codons bestimmt. Die dritte Position innerhalb eines Codons ist folglich meist einem geringeren selektivem bzw. evolutiven Druck ausgesetzt und die Wahrscheinlichkeit einer akzeptierten Mutation an dieser Stelle höher. Für phylogenetische Analysen nahm man an, daß dies eine Abschwächung des phylogenetischen Signals bedeuten könne, bzw. daß die Homoplasie zunehmen würde. Andererseits kann, bei stark konservierten Sequenzen, gerade die Information der dritten Codonposition wichtige Informationen über phylogenetische Zusammenhänge beinhalten. Für plastidäre Gene (*rbcL*, *ndhF*) wurde gezeigt, daß die Homoplasie der dritten Codonposition im Vergleich zu Position 1 und 2 nicht höher liegt. Im Gegenteil, in den untersuchten Fällen enthielt die dritte Position gemeinsam mit der ersten Position den höchsten Informationsgehalt (für eine Zusammenfassung: Olmstead *et al.* 1998)

Um zu sehen, ob und in wie weit sich ein phylogenetischer Stammbaum anhand von Phytochromsequenzen verändert, wenn die Information von AS auf Codons erweitert wird, wurden hier 21 Sequenzen des Pflanzenreichs analysiert und miteinander verglichen.

Zusätzlich wurde die Position des unter 3.1.2 neu beschriebenen PHYN von *Pinus* innerhalb der Phylogenie der Phytochrome ermittelt. Da diese Sequenz nicht vollständig ist, wurden die anderen Sequenzen auf deren Länge gekürzt.

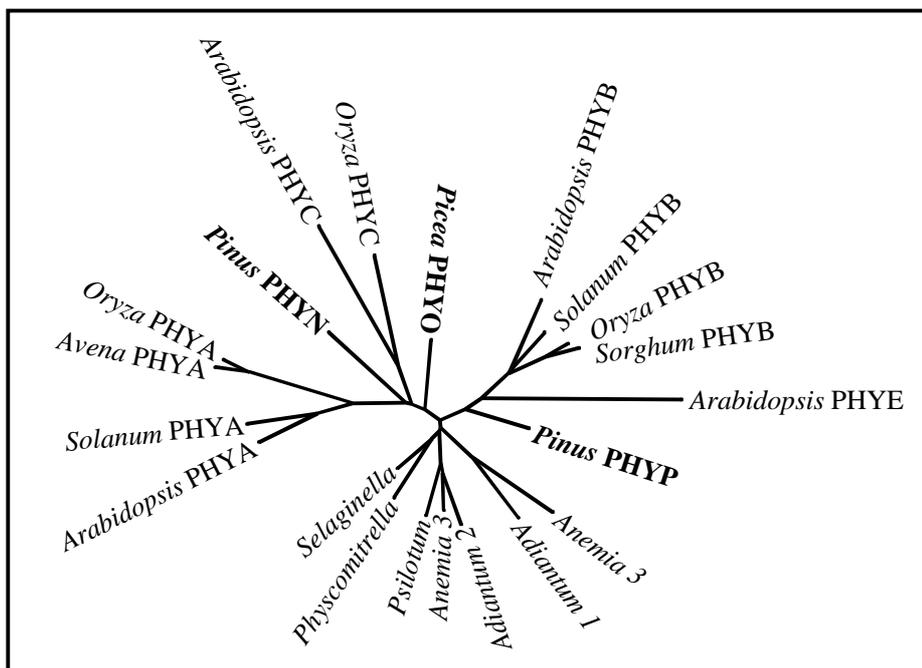


Abb. 3.11: Ungewurzelter, phylogenetischer Stammbaum berechnet aus 21 PHY-Sequenzen (Kimura-2-Parameter Distanzmatrix, Neighbor-Joining-Baumkonstruktionsmethode, 985 AS).

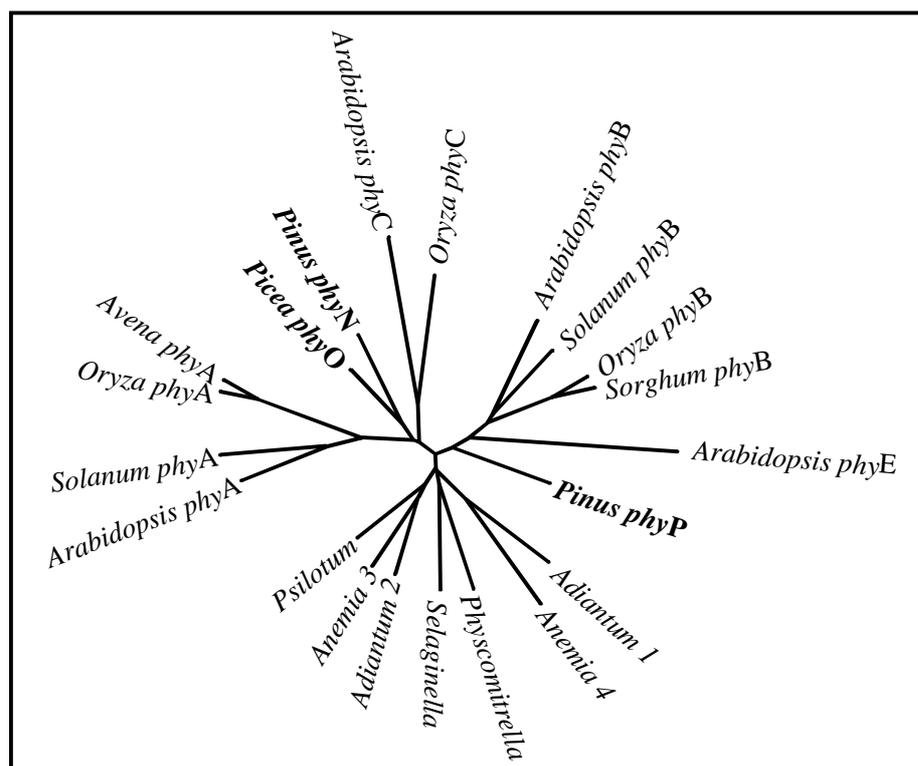


Abb. 3.12: Ungewurzelter, phylogenetischer Stammbaum berechnet aus 21 *phy*-Sequenzen (Kimura-2-Parameter Distanzmatrix, Neighbor-Joining-Baumkonstruktionsmethode, 2955 Nukleotide).

Der grundsätzliche Aufbau der in Abb 3.11 und 3.12 dargestellten Stammbäume entspricht der bereits beschriebenen Topologie des in Abb. 3.10 gezeigten Stammbaums. Die Phytochrome der Niederen Pflanzen bilden einen Cluster getrennt von den Phytochromlinien A und B der Höheren Pflanzen. Die Anordnung der Taxa innerhalb der jeweiligen Gruppen (Niedere Pflanzen, PHYA- bzw. PHYB-Linie) sind aufgrund des verwendeten Programms nicht identisch zwischen den beiden Stammbäumen (Abb. 3.11 und 3.12), entsprechen sich aber in ihrer Abfolge.

Zusätzlich fällt auf, daß die Astlängen der beiden Stammbäume verschieden lang sind. Der Grund hierfür liegt in der Anzahl der analysierten Charaktere (985 Charaktere für AS-Teilsequenzen im Vergleich 2955 Charaktere von *phy*-Teilsequenzen). Phylogenetische Analysen längerer Sequenzen des gleichen Gens können zu größeren genetischen Distanzen zwischen den einzelnen Taxa innerhalb der Stammbäume führen, wenn sich in den betrachteten Genfragmenten mehr Mutationen angehäuft haben. Wie Abb. 3.11 und 3.12 belegen, trifft dies auf vergleichende Analysen von AS- bzw. Nukleotidalignments zu. Die genetischen Distanzen der OTU's zueinander sind auf der Basis des Nukleotidalignments größer.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden dargestellten Bäumen ist ein unterschiedliches Verzweigungsmuster, das die Position von *Picea phyO* betrifft. Analysen des Aminosäurealignments deuten auf eine Genduplikation der A-Phytochrome hin, die vor der

Auftrennung Gymnospermae/Angiospermae stattfand (Abb. 3.11). PHYO von *Picea* ist in Analysen des Aminosäurealignments das ursprünglichste Phytochromgen der A-Genlinie (97/100). Liest man diesen Ast weiter in Richtung der Kronengruppen, so zweigen im Anschluß an PHYO die C-Phytochrome der Angiospermen ab (87/92) (vertreten durch *Oryza* und *Arabidopsis*). Erst danach entspringt *Pinus* PHYN von dieser Genlinie (60/86). *Picea* PHYO ähnelt folglich mehr den C-Phytochromen von Angiospermen, *Pinus* PHYN mehr den A-Phytochromen der Angiospermen.

Anders stellen sich die Verhältnisse des Stammbaumes dar, der auf der Basis des Nukleotidalalignments errechnet wurde (Abb. 3.12). Die Genduplikation PHYA/C erfolgte bei einem gemeinsamen Vorfahren der rezenten Gymnospermen und Angiospermen (100/52). An der Basis der A-Genlinie zweigen die C-Phytochrome der Angiospermen ab (100/100), anschließend gemeinsam die Phytochrome N und O der Gymnospermen (100/66). Diese Topologie könnte die wahrscheinlicheren Verhältnisse der molekularen und auch organismischen Phylogenie darstellen. Die Genduplikation A/C hätte demnach vor der Trennung Gymno-/Angiospermae stattgefunden. Alle untersuchten Spermatophyten besäßen folglich mindestens zwei Subtypen der A-Genlinie.

Wurden die Distanzanalysen des Nukleotidalalignments jedoch basierend auf anderen Distanzmatrizes errechnet (z.B. Jukes-Cantor), so ergaben sich die Verhältnisse von Abb. 3.11, also entsprechend des AS-Stammbaumes. Ein generelles Problem dieser Verzweigung scheint daher zu sein, daß die Auftrennung von Gymnospermen und Angiospermen nahezu zeitgleich mit der Genduplikation A/C bzw. N/O stattfand und so in Abhängigkeit vom Datensatz sowie der Analysenmethode eines der beschriebenen Verzweigungsmuster erhalten wird.

Die Phylogenie der B-Phytochrome wird von beiden Datensätzen unterstützt (Abb. 3.11, 3.12).

Grundsätzlich zeigt der Vergleich der Topologien dieser Stammbäume, daß phylogenetische Analysen eines Nukleotidalalignments von Phytochromgenen die Auflösung phylogenetischer Zusammenhänge ebenfalls ermöglicht. Das phylogenetische Signal der Nukleotidsequenzen wird folglich nicht von einem 'Hintergrundrauschen' bzw. einer hohen Homoplasie der dritten Codonposition überdeckt. Weitere phylogenetische Analysen wurden daher auf der Basis von Nukleotidalalignments durchgeführt.

3.3.3 Vergleich phylogenetischer Stammbäume auf der Basis von partiellen *phy*-Sequenzen (2955 bzw. 570 Charaktere)

Für phylogenetische Analysen konnte mit Hilfe der unter 2.2.2.2 beschriebenen PCR-Amplifikationen ein umfassender Datensatz partieller *phy*-Sequenzen von Bryophyta, Pteridophyta und Gymnospermae erstellt werden. Im Folgenden werden die Topologien von Stammbäumen verglichen, die anhand partieller *phy*-Sequenzen von 570 bzw. 2955 Charakteren erhalten wurden.

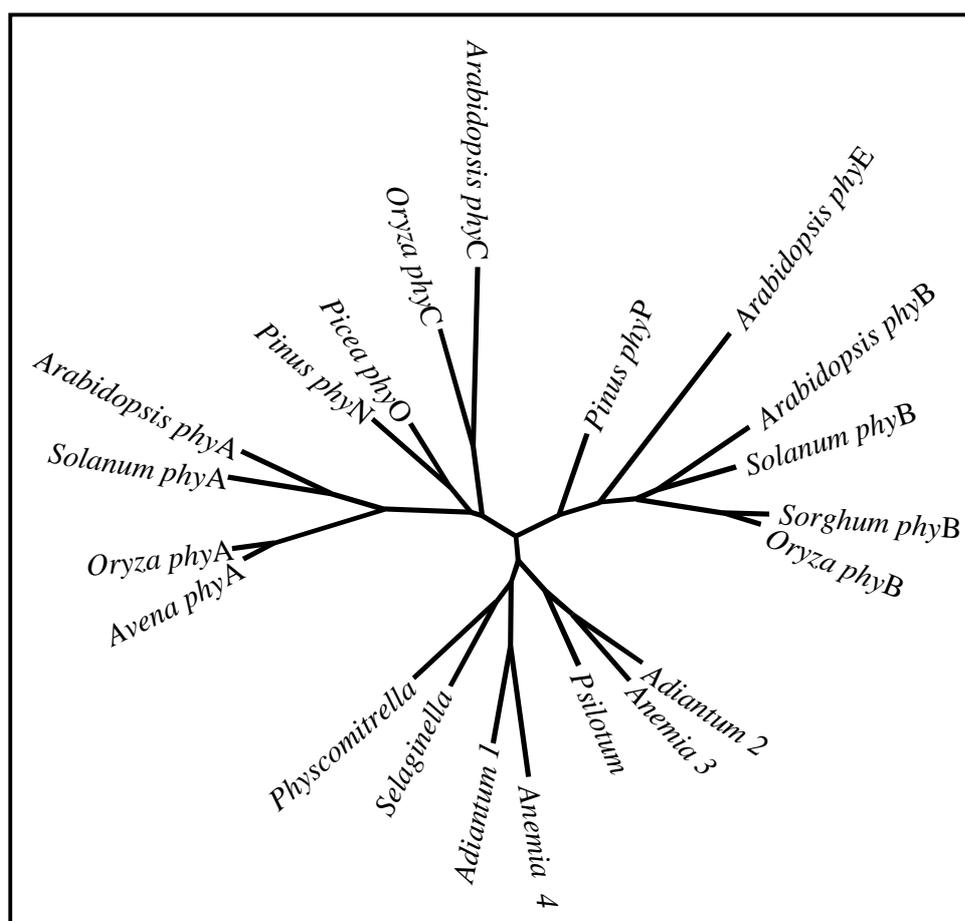


Abb. 3.13: Ungewurzelter, phylogenetischer Stammbaum errechnet aus 21 *phy*-Nukleotidsequenzen (2955 Charaktere, Maximum-Likelihood Analyse).

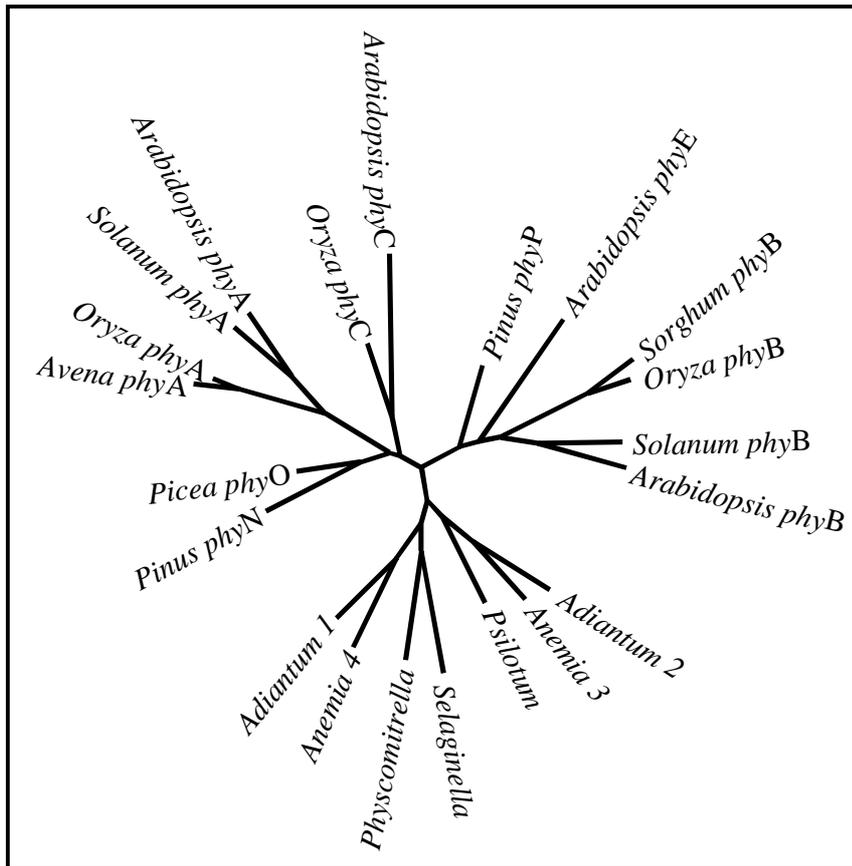


Abb 3.14: Ungewurzelter, phylogenetischer Stammbaum errechnet aus 21 partialen *phy*-Sequenzen (570 Charaktere, Maximum-Likelihood Analyse).

Die Topologien der in Abb. 3.13 und 3.14 dargestellten Stammbäume stimmen vollständig überein, wenn man von der programmbedingten unterschiedlichen Anordnung der einzelnen Äste absieht. Für beide Datensätze wurden Distanz-, Parsimony- und Maximum-Likelihood-Analysen durchgeführt. Abgesehen von einem Unterschied führten alle Analysen zu dem gleichen Ergebnis. Parsimony Analysen der kurzen Sequenzen (570 bp) konnten die Auftrennung von Gymnospermen und Angiospermen nicht auflösen, hier zweigten zuerst die *phyB*-Gene der Monokotylen ab und erst im Anschluß *phyP* von *Pinus* (Stammbaum nicht gezeigt, <50). Diese veränderte Topologie kann durch unterschiedliche Evolutionsraten der einzelnen Gentyten bedingt sein, wodurch Parsimony Analysen zu veränderten Stammbaumtopologien führen können (Felsenstein 1978). Betrachtet man die Astlängen der Taxa auf der *phyB*-Genlinie (Abb. 3.13, 3.14), so fällt auf, daß *Pinus phyP* im Vergleich zu den Angiospermen einen wesentlich kürzeren Ast besitzt und somit weniger Mutationen im Verlauf der Zeit angehäuft hat. Die Einordnung dieser Sequenz innerhalb der B-Genlinie könnte bei Parsimony-Analysen somit problematisch sein, da ihre Evolutionsgeschwindigkeit im Vergleich zu den anderen *phyB*-Sequenzen langsamer ist.

Hingegen führten Distanz- und Maximum-Likelihood Analysen zu identischen Ergebnissen. Daher wurden die übereinstimmenden Topologien der Maximum-Likelihood-Analysen beispielhaft dargestellt (Abb. 3.13 und 3.14).

Ein weiterer Unterschied zwischen den dargestellten Stammbäumen in Abb. 3.13 und 3.14 zeigt sich auch hier in den Astlängen der Taxa. Der Grund hierfür liegt, wie bereits erwähnt, in der größeren Anzahl von Sequenzunterschieden für Teilsequenzen (2955 Charaktere *phy*-Teilsequenzen im Vergleich mit 570 Charakteren von partialen *phy*-Sequenzen), woraus sich größere genetische Distanzen zwischen den einzelnen Taxa innerhalb der Stammbäume ergeben.

Folglich beinhalten 570 Charaktere von partialen *phy*-Sequenzen ausreichend Information für phylogenetische Analysen, um Zusammenhänge zu belegen, die anhand von *phy*-Teilsequenzen (2955 Charaktere) berechnet werden können. Vorsicht ist jedoch bei der Deutung der erhaltenen Stammbaumtopologien geboten, da bedingt durch die differenten Evolutionsraten innerhalb der Genlinien, veränderte Topologien erhalten werden können. Um Unsicherheiten der Verzweigungsmuster erkennen zu können, wurden die im Rahmen dieser Arbeit erstellten molekularen Phylogenien mit drei Analysemethoden durchgeführt.

3.3.4 Molekulare Phylogenie der Gymnospermae anhand von partialen Phytochromgenen: *phyO*, *phyN* und *phyP*

Nachdem feststand, daß sich das Verzweigungsmuster von phylogenetischen Bäumen nicht änderte, wenn anstelle von 2955 bp langen Sequenzen nur solche mit 570 bp Länge verwendet wurden, d.h. phylogenetische Beziehungen wohl durch kurze Sequenzen richtig wiedergegeben werden, wurden den Bäumen neue Sequenzen hinzugefügt. Im Laufe der Arbeit wurden 56 derartige Sequenzen im Hinblick auf Gymnospermen über PCR (s. 2.2.2.2) erzeugt. Sie sind (fettgedruckt) mit bereits bekannten Sequenzen in der Tab. 3.4 aufgelistet (Sequenzen von Farnen und Moosen werden in einer zweiten Tabelle gezeigt):

Tab. 3.4: Für die folgenden phylogenetischen Analysen verwendete partiale *phy*-Sequenzen und ihre Accession-Nummern. Fettgedruckte Sequenzen wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt:

<u>Coniferophytina</u>		<i>phy</i> -Gen	Accession-Nr.
<u>Ginkgoatae</u>			
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i> L.	<i>phyN1</i>	AJ286637
		<i>phyO</i>	AJ286638
		<i>phyP</i>	X98698
		<i>phyP/PS</i>	X98699
<u>Pinatae</u>			
Araucariaceae	<i>Agathis dammara</i> (Lamb.) L.C. Rich.	<i>phyN2</i>	AJ286620
		<i>phyO</i>	AJ286619
		<i>phyP</i>	AJ286621
Araucariaceae	<i>Araucaria araucana</i> (Mol.) K. Koch.	<i>phyN2</i>	AJ286617
		<i>phyO</i>	AJ286616
		<i>phyP</i>	AJ286618

Cephalotaxaceae	<i>Cephalotaxus fortunei</i> Hook.	phyN1	AJ286629
		phyN2	AJ286630
Cupressaceae	<i>Chameacyparis lawsoniana</i> (A. Murr.) Parl	phyO	AJ286632
		phyP	AJ286631
Cupressaceae	<i>Cupressus sempervirens</i> L.	phyN1	AJ286626
		phyO	AJ286627
		phyP	AJ286625
Cupressaceae	<i>Juniperus phoenicea</i> L.	phyP	AJ286639
Cupressaceae	<i>Thuja plicata</i> Donn ex. D.Don.	phyN1	AJ286662
		phyN2	AJ286663
		phyO	AJ286661
Phyllocladaceae	<i>Phyllocladus trichomanoides</i> D. Don.	phyN1	AJ286650
Pinaceae	<i>Larix decidua</i> Mill.	phyN1	AJ286641
		phyO	AJ286640
Pinaceae	<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco.	phyN1	U22458
		phyP	AJ286651
Pinaceae	<i>Picea abies</i> (L.) Karst.	phyO	U60264
		phyP	X80298
Pinaceae	<i>Pinus sylvestris</i> L.	phyN1/PG	AJ286646
		phyN1	AJ286647
		phyN1/Allel	AJ286648
		phyO	AJ286645
		phyP	X96738
		phyP/Allel	AJ286649
		phyN2	AJ286668
Podocarpaceae	<i>Dacrydium cupressinum</i> Soland. Ex Lamb.		
Podocarpaceae	<i>Dacrydium franklinii</i> Lamb.	phyN2	AJ286634
		phyO	AJ286635
		phyP	AJ286633
Podocarpaceae	<i>Podocarpus neriifolius</i> D.Don.	phyN1	AJ286652
Podocarpaceae	<i>Saxegothaea conspicua</i> Lindl.	phyN1	AJ286654
		phyN2	AJ286655
Sciadopityaceae	<i>Sciadopitys verticillata</i> Sieb. et Zucc.	phyN1	AJ286657
		phyP	AJ286656
Taxaceae	<i>Taxus baccata</i> L.	phyP	Y13796
Taxaceae	<i>Torreya nucifera</i> (L.) Sieb. et Zucc.	phyN1	AJ286664
		phyN2	AJ286665
		phyP	AJ286666
Taxodiaceae	<i>Cryptomeria japonica</i> (L.f.) D.Don.	phyN1	AJ286624
		phyO	AJ286622
		phyP	AJ286625
Taxodiaceae	<i>Sequoiadendron giganteum</i> (Lindl.) Buchh.	phyN1	AJ286653
Taxodiaceae	<i>Metasequoia glyptostroboides</i> Hu et Cheng	phyP	X80297
Taxodiaceae	<i>Taxodium distichum</i> (L.) L.C. Rich.	phyN1	AJ286659
		phyP	AJ286660
<u>Cycadatae</u>			
Cycadaceae	<i>Cycas revoluta</i> Thunb.	phyO	Y07571
		phyP	AJ286628
Stangeriaceae	<i>Stangeria eriopus</i> (Kunze) Nash.	phyP	AJ286658
Zamiaceae	<i>Macrozamia communis</i> Miq.	phyN1	AJ286642
		phyO	AJ286644
		phyP	AJ286643
<u>Gnetatae</u>			
Ephedraceae	<i>Ephedra major</i> Hast.	phyN	X80292
Gnetaceae	<i>Gnetum gnemon</i> L.	phyN	AJ286636
		phyP	X80295
Welwitschiaceae	<i>Welwitschia mirabilis</i> Hook. f.	phyN	AJ286667
		phyP	Y13794

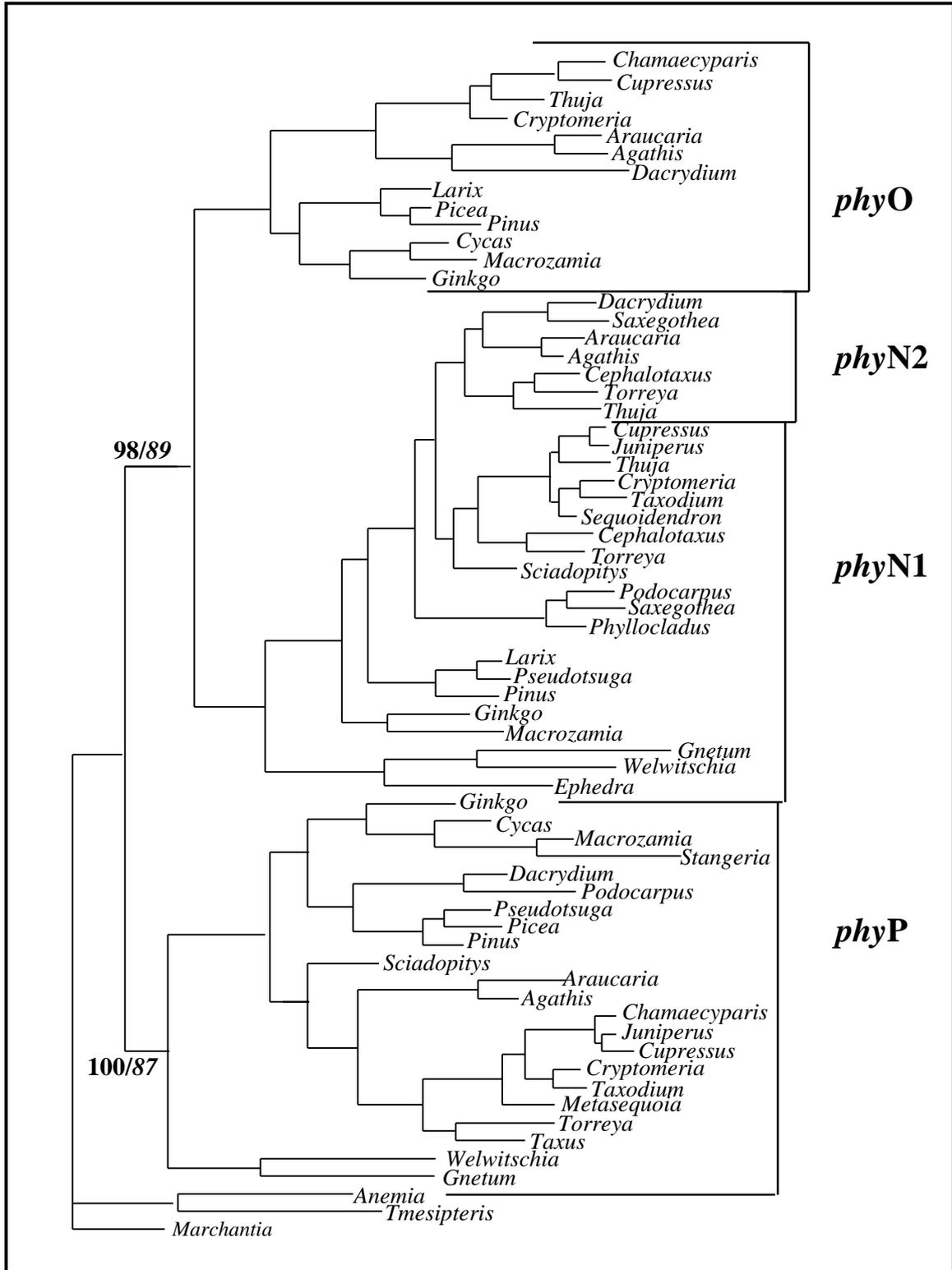


Abb. 3.15: Phylogenetischer Stammbaum errechnet aus 66 partialen *phy*-Sequenzen von Gymnospermen mit *Marchantia*, *Tmesipteris* und *Anemia* als Outgroup-Organismen. Die Topologie des Stammbaumes entstammt einer Distanzanalyse berechnet aus 537 variablen Charakteren (Kimura-2-Parameter, Neighbor-Joining Baumkonstruktionsmethode).

Vereinigt man alle Sequenzen von Gymnospermen zu einem Baum, so ergibt sich das Bild von Abb. 3.15. Deutlich sind drei Genlinien zu erkennen: N, O und P. Eine erste Genduplikation erfolgte in die Genlinien N/O und P (<50), eine weitere Genduplikation in N und O (98/89). Auf allen drei Linien sind *Ginkgo*, *Macrozamia*, *Pinus*, *Agathis*, *Araucaria* und *Cupressus* vertreten. Es ist anzunehmen, daß dort, wo nicht alle Linien mit der gleichen Gattung besetzt sind, die anderen Mitglieder der Genlinien nicht gefunden werden konnten. Innerhalb der N-Genlinie erfolgte eine weitere Aufspaltung (*phyN2*), die aber keine Sequenzen von Pinaceae, *Ginkgo*, Cycadatae und Gnetatae enthält. Diese Duplikation erfolgte möglicherweise erst nach der Abspaltung der Pinaceae von den übrigen Pinatae (= Coniferae). Im Hinblick auf die Anzahl der Genlinien in Gymnospermen ist die Auflösung der erhaltenen molekularen Phylogenie ausreichend. Möchte man aber mittels der Phytochromphylogenie Aussagen über die Entwicklungsgeschichte der Gymnospermen machen, so ist dies noch unbefriedigend. Es wurde erwartet, daß die Verzweigungsordnung bei allen Genlinien übereinstimmt. Dies ist jedoch bei den Pinaceae und den Podocarpaceae sowie deren Position im Verhältnis zu *Ginkgo* und Cycadatae nicht der Fall. Die größte Übereinstimmung auf allen drei Genlinien erhalten die Araucariaceae, Taxaceae, Taxodiaceae und Cupressaceae.

Durch Konzentration auf jeweils nur eine Phytochromgenlinie, wurde der Versuch unternommen, eine genauere Bestimmung der Stammbaumtopologien zu erhalten. Als Outgroup-Organismen wurden in allen Analysen *Marchantia*, *Tmesipteris* und *Anemia* definiert. Vorherige Tests hatten ergeben, daß die Toplogien der Stammbäume keine Abhängigkeit von der Outgroup zeigten. Im Folgenden werden synoptische Stammbäume dargestellt, die die Informationen von Distanz- und Parsimony-Analysen wiedergeben. Die Bootstrapwerte werden in Klammern angegeben, wobei normalgedruckte Werte Distanzanalysen und kursivgedruckte Werte Parsimonyanalysen entstammen. Werden in den dargestellten Stammbäumen Bootstrapwerte von Distanz- und Parsimonyanalysen an einer Verzweigung angegeben, so wurde dieses Verzweigungsmuster von beiden Methoden unterstützt. Fehlen ein bzw. zwei Werte an einer Verzweigung, so wurde diese Topologie nur mit Bootstrapwerten <50 unterstützt. Für einen Überblick werden in Tabelle 3.8 die grundlegenden Topologien aller Analysen aufgelistet. Ergebnisse von Maximum-Likelihood Analysen werden im Text erläutert.

3.3.4.1 Molekulare Phylogenie der Gymnospermae anhand von partialen *phyO*-Sequenzen

Von *phyO* konnten die wenigsten Vertreter gefunden werden. Z.B. konnte *phyO* nicht in rezenten Gnetatae nachgewiesen werden, so daß kein Vertreter von dieser Gruppe in Abb. 3.16 vorkommt.

Die in Abb. 3.16 dargestellte Phylogenie der *phyO*-Sequenzen unterstützt eine Aufteilung der Gymnospermen in folgende Gruppen (92/96):

- *Ginkgo* stellt eine Gruppe mit den Cycadatae dar (75/63), die einen gemeinsamen Vorfahren mit den Pinaceae (*Larix*, *Picea*, *Pinus*) teilen (89/64)
- die Pinatae (ohne Pinaceae) bilden eine Gruppe (57), die einem gemeinsamen Vorfahren entspringt. Maximum-Likelihood und Distanzanalysen ergaben, daß Araucariaceae und Podocarpaceae einen Vorfahren teilten (<50, monophyletisch); Parsimonyanalysen stellten die Podocarpaceae als Schwestergruppe der gesamten Kronengruppe (Araucariaceae, Taxodiaceae, Cupressaceae) dar (paraphyletisch).

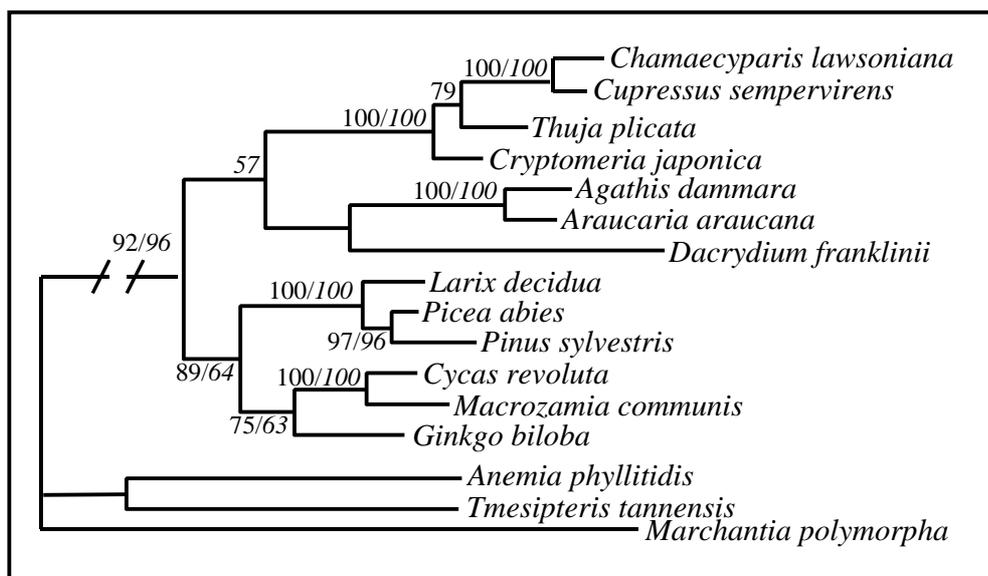


Abb. 3.16: Phylogenetischer Stammbaum errechnet aus 13 partialen *phyO*-Sequenzen von Gymnospermen mit *Marchantia*, *Tmesipteris* und *Anemia* als Outgroup. Die Topologie des Stammbaumes entstammt einer Distanz-Analyse berechnet aus 352 variablen Charakteren (Kimura-2-Parameter, Neighbor-Joining Baumkonstruktionsmethode). Bootstrapwerte von 1000 berechneten Datensätzen von Distanz- und Parsimony-Analysen (Heuristische Suche, TBR-Branch-Swapping), die die gleiche Topologie unterstützten, sind an den jeweiligen Verzweigungen angegeben, wobei Bootstrapunterstützungen aus Parsimony-Analysen kursivgedruckt sind. Bootstrapwerte < 50 wurden nicht eingezeichnet.

Die erhaltenen Gruppierungen auf der Basis von *phyO*-Teilsequenzen sind nicht in Übereinstimmung mit klassischen systematischen Ansichten (Sitte *et al.* 1999, Page 1990). So wird der Gruppe der Pinaceae innerhalb der Pinatae eine ursprüngliche Stellung zugeordnet (Fu 1992, Hart 1987), jedoch kein gemeinsamer Ursprung mit Cycadatae und Ginkgoatae, wie die hier durchgeführten Analysen anhand von partialen *phyO*-Sequenzen ergaben.

Daß *Ginkgo* und Cycadatae einen Vorfahren teilen, wird ebenfalls durch andere molekulare Daten unterstützt (18S rRNA: Chaw *et al.* 1997, *rpoC1*: Samigullin *et al.* 1999). Weitere Merkmale, wie z.B. das Vorkommen von Spermatozoiden in beiden Gruppen, könnten einen möglichen gemeinsamen Ursprung unterstützen.

Durch sowohl klassische (Page 1990, Sitte *et al.* 1999) als auch molekulare Analysen (Chaw *et al.* 1997, Stefanovic *et al.* 1998) belegt, ist die gemeinsame Abstammung der Kronengruppe Pinatae (ohne Pinaceae), die auch von Phytochromsequenzen widergespiegelt wird (84/57).

3.3.4.2 Molekulare Phylogenie der Gymnospermae anhand von partialen *phyN*-Sequenzen

Abb. 3.17 zeigt die molekulare Phylogenie von *phyN1/N2*-Teilsequenzen. Innerhalb der N-Genlinie ist es bei Gymnospermen zu einer weiteren Genduplikation in N1 und N2 gekommen (92/79). Kodierende N2-Sequenzen konnten nur bei Mitgliedern der Pinatae außer Pinaceae gefunden werden, so daß möglicherweise diese Genduplikation fast zeitgleich mit der Entwicklung der Pinatae erfolgte. Dies könnte außerdem durch die Beobachtung erhärtet werden, daß in *Pinus* ein Pseudogen der N-Linie gefunden wurde (s. 3.2.1, *phyN*-PG). Das Pseudogen könnte ein Relikt dieses Duplikationsereignisses sein, welches bei einem gemeinsamen Vorfahren der Pinatae inklusive Pinaceae stattfand.

Da es im Anschluß an eine Genduplikation meist zu einem Anstieg der Evolutionsraten kommt (Goodman 1981, Czelusniak 1982), könnten die Evolutionsraten zwischen den untersuchten Taxa in dieser Linie variieren und dadurch von *phyO* abweichende phylogenetische Zusammenhänge widerspiegeln. Die erhaltenen phylogenetischen Zusammenhänge der Gymnospermen sollten daher unter diesem Gesichtspunkt betrachtet werden.

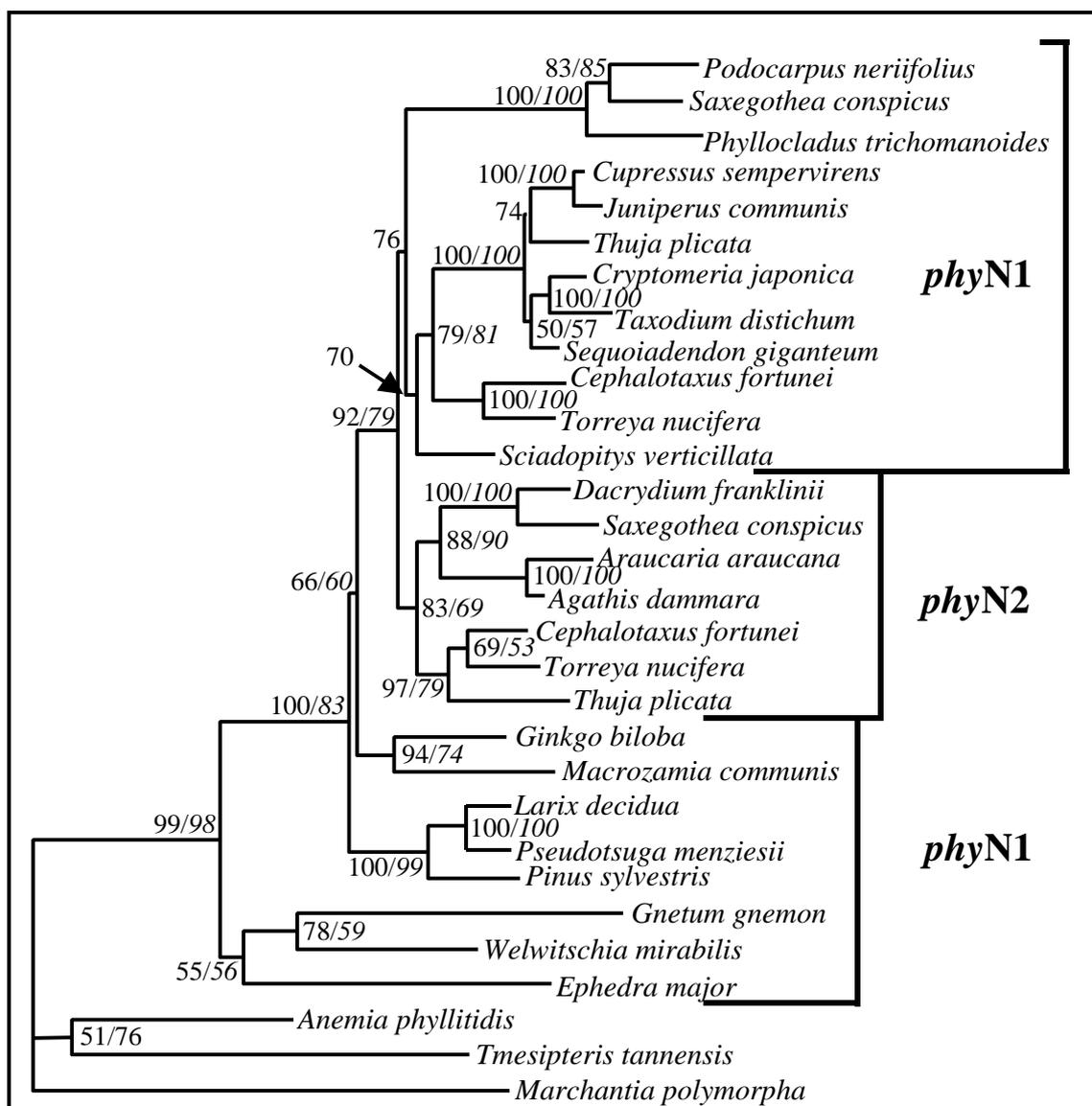


Abb. 3.17: Phylogenetischer Stammbaum errechnet aus 27 partialen *phyN1/N2*-Sequenzen mit *Marchantia*, *Anemia* und *Tmesipteris* als Outgroup. Die Stammbaum-Topologie entstammt einer Distanzanalyse berechnet aus 409 variablen Charakteren und entspricht dem kürzesten Stammbaum einer Parsimony-Analyse mit einer Länge von 2063 evolutiven Schritten bei 319 analysierten parsimony-informativen Charakteren. Bootstrapwerte von 1000 berechneten Datensätzen von Distanz- und Parsimony-Analysen (Heuristische Suche, TBR-Branch-Swapping), die die gleiche Topologie unterstützten, sind an den jeweiligen Verzweigungen angegeben, wobei Bootstrapunterstützungen aus Parsimony-Analysen kursivgedruckt sind. Bootstrapunterstützungen <50 wurden nicht eingezeichnet.

Die Gnetatae vertreten durch *Ephedra*, *Welwitschia* und *Gnetum* entstammen einem gemeinsamen Vorfahren (55/56). Im Vergleich zu den anderen Gymnospermen stellen sie eine deutlich abgegliederte Gruppe dar (ein langer Ast trennt diese Gruppe von den anderen Taxa).

Die Position der Pinaceae ist in Abb. 3.17 im Vergleich zu den phylogenetischen Analysen anhand von *phyO* (Abb. 3.16) verändert. Sie sind in diesem Fall eine Schwestergruppe der Ginkgoatae, Cycadatae und übrigen Pinatae (100/83) und wären eine sehr ursprüngliche Gruppe der Gymnospermen, ursprünglicher als *Ginkgo* und Cycadatae. Diese Position ist sehr unwahrscheinlich, da (1) sich Spermatozoide bei *Ginkgo* und Cycadatae hätten rückbilden müssen und (2) eine Analyse des Plastidengenoms einen gemeinsamen Ursprung aller Pinatae, also auch der Pinaceae, belegt und die Pinatae als abgeleitete Gruppe der Cycadatae und *Ginkgo* darstellt (Raubeson und Jansen 1992). Hier kann die unerwartete Einordnung der Pinaceae möglicherweise durch die differierenden Evolutionsraten erklärt werden. Da in den Pinatae außer Pinaceae eine Genduplikation in N2 erfolgte, könnten die Mutationsraten der N2 Genlinie erhöht i.V. zu N1 sein. Diese Tatsache kann verzerrte Phylogenien der untersuchten Taxa bedingen (Felsenstein 1978). Durch diese Analysen wird jedoch die Annahme genährt, daß die Pinaceae, wenn überhaupt, dann an der Basis der Pinatae stehen.

Die gemeinsame Abstammung von *Ginkgo* und Cycadatae wird von *phyN1* mit 94/74 unterstützt, wie zuvor auch in Analysen von *phyO*.

Auf beiden Genlinien, *phyN1* und *phyN2*, bilden Taxaceae, Taxodiaceae und Cupressaceae eine Gruppe (N1: 79/81, N2: 97/79). Die Cephalotaxaceae zeigen zudem eine nahe phylogenetische Verwandtschaft zu den Taxaceae (N1: 69/53, N2: 100/100). *phyN2* unterstützt die gemeinsame Abstammung von Podocarpaceae und Araucariaceae (88/90), die eine Schwestergruppe der Taxaceae/Taxodiaceae/Cupressaceae-Gruppe sind. Auch *phyN1* ordnet die Podocarpaceae als Schwestergruppe der Taxaceae/Taxodiaceae/Cupressaceae-Gruppe zu (76). Diese Verzweigungen entsprechen den Verhältnissen der Analysen von O-Sequenzen.

Sciadopitys ist auf der *phyN*-Genlinie die Schwestergruppe der Taxaceae/Taxodiaceae/Cupressaceae-Gruppe (70).

3.3.4.3 Molekulare Phylogenie der Gymnospermae anhand von partialen *phyP*-Sequenzen

Auch die molekulare Phylogenie anhand von partialen *phyP*-Sequenzen zeigt *Welwitschia* und *Gnetum* als Schwestergruppe der rezenten Vertreter der Gymnospermen (98/98, Abb. 3.18). Ebenfalls teilen sie hier einen gemeinsamen Vorfahren (97/93), wie es zuvor Analysen von *phyN* ergaben. Für *Ephedra* konnte kein *phyP*-Gen mittels PCR amplifiziert werden und auch genomische Southern-Blot-Analysen wiesen auf nur ein Phytochromgen im Genom von *Ephedra* hin (Daten nicht gezeigt).

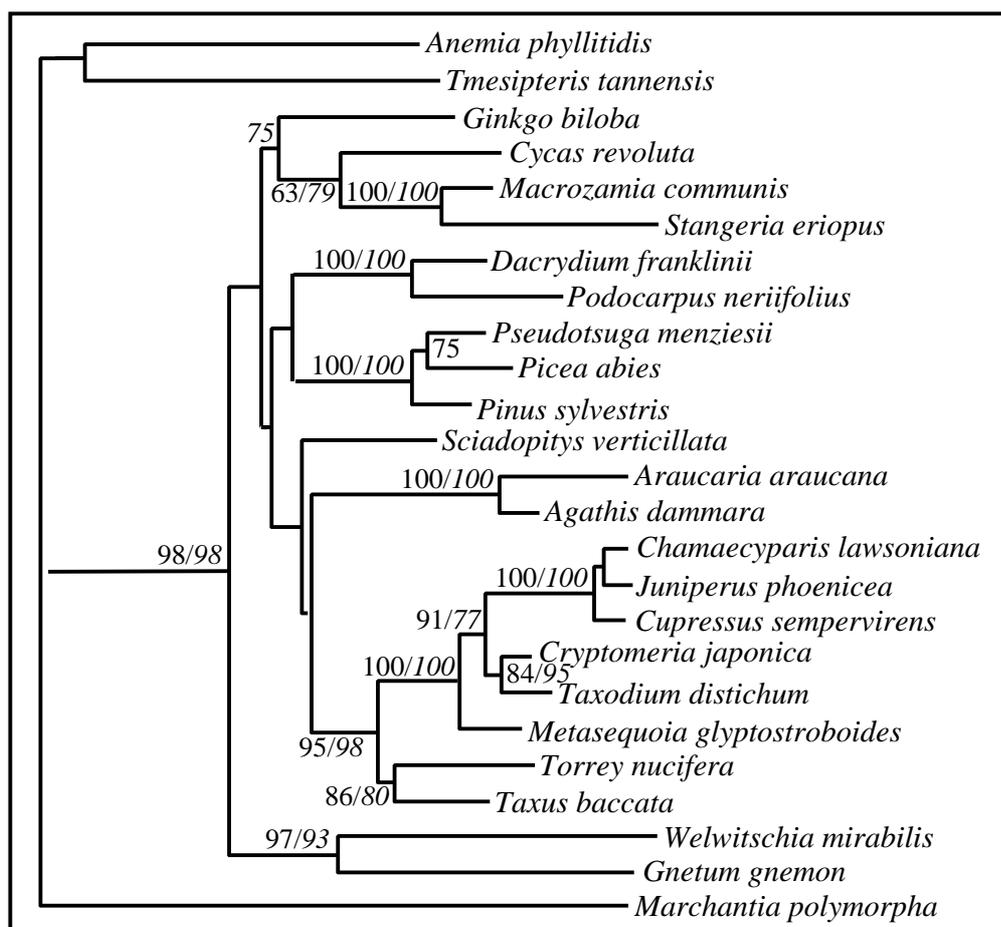


Abb. 3.18: Phylogenetischer Stammbaum errechnet aus 22 partialen *phyP*-Sequenzen mit *Marchantia*, *Anemia* und *Tmesipteris* als Outgroup. Die Stammbaum-Topologie entstammt einer Distanzanalyse berechnet aus 368 variablen Charakteren und entspricht dem kürzesten Stammbaum einer Parsimony-Analyse mit einer Länge von 1865 evolutiven Schritten bei 278 analysierten parsimony-informativen Charakteren. Bootstrapwerte von 1000 berechneten Datensätzen von Distanz- und Parsimony-Analysen (Heuristische Suche, TBR-Branch-Swapping), die die gleiche Topologie unterstützten, sind an den jeweiligen Verzweigungen angegeben, wobei Bootstrapunterstützungen aus Parsimony-Analysen kursivgedruckt sind. Bootstrapunterstützungen <50 wurden nicht eingezeichnet.

Ginkgo und Cycadatae entstammen einem gemeinsamen Vorfahren (75), wie auch die phylogenetischen Analysen anhand von *phyO* und *phyN* ergaben (Abb. 3.16 und 3.17). Im Unterschied zu den Analysen von *phyN*- und *phyO*-Sequenzen sind sie hier jedoch getrennt von den Pinaceae. Diese Position wird auch von anderen molekularen Daten unterstützt (Chaw *et al.* 1997, Stefanovic *et al.* 1998, Samigullin *et al.* 1999).

Abweichend von den vorherigen Analysen ordnen *phyP*-Sequenzen die Pinaceae den Podocarpaceae zu, wobei die Bootstrapwerte von Distanz- und Parsimony-Analysen <50 sind. Somit ist diese Gruppierung statistisch nicht abgesichert.

Sciadopitys ist, wie auch bei *phyN1*, die Schwestergruppe der Araucariaceae /Taxaceae/Taxodiaceae/Cupressaceae-Gruppe vor, jedoch auch hier mit Bootstrapwerten <50. Die Araucariaceae sind mit ebenfalls niedrigen Bootstrapwerten eine Schwestergruppe der Taxaceae/Taxodiaceae/Cupressaceae-Gruppe. Die Position der Araucariaceae entspricht folglich den vorangegangenen Analysen. Die gemeinsame Abstammung der Taxaceae/Taxodiaceae/Cupressaceae-Gruppe wird mit hohen Bootstrapwerten abgesichert (95/98). Innerhalb dieser Gruppe stellen die Taxaceae die ursprünglichste Gruppe dar (86/80), gefolgt von Taxodiaceae (100/100). Auch die Cupressaceae bilden erneut die gut abgesicherte Kronengruppe innerhalb der Pinatae (100/100).

Die molekularen Phylogenien der Gymnospermae, die anhand von *phyO*, *phyN1/N2* und *phyP* erhalten werden konnten, zeigen für die drei untersuchten Genlinien sowohl Übereinstimmungen zueinander als auch Abweichungen untereinander.

Alle Analysen unterstützen einen gemeinsamen Vorfahren der Gnetatae, den sie mit einem Vorfahren der rezenten Angiospermen geteilt haben. Sie sind anhand dieser molekularen Phylogenien die basale Gruppe der Gymnospermen und die nächsten Verwandten der Angiospermen.

Ginkgo und Cycadatae stellen die nächstursprüngliche Gruppe innerhalb der Gymnospermen dar, die einen gemeinsamen Vorfahren teilten. Dies wird von allen untersuchten Datensätzen und mit allen Analysemethoden bestätigt.

Die Gruppe der Pinatae, exclusiv der Pinaceae, wurde in allen Fällen als gemeinsame Abstammungsgruppe erkannt. Innerhalb dieser Gruppe stellten die *Sciadopityaceae* die ursprünglichsten Vertreter dar, gefolgt von den Podocarpaceae und Araucariaceae.

Die Stellung der Pinaceae variierte bei den einzelnen Datensätzen der untersuchten partialen Phytochromgenfragmente. Die höchsten statistischen Absicherungen deuteten auf eine Verwandtschaft zu *Ginkgoatae* und Cycadatae (*phyO*: 89/64, *phyN1*: 100/83) hin, in jedem Fall jedoch eine Abseitstellung zu den restlichen Familien der Pinatae.

Nicht eindeutig geklärt verblieb anhand der phylogenetischen Analysen die Stellung der Podocarpaceae. Auch in diesem Fall ergaben die Einzelanalysen unterschiedliche Zuordnungen. Zwei Analysen ordeten die Podocarpaceae als Schwestergruppe der Araucariaceae zu (*phyO*: <50, *phyN2*: 88/90). Die Topologien der Stammbäume ergeben aber in jedem Fall eine Zugehörigkeit der Podocarpaceae zu den Pinatae.

Um die dargelegten Unterschiede der Einzelanalysen besser beurteilen zu können, wurden phylogenetische Analysen mit kombinierten Datensätzen der einzelnen partialen *phy*'s und weiterhin mit 18S rRNA Daten durchgeführt.

3.3.5 Molekulare Phylogenie anhand kombinierter Datensätze

3.3.5.1 *phyO+phyN+phyP*

Für die folgende phylogenetische Analyse wurden Datensätze kombiniert, d.h. Sequenzen von Organismen, die mit Sicherheit einer Gruppe angehören, aneinandergereiht. Das Alignment wurde mit dem Programm Pileup im GCG-Programmpaket erstellt und von Hand nacheditiert. Der erhaltene Stammbaum repräsentiert demnach die Abstammung der Familien der Gymnospermen, im Falle der Cycadatae und Gnetatae der gesamten Klasse. Die Zusammenstellung der Einzelsequenzen in diesem Gesamtalignment ist in Tab. 3.6 gezeigt. Der gesamte Datensatz enthält 13 Taxa mit 1806 Charakteren von denen 763 konstant sind, 331 parsimony-uninformativ und 713 parsimony-informativ sind.

Tab. 3.6: Kombiniertes Datensatz für das Alignment der partialen *phy*-Sequenzen *phyO*, *phyN1/N2* und *phyP* der Gymnospermae und *phyA*, *phyC* und *phyB* der Angiospermae.

Familie	<i>phyO</i>	<i>phyN1/N2</i>	<i>phyP</i>
Cupressaceae I:	<i>Cupressus phyO</i>	<i>Cupressus phyN1</i>	<i>Cupressus phyP</i>
Cupressaceae II:	<i>Chamaecyparis phyO</i>	<i>Juniperus phyN1</i>	<i>Juniperus phyP</i>
Taxodiaceae:	<i>Cryptomeria phyO</i>	<i>Taxodium phyN1</i>	<i>Taxodium phyP</i>
Araucariaceae:	<i>Agathis phyO</i>	<i>Agathis phyN2</i>	<i>Agathis phyP</i>
Podocarpaceae:	<i>Dacrydium phyO</i>	<i>Dacrydium phyN2</i>	<i>Dacrydium phyP</i>
Pinaceae I:	<i>Picea phyO</i>	<i>Pseudotsuga phyN1</i>	<i>Picea phyP</i>
Pinaceae II:	<i>Pinus phyO</i>	<i>Pinus phyN1</i>	<i>Pinus phyP</i>
Ginkgoatae:	<i>Ginkgo phyO</i>	<i>Ginkgo phyN1</i>	<i>Ginkgo phyP</i>
Cycadatae:	<i>Macrozamia phyO</i>	<i>Macrozamia phyN1</i>	<i>Macrozamia phyP</i>
Gnetatae:	<i>Ephedra phyN</i>	<i>Welwitschia phyN</i>	<i>Welwitschia phyP</i>
Arabidopsis:	<i>Arabidopsis phyC</i>	<i>Arabidopsis phyA</i>	<i>Arabidopsis phyB</i>
Sorghum:	<i>Sorghum phyC</i>	<i>Sorghum phyA</i>	<i>Sorghum phyB</i>

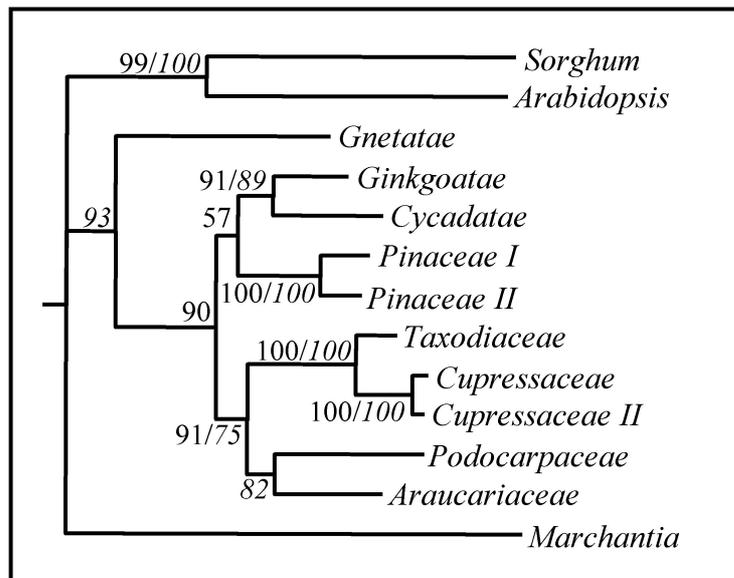


Abb. 3.19: Phylogenetischer Stammbaum errechnet aus kombinierten Datensätzen der partialen *phyO*, *phyN1/N2* und *phyP*-Sequenzen mit *Marchantia* als Outgroup (1806 Charaktere). Die Stammbaum-Topologie entstammt einer Maximum-Likelihood-Analyse berechnet aus allen Charakteren. Bootstrapwerte von 1000 berechneten Datensätzen von Distanz- und Parsimony-Analysen (Heuristische Suche, TBR-Branch-Swapping), die die gleiche Topologie unterstützten, sind an den jeweiligen Verzweigungen angegeben, wobei Bootstrapunterstützungen aus Parsimony-Analysen kursivgedruckt sind. Bootstrapwerte <50 wurden nicht angegeben.

Abb. 3.19 zeigt, daß der anhand einer kombinierten Datenmatrix aus partialen *phyO*-, *phyN1/N2*- und *phyP*-Sequenzen errechnete phylogenetische Stammbaum die unter 3.3.4 beobachteten Zusammengehörigkeiten innerhalb der Gymnospermae unterstützt:

- die Gnetatae stellen die ursprünglichste Gruppe der Gymnospermen dar und sind nach diesen molekularen Daten die nächsten Verwandten der rezenten Angiospermen innerhalb der Gymnospermen, Unterstützung durch Maximum-Likelihood- und Parsimony-Analysen (93). Distanzanalysen mit Kimura-2-Parameter-Distanzen ordnen die Gnetatae als Schwesterguppe von Gymno- und Angiospermen zu, wohingegen weitere Distanzanalysen (uncorrected oder absolute Distanzen bzw. Kimura-2-Parameter mit UPGMA-Baumkonstruktionsmethode) die Gnetatae den Gymnospermen mit 100 Bootstrapunterstützung zuordnen (Stammbäume nicht gezeigt).
- jede verwendete Analyseverfahren unterstützt, daß Taxodiaceae und Cupressaceae einem gemeinsamen Vorfahren entstammen (100/100).
- jede verwendete Analyseverfahren unterstützt, daß *Ginkgo* und Cycadatae einen gemeinsamen Vorfahren teilen (91/89).

Der hier dargestellte Stammbaum zeigt die Gnetatae als ursprünglichste Gruppe der Gymnospermen. Dies ist nur bedingt mit reproduktionsbiologischen Merkmalen vereinbar, da

Ginkgo und Cycadatae ein urtümliches Merkmal, die Befruchtung durch Spermatozoide, teilen. Bei den Gnetatae hingegen erfolgt die Befruchtung bereits durch Spermakerne der Pollenkörner, die mit einem Pollenschlauch auskeimen. Der gemeinsame und wahrscheinlich ausgestorbene Vorfahre von Gnetatae, *Ginkgo* und Cycadatae müßte nach den hier erhaltenen Phylogenien ursprüngliche Merkmale tragen, also wahrscheinlich eine Befruchtung mit begeißelten Stadien. Die Abkömmlinge dieses Vorfahren hätten in der Folge die eine oder andere Befruchtungsform entwickelt.

Bezüglich der durch die vorangegangenen Analysen nicht eindeutig zuzuordnenden Taxa Podocarpaceae und Pinaceae lassen sich anhand des vergrößerten Datensatzes folgende Zusammenhänge erkennen:

- die Podocarpaceae stehen in jeder der durchgeführten Analysen innerhalb der Araucariaceae/Taxodiaceae/Cupressaceae-Gruppe. Distanzanalysen zeigen die Podocarpaceae als Schwestergruppe dieses Clusters (91) (Stammbaum nicht gezeigt). Parsimony- und Maximum-Likelihood-Analysen unterstützen eine Auftrennung dieser Gruppe einerseits in die monophyletische Taxodiaceae und Cupressaceae-Gruppe, der die monophyletische Gruppe der Araucariaceae und Podocarpaceae gegenübersteht (75). Diese Position der Podocarpaceae (gemeinsame Abstammung mit Araucariaceae) stimmt mit den Ergebnissen anderer molekularer Phylogenien überein (28S rRNA: Stefanovic *et al.* 1998, 18S rRNA: Chaw *et al.* 1997) und auch mit der traditionellen systematischen Einordnung (Page 1990, Sitte *et al.* 1999).
- die Pinaceae stehen in jeder der durchgeführten Analysen abseits der übrigen Familien der Pinatae, wie bereits die vorangehenden Analysen der einzelnen *phy*-Sequenzen gezeigt haben (Abb. 3.16, 3.17, 3.18). Distanz- und Maximum-Likelihood-Analysen unterstützen einen gemeinsamen Vorfahren, den die Pinaceae mit der Ginkgoatae/Cycadatae-Gruppe teilten (57), wie es bereits die Einzelanalyse der *phyO*-Sequenzen ergab. Parsimony-Analysen ordnen die Pinaceae als Schwestergruppe der übrigen Gymnospermae exclusiv der Gnetatae ein (100). In diesem Fall wären sie Vorfahren der Ginkgoatae, Cycadatae und der übrigen Pinatae. Diese Position wurde ebenfalls von *phyP*-Einzelanalysen erhalten. In jedem Fall kommt den Pinaceae auch durch die Analysen der kombinierten *phy*-Sequenzen eine ursprüngliche Stellung innerhalb der rezenten Gymnospermen zu, wobei die Position auch hier variiert.

Generell sind in der Analyse des kombinierten Datensatzes alle Bootstrapwerte der Verzweigungen >50, also höher im Vergleich zu den Einzelanalysen. Die Position der Podocarpaceae wird besser abgesichert und führt in zwei von drei Analysen zu einer Einordnung, die durch morphologische und andere molekulare Daten unterstützt wird (Page 1990, Sitte *et al.* 1999, Chaw *et al.* 1997, Stefanovic *et al.* 1998). Die Einordnung der Pinaceae wird durch diese Analysen nach wie vor nicht eindeutig geklärt.

Um die Fragestellung der Position der Pinaceae eventuell lösen zu können, wurde der Phytochromdatensatz durch Hinzufügen von bekannten 18S rRNA-Sequenzen erweitert.

3.3.5.2 *phyO+phyN+phyP+18S rRNA*

Abschließend wurde der unter 3.3.5.1 verwendete Datensatz der partialen Phytochromsequenzen mit bereits veröffentlichten 18S rRNA-Sequenzen um 1823 Charaktere der 12 verwendeten Taxa erweitert (s. Tab. 3.7) (Chaw *et al.* 1993, 1995, 1997, Nairn und Ferl 1988, Rathgeber und Capesius 1990, Takaiwa *et al.* 1984). Der gesamte Datensatz enthält nun 3630 Charaktere von denen 2205 konstant und 531 parsimony-uninformativ sind.

Tab. 3.7: Kombiniertes Datensatz des Alignments der partialen *phyO*-, *phyN1/N2*- und *phyP*-Sequenzen sowie 18S rRNA Sequenzen.

<i>phyO + phyN1/N2 + phyP</i> - Datensatz	18S rRNA Sequenzen	Accession-Nr:
Cupressaceae I:	<i>Juniperus chinensis</i> L.	D38243
Taxodiaceae:	<i>Taiwania cryptomerioides</i> Hayata	D38250
Araucariaceae:	<i>Araucaria excelsa</i> (Lamb.) RBr.	D38240
Podocarpaceae:	<i>Dacrycarpus imbricatus</i> (Endl.)deLaub.	D38247
Pinaceae I:	<i>Abies lasiocarpa</i> (Hook.) Nutt.	X79407
Pinaceae II:	<i>Pinus elliottii</i> L.	D38245
Ginkgoatae:	<i>Ginkgo biloba</i> L.	D16448
Cycadatae:	<i>Zamia pumila</i> L.	M20017
Gnetatae:	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	D38242
Brassicaceae:	<i>Sinapis alba</i> L.	X17062
Poaceae:	<i>Oryza sativa</i> L.	X00755
Marchantiaceae:	<i>Marchantia polymorpha</i> L.	X75521

Die phylogenetische Analyse des kombinierten Datensatzes bestehend aus partialen *phyO*-, *phyN*- und *phyP*-Sequenzen sowie 18S rRNA Sequenzen ergibt folgende Zusammenhänge (Abb. 3.20):

- die Gymnospermen bilden eine monophyletische Gruppe
- die Gnetatae sind die Schwestergruppe der übrigen Gymnospermae (66/90)
- Cycadatae und Ginkgoatae entstammen einem gemeinsamen Vorfahren (100/79), sie sind die Schwestergruppe der Pinatae (Coniferae)
- Pinatae inklusive der Pinaceae teilen einen gemeinsamen Vorfahren (50), innerhalb dieser Gruppe können zwei Subgruppen erkannt werden: (1) Podocarpaceae und Araucariaceae sowie (2) Taxodiaceae und Cupressaceae.

Diese hier erhaltene Position der Pinaceae ist in Übereinstimmung mit anderen molekularen Daten (Chaw *et al.* 1997, Stefanovic *et al.* 1998), Analysen struktureller Merkmale des Plastidengenoms (Raubeson und Jansen 1992) sowie systematischer Einordnungen anhand morphologischer Daten (Hart 1987, Fu 1992, Page 1990, Sitte *et al.* 1999).

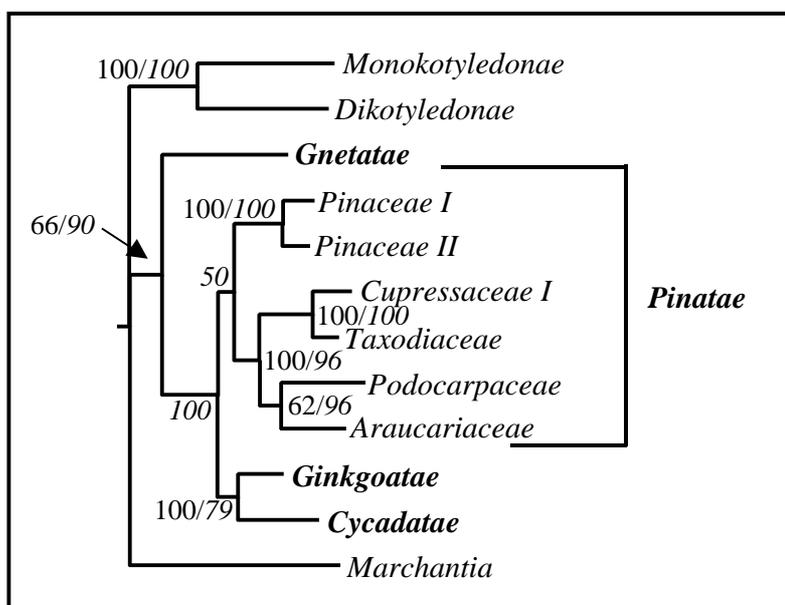


Abb. 3.20: Phylogenetischer Stammbaum errechnet aus 11 kombinierten Sequenzen der *partialen phyO*-, *phyN1/N2*- und *phyP*-Gene sowie 18S rRNA-Sequenzen mit *Marchantia* als **Outgroup** (3630 Charaktere). Die Stammbaumtopologie entstammt einer Maximum-Likelihood-Analyse berechnet aus allen Charakteren. Bootstrapwerte von 1000 berechneten Datensätzen von Distanz- und Parsimony-Analysen (Heuristische Suche, TBR-Branch-Swapping), die die gleiche Topologie unterstützen, sind an den jeweiligen Verzweigungen angegeben, wobei Bootstrapunterstützungen aus Parsimony-Analysen kursivgedruckt sind. Bootstrapwerte <50 sind nicht angegeben.

3.3.5.3 Zusammenfassende Darstellung der molekularen Phylogenie der Gymnospermae anhand von *phyN1/N2*, *phyO* und *phyP* sowie kombinierter Datensätze

Tab. 3.8 faßt die wichtigsten Ergebnisse der vorangehend dargestellten phylogenetischen Analysen der partialen Phytochromgene von Gymnospermen sowie der kombinierten Datensätzen zusammen.

Anhand der in Tab. 3.8 exemplarisch dargestellten Stammbaumtopologien der einzelnen phylogenetischen Analysen wird deutlich, daß einerseits die Analysen unterschiedlicher Datensätze, wie hier von drei Mitgliedern einer Genfamilie, nicht auf jeder Genlinie die gleichen phylogenetischen Zusammenhänge unterstützen, und daß zudem unterschiedliche Analysemethoden gleicher Datensätze verschiedene phylogenetische Zusammenhänge ergeben. Folglich müssen molekulare Phylogenien, v.a. von nukleär kodierenden Sequenzen, die durch Multigenfamilien vertreten sind, immer im Hinblick auf die Evolution der einzelnen Genlinien interpretiert werden. Durch unterschiedliche Evolutionsraten innerhalb der Genlinien können unerwartete Phylogenien erhalten werden, die erst durch das Verständnis der Evolution der analysierten Genlinie auswertbar werden. Die vorgestellten Analysen lassen den Schluß zu, daß molekulare Phylogenien auf der Basis von Einzelsequenzen v.a. die Evolution dieses Gens widerspiegeln und nur bedingt die phylogenetischen Verwandtschaften der Taxa zueinander. Durch die Kombination molekularer Daten kann, wie auch hier gezeigt, die Aussagekraft in Richtung der Evolution der Organismen unterstützt werden. So werden neuerdings für systematische Fragestellungen kombinierte molekulare Datensätze ausgewertet (Qiu *et al.* 1999, Soltis *et al.* 1999, Chaw *et al.* 2000, Bowe *et al.* 2000) und durch strukturelle Genommerkmale sowie morphologisch/anatomische und biochemische Merkmale ergänzt. Diese ganzheitliche Betrachtungsweise könnte zukünftig die Einordnung problematischer Gruppen ermöglichen.

Tab. 3.8: Zusammenfassende Darstellung einzelner Verzweigungsmuster der in der vorliegenden Arbeit berechneten Stammbäume (Ergebnisse der phylogenetischen Analysen von *phyN*, *phyO*, *phyP*, *phyN+phyO+phyP* sowie *phyN+phyO+phyP+18S rRNA*). Die angegebenen Werte sind Bootstrapunterstützungen von Parsimony- und Distanzberechnungen aus 1000 Datensätzen. Normalgedruckte Werte entsprechen Distanzanalysen, kursivgedruckte Werte entsprechen Parsimonyanalysen. n.a.: nicht analysiert; -: markiert, daß ein anderes Verzweigungsmuster mit dem angegebenen Bootstrapwert unterstützt wurde; *: bezieht sich nur auf eine Distanzanalyse nach dem Kimura-2-Parameter-Modell.

Untersuchte Datensätze →	<i>phyN1</i> / <i>N2</i>	<i>phyO</i>	<i>phyP</i>	<i>phyN+phyO+phyP</i>	<i>phyN+phyP+phyP+18 s rRNA</i>
↓ erhaltene Stammbaumtopologien					
Gymnospermae monophyletisch (inkl. Gnetales)	- <50* / 49	n.a.	-93* / <50	- <50 / 93	66 / 90
<i>Ginkgo</i> / Cycadatae	monophyletisch 94 / 74	monophyletisch 75 / 63	monophyletisch 75	monophyletisch 91 / 89	monophyletisch 100 / 79
Pinaceae	Schwestergruppe von <i>Ginkgo/Cycadatae</i> 100 / 83	monophyletische Gruppe mit <i>Ginkgo/Cycadatae</i> 89 / 64	Schwestergruppe von <i>Podocarpus</i> <50	- monophyletisch mit <i>Ginkgo/Cycadatae</i> 57; - paraphyletische Schwestergruppe 100	-monophyletisch mit <i>Ginkgo/Cycadatae</i> 52; - basale Gruppe der Coniferophytina 50
Araucariaceae / Podocarpaceae	monophyletisch 88 / 90	paraphyletisch < 50; monophyletisch < 50	nicht nah verwandt < 50 / < 50	paraphyletisch 91; monophyletisch 82	monophyletisch 62 / 96
Taxodiaceae / Cupressaceae / (Taxaceae) = ()	monophyletisch + () 79 / 81	monophyletisch 100 / 100	monophyletisch + () 95 / 98	monophyletisch 100 / 100	monophyletisch 100 / 100
Position von <i>Sciadopitys</i>	basal zu Cupressaceae Gruppe 70 / <50	n.a.	basal zu Cupressaceae/Araucariaceae Gruppe < 50 / < 50	n.a.	n.a.
Anzahl der untersuchten Charaktere	630 bp	630 bp	630 bp	1806 bp	3630 bp

3.3.6 Molekulare Phylogenie der Niederen Pflanzen anhand von partialen Phytochromgenen

Wie einleitend beschrieben, konnten auch in cryptogamen Pflanzen mehrere Mitglieder der Phytochromgenfamilie nachgewiesen werden (Kolukisaoglu *et al.* 1993, 1995, Schneider-Poetsch *et al.* 1994, 1998, Maucher 1994, Wada *et al.* 1997). Kolukisaoglu *et al.* (1993) zeigten anhand kompletter Sequenzen von *Physcomitrella* und *Selaginella*, daß diese Phytochromgene eine eigene Gruppe bilden, getrennt von den Genlinien der Höheren Pflanzen. Diese Annahme wurde ebenfalls durch molekulare Phylogenien von 46 partialen Sequenzen des Pflanzenreichs (davon 19 Sequenzen von Niederen Pflanzen) bestätigt (Schneider-Poetsch *et al.* 1998) und wurde auch in dieser Arbeit vorgestellt (s. Abb. 3.10). Über die Einordnung und die Beziehungen der Phytochrome von Niederen Pflanzen zueinander liegen bislang jedoch kaum Informationen vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 27 partiale Sequenzen von Moosen und Farnen durch PCR-Amplifikation mit anschließender RFLP-Analyse isoliert (s. 2.2.2.2). Auf der Basis dieser und bekannter Sequenzen wurde zum einen die molekulare Phylogenie der Phytochromgenfamilie der Niederen Pflanzen untersucht und zudem ihre Aussagekraft bezüglich der Phylogenie der Pteridophyten betrachtet. Für die Analysen wurden folgende Sequenzen verwendet:

Tab. 3.9: Für die phylogenetischen Analysen verwendete partiale *phy*-Sequenzen und ihre Accesion-Nummern. Fettgedruckte Sequenzen wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt.

Bryophyta

Marchantiaceae	<i>Conocephalum supradecompositum</i> (Lindb.) Stephani	<i>phy1</i>	Y08159
	<i>Marchantia polymorpha</i> L.	<i>phy1</i>	X80296
Anthocerotaceae	<i>Anthoceros punctatum</i> L.	<i>phy1</i>	AJ286673

Pteridophyta/

Psilotatae

Psilotaceae	<i>Tmesipteris tannensis</i> Bernh.	<i>phy1</i>	Y13798
		<i>phy1/PG</i>	Y13799
Psilotaceae	<i>Psilotum nudum</i> (L.) P. Beauv.	<i>phy1</i>	X74930
		<i>phy2</i>	Y13806

Lycopodiatae

Isoetaceae	<i>Isoetes velata</i> L.	<i>phy1</i>	Y13792
Lycopodiaceae	<i>Huperzia selago</i> (L.) Bernh. ex Schrank et Mart.	<i>phy1</i>	AJ286677
		<i>phy2</i>	AJ286678
Selaginellaceae	<i>Selaginella serpens</i> (Desv. ex Poir.) Spring	<i>phy</i>	X98700

<u>Equisetatae</u>			
Equisetaceae	<i>Equisetum arvense</i> L.	<i>phy1</i>	X80299
<u>Filicatae</u>			
Azollaceae	<i>Azolla filiculoides</i> Lam.	<i>phy2A</i> <i>phy2B</i>	AJ286689 AJ286688
Blechnaceae	<i>Blechnum spicant</i> (L.) Roth	<i>phy1</i> <i>phy2</i>	AJ286670 AJ286669
Dicksoniaceae	<i>Dicksonia antarctica</i> Labill.	<i>phy2</i>	AJ286676
Marattiaceae	<i>Angiopteris evecta</i> (G.Forst.) Hoffm.	<i>phy2A</i> <i>phy2B</i>	AJ286674 AJ286675
Marattiaceae	<i>Marattia laevis</i> Sm.	<i>phy1</i> <i>phy2</i>	AJ286679 AJ286680
Marsileaceae	<i>Pilularia globulifera</i> L.	<i>phy2</i>	AJ286687
Marsileaceae	<i>Marsilea quadrifolia</i> L.	<i>phy</i>	X80300
Ophioglossaceae	<i>Botrychium lunaria</i> (L.) Sw.	<i>phy2B</i> <i>phy2B/PG</i>	AJ286671 AJ286672
Ophioglossaceae	<i>Ophioglossum vulgatum</i> L.	<i>phyL1</i>	X98621
Osmundaceae	<i>Osmunda regalis</i> L.	<i>phy1A</i> <i>phy1B</i> <i>phy2</i>	AJ286681 AJ286682 AJ286683
Polypodiaceae	<i>Platynerium angolense</i> Welw. ex Bak.	<i>phy2</i>	Y13797
Polypodiaceae	<i>Polypodium vulgare</i> L.	<i>phy1</i> <i>phy2A</i> <i>phy2B</i>	AJ286686 AJ286685 AJ286684
Pteridaceae	<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	<i>phy1</i> <i>phy2</i>	D13519 AB016232
Salviniaceae	<i>Salvinia natans</i> (L.) All.	<i>phy2A</i> <i>phy2B</i>	Y13800 Y13801
Schizeaceae	<i>Anemia phyllitidis</i> (L.) Sw.	<i>phy1</i> <i>phy2</i> <i>phy3</i> <i>phy4</i>	Maucher 1994 Maucher 1994 Maucher 1994 Maucher 1994
Vittariaceae	<i>Vittaria lineata</i> (L.) Sm.	<i>phy2B</i>	Y13802

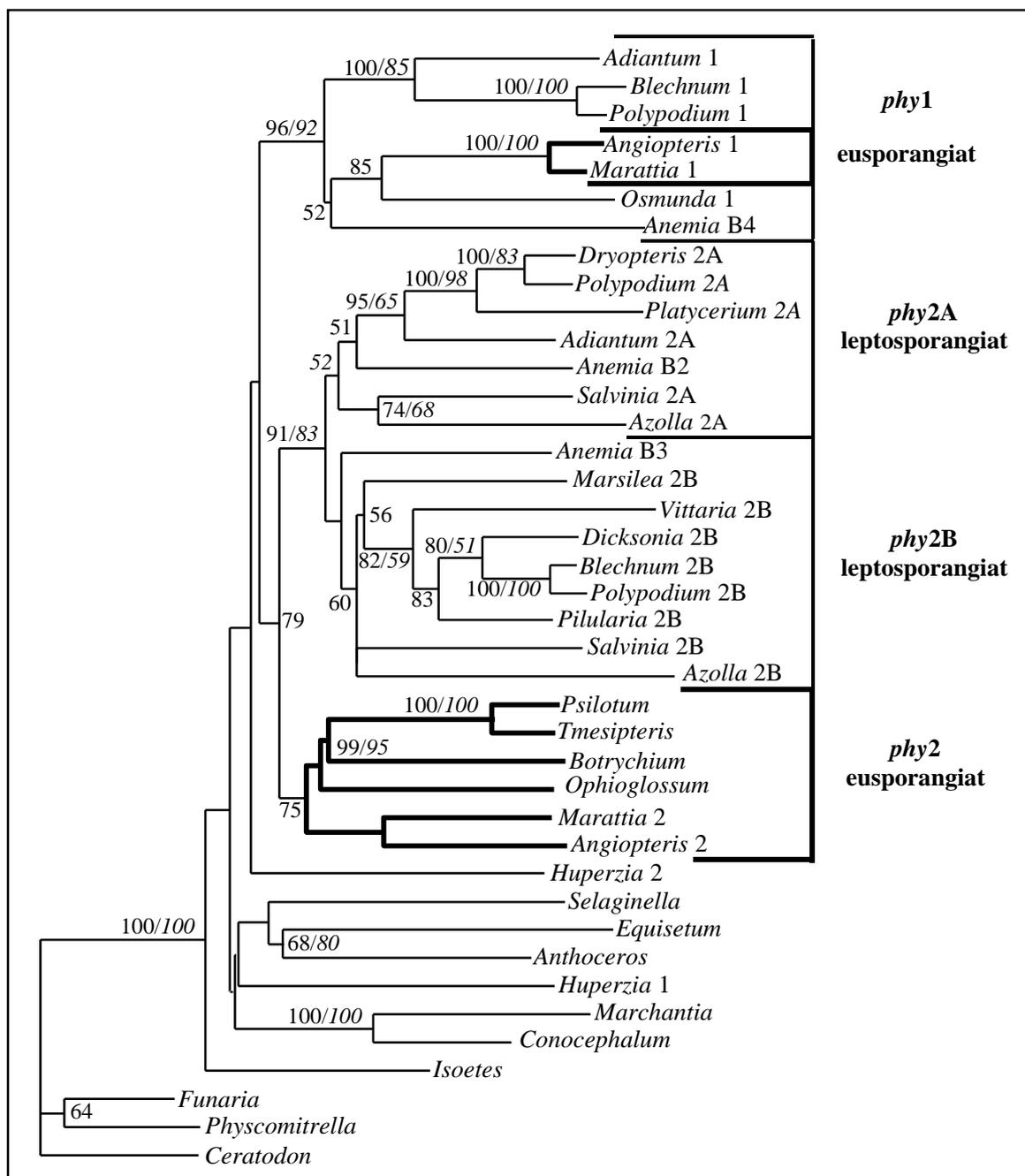


Abb. 3.21: Phylogenetischer Stammbaum errechnet aus 35 partialen *phy*-Sequenzen von Niederen Pflanzen mit *Funaria*, *Physcomitrella* und *Ceratodon* als Outgroup-Organismen. Die Stammbaumtopologie entstammt einer Distanzanalyse. Bootstrapwerte von 100 berechneten Datensätzen von Distanz- und Parsimony-Analysen (Heuristische Suche, TBR-Branch-Swapping), die die gleiche Topologie unterstützten, sind an den jeweiligen Verzweigungen angegeben, wobei Bootstrapunterstützungen aus Parsimony-Analysen kursivgedruckt sind. Bootstrapwerte <50 sind nicht angegeben.

Um den dargestellten Baum nicht noch komplexer zu machen, wurden nicht alle paraloge Gene und Pseudogene in die vorgestellte Analyse (Abb. 3.21) aufgenommen. Wenn man mit allen verbleibenden Sequenzen phylogenetische Bäume konstruiert, werden diese zu Clustern geordnet, deren Zusammenhang an der Basis unaufgelöst bleibt (Abb. 3.21). So sind beispielsweise die Phytochromgene von den Pteridophyten *Isoetes*, *Selaginella* und *Huperzia* (Lycopodiatae) so abweichend, daß sie einzeln stehen.

Laubmoose (*Ceratodon*, *Physcomitrella* und *Funaria*) und Lebermoose (*Marchantia* und *Conocephalum*) bilden jeweils eine Gruppe.

Daß *Anthoceros* (Bryophyta, Anthocerotaceae/Hornmoose) und *Equisetum* (Pteridophyta, Equisetaceae) mit relativ hohen Bootstrapwerten zusammenkommen (68/80) mag Zufall sein. Molekulare Analysen kombinierter Datensätze von Sequenzdaten, Genommarkern und morphologischen Merkmalen lassen vermuten, daß Hornmoose nah verwandt mit Gefäßpflanzen sind, also die höchstentwickelten Moose darstellen (Qiu *et al.* 1998, 1999).

Die Cluster mit Sequenzen von Farnen lassen sich bei aller Vorsicht folgendermaßen interpretieren:

Es erfolgte eine frühe Trennung von zwei Genlinien, die sowohl in eu- wie in leptosporangiaten Farnen zu finden sind (auf der Abbildung mit *phy1* und *phy2* bezeichnet). Später können sich diese Genlinien in manchen Arten, hier nur in leptosporangiaten Farnen, weiter aufspalten (paraloge Gene z.B. in *Salvinia*, *Azolla*, *Polypodium* und *Anemia*).

In der Genlinie *phy2* (Abb. 3.21) werden alle untersuchten eusporangiaten Farne in einem Cluster zusammengefaßt. *Psilotum* und *Tmesipteris*, traditionell als den Urlandpflanzen nahestehend eingeordnet, sind mit *Botrychium* verbunden, das die Systematik mit *Ophioglossum* den Ophioglossales zuweist. So liegt der Schluß nahe, daß *Psilotum* und *Tmesipteris* ebenfalls den Ophioglossales angehören. In dem Cluster *phy1* wurden keine Gene dieser Gruppe der eusporangiaten Farne gefunden, die eine erhoffte Bestätigung dieser Folgerung erbracht hätten. Neuere phylogenetische Analysen von *rbcL*-, *atpB*-, *cox3*- und 16S rRNA-Sequenzen belegen jedoch auch, daß Psilotales und Ophioglossales einen gemeinsamen Vorfahren teilten und die Psilotales somit eine stammesgeschichtlich jüngere Gruppe darstellen als bislang angenommen (Hasebe *et al.* 1995, Manhart 1995, Malek *et al.* 1996, Wolf 1997).

Das *phy1*-Cluster zeigt nicht die klare Aufspaltung in eu- und leptosporangiate Farne. In dem Cluster der *phy1*-Sequenzen sind zudem keine Gene von Wasserfarnen (*Azolla*, *Salvinia*, *Pilularia*, *Marsilea*) vertreten, wie sie bei *phy2A/B* zu finden sind.

Für alle drei Cluster zeigt sich jedoch, daß Farne wie *Blechnum*, *Polypodium* und *Dryopteris*, die durch morphologische Merkmale der Gruppe der abgeleiteten bzw. modernen Farne zugeordnet werden (Kramer und Tyron 1990, Schneider 1996, Sitte *et al.* 1999), auch durch *phy*-Sequenzen zusammengefaßt werden. Zudem stellen sie auf allen drei Genlinien die Kronengruppen dar, also die jüngsten Vertreter innerhalb der Pteridophyta.

Wegen der geringen Auflösung an der Basis entspringen *Anemia* und die Wasserfarne jeweils einzeln der Basislinie der jeweiligen Cluster.

Mögliche paraphyletische Ursprünge von Bryophyta und Pteridophyta konnten auch durch Analysen, die Höhere Pflanzen miteinbezogen, nicht geklärt werden (Stammbaum nicht dargestellt). Für diese Fragestellungen ist der phylogenetische Informationsgehalt der untersuchten partialen *phy*-Sequenzen zu gering. So verursachte die Einbeziehung ursprünglicherer Outgroup-Organismen (*Mougeotia*, *Mesotaenium* und *Chara*) erhebliche Änderungen der basalen Topologien. Innerhalb der einzelnen Genlinien konnten die Phylogenien der Organismen jedoch grundsätzlich nachgezeichnet werden. Weitere phylogenetische Analysen von Phytochromen Niederer Pflanzen sollten sich daher möglichst auf die Betrachtung einzelner Genlinien beschränken.

4 Diskussion

4.1 ALAD, β -Amylase, CHS, LHCII und RBCL werden in *Pinus*-Keimlingen lichtunabhängig exprimiert

Bei Untersuchungen an Angiospermen war schnell deutlich geworden, daß die von Phytochromen regulierten morphologischen Veränderungen (s. z.B. Mohr 1972) auf Unterschiede der Expression von Enzymen und anderer Proteine zurückzuführen waren (für eine Zusammenfassung: Tobin und Silverthorne 1985). Entsprechende Untersuchungen bei Gymnospermen sind in der Minderzahl und konnten die für Angiospermen gemachten Beobachtungen generell nicht bestätigen. Expressionsstudien von *lhcII* und *rbcS* in *Pinus thunbergii*-Keimlingen belegten zum Beispiel ein lichtunabhängiges Vorkommen dieser Transkripte (Yamamoto *et al.* 1991).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit spezifischen, heterologen pkAK (s. 2.1.11) in Proteinextrakten von *Pinus*-Keimlingen Proteine der entsprechenden molekularen Größe von ALAD, β -Amylase, LHCII, CHS und RBCL spezifisch nachgewiesen (Abb. 3.4). Obwohl die verwendeten AK gegen die Apoproteine verschiedener Angiospermen gerichtet sind (s. 2.1.11), konnten für alle pkAK Kreuzreaktionen mit Proteinen gezeigt werden, die eine vergleichbare molekulare Größe besitzen. Bei keinem der untersuchten Proteine wurde eine eindeutige lichtabhängige Regulation gefunden.

Die *lhcII*-Gene bilden in Angio- und Gymnospermen eine Multigenfamilie, die für mehrere Genprodukte von etwa 24-29 kDa Größe kodieren. Für keines der beiden markierten LHCII-Apoproteine konnte in den hier durchgeführten Experimenten eine lichtabhängige Mengenänderung festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Yamamoto *et al.* (1991) und Mukai *et al.* (1992), die zeigten, daß gleiche Transkript- und Proteinmengen von LHCII in lichtgewachsenen und etiolierten Keimlingen von *Pinus thunbergii* vorlagen. Die kernkodierte Plastidenproteine werden in *Pinus* folglich bereits in dunkelgewachsenen Keimlingen akkumuliert, obwohl ihre physiologischen Funktionen erst im Licht zu tragen kommen.

Die durchgeführten Experimente belegen außerdem ein lichtunabhängiges Vorkommen von RBCL in *Pinus*. Sie stehen damit im Einklang mit Mukai *et al.* (1992), die durch Immunoblotanalysen zeigen konnten, daß RBCS und RBCL in *Pinus thunbergii* und *Tsuga sieboldii* konstitutiv vorliegen.

Über die Regulationen von ALAD, β -Amylase und CHS lagen bisher lediglich Untersuchungen aus Angiospermen vor (Sharma und Schopfer 1987, Ehmann *et al.* 1991, Frohmeyer *et al.* 1992, Kaczor *et al.* 1994). In Angiospermen konnte eine lichtinduzierte Expression von β -Amylase in Senfkeimlingen (Sharma und Schopfer 1987) sowie von zwei

Genen der Chalkonsynthasegenfamilie gezeigt werden (Ehmann *et al.* 1991). Transkripte von ALAD liegen in *Glycine max* Keimlingen auch in Dunkelheit vor. Im Anschluß an eine Belichtung der Keimlinge konnte jedoch die doppelte Transkriptmenge nachgewiesen werden (Kaczor *et al.* 1994). Demgegenüber zeigten immunologische Untersuchungen und Enzymtests keine lichtabhängige Regulation von ALAD auf Proteinebene.

In *Pinus* werden Proteine der Anthocyan- (CHS) und Chlorophyllsynthese (ALAD), Photosyntheseproteine (RBCL), chlorophyllbindende Proteine (LHCII) und stärkeabbauliche Enzyme (-Amylase) in etiolierten Keimlingen von *Pinus* in gleichen Mengen wie in lichtgewachsenen synthetisiert.

Anhand der oben beschriebenen lichtunabhängigen Expression von LHCII und CHS wird gezeigt, daß die aus Angiospermen angenommenen Signalkaskaden, falls sie auch in Gymnospermen existieren, keine Abhängigkeit von Licht zeigen. Experimentelle Nachweise, ob die einleitend beschriebenen Signalkaskaden auch in Gymnospermen vorliegen oder eine evolutive Weiterentwicklung darstellen, die auf angiosperme Pflanzen beschränkt ist, liegen bislang nicht vor.

Immunologische Analysen von Proteinextrakten licht- und dunkelgewachsener Pinatae (Coniferae) ergaben für einzelne Familien dieser Klasse ein heterogenes Bild. Für die meisten der untersuchten Keimlinge von Podocarpaceae, Pinaceae, Taxodiaceae und Cupressaceae konnten Chlorophylle sowie die Apoproteine von LHCII, RBCS und RBCL in dunkelgewachsenen Keimlingen nachgewiesen werden (Mukai *et al.* 1992). Ausnahmen stellten *Larix kaempferi*, *Metasequoia glyptostroboides* und *Ginkgo biloba* dar, die eine durch Licht induzierte Chlorophyllbiosynthese zeigten (Mukai *et al.* 1992, Chinn und Silverthorne 1993). In dunkelangezogenen Keimlingen von *Larix*, *Metasequoia* und *Ginkgo* lagen auch Transkripte von *lhcII*, *rbcS* und *rbcL* vor. Außerdem wurde in *Larix* und *Metasequoia* mit Hilfe von pkAK in dunkelgewachsenen Keimlingen RBCS und RBCL nachgewiesen aber kein LHCII (Mukai *et al.* 1992). Proteinmarkierungsexperimente in *Larix* zeigten jedoch, daß LHCII auch in Dunkelheit translatiert und prozessiert wird. Da die Chloroplasten von etiolierten *Larix*-Keimlingen jedoch unentwickelt sind und in Dunkelheit kein Chlorophyll vorliegt, wäre es möglich, daß ungebundenes LHCII schnell degradiert wird (Mukai *et al.* 1992). Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei *Larix* besitzen etiolierte *Pinus*-Keimlinge Chlorophyll und es erfolgt wahrscheinlich auch eine Bindung von LHCII an Chlorophyll. Folglich findet wahrscheinlich kein Abbau dieser Proteine statt, wie die hier dargestellten Immunoblotanalysen auch belegten.

Die Fähigkeit der lichtinduzierten Chlorophyllsynthese steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Abhängigkeit der drei Spezies von jahreszeitlicher Periodik. Diese drei Spezies eint, obwohl sie systematisch unterschiedlichen Familien und Klassen angehören, der herbstliche Blattfall (inwinterring). Die nachgewiesenen physiologischen Gemeinsamkeiten im Hinblick auf die lichtinduzierte Chlorophyllsynthese und den LHCII-Abbau in etiolierten Keimlingen könnten folglich im Vergleich zu immergrünen Gymnospermen eine sensiblere lichtabhängige Regulation benötigen.

Da in *Pinus* phänotypische Unterschiede zwischen lichtgewachsenen und etiolierten Keimlingen beobachtet werden konnten, findet eine Lichtperzeption und sich anschließende Signaltransduktion statt, wenn auch in einem wesentlich geringeren Ausmaß i.V. zu den meisten Angiospermen. Demnach stellt sich die Frage, ob die lichtabhängige Regulation bestimmter Gene im Verlauf der Evolution durch cis-Elemente in 5'-untranslatierten Bereichen von lichtinduzierten Genen entstanden ist bzw. ob transaktivierende Faktoren die Lichtinduktion bestimmter Proteine vermitteln (für eine Zusammenfassung: Argüello-Astorga und Herrera-Estrella 1998). Beispielsweise konnten im Promotorbereich von *lhcb2*, einem Mitglied der *lhcbII*-Genfamilie, von *Pinus thunbergii* I-Box-ähnliche Sequenzbereiche gefunden werden. Mutationsanalysen des homologen Promotorbereiches in *Lemna gibba*, einer Monokotyledonae, führten zu einer hohen Expression von *lhcb2* in Dunkelheit und es wird vermutet, daß dieses Element in Dunkelheit einen transkriptionsreprimierenden Faktor bindet. Die homologen I-Box-Motive aus *Pinus thunbergii* hingegen vermittelten auch in transgenen *Nicotiana*-Mutanten eine lichtunabhängige Expression von Reportergenen (Kojima *et al.* 1994). Demnach scheinen in jedem Fall zusätzliche cis-Elemente nötig zu sein, um die Lichtregulation von Genen zu vermitteln .

Dieses Beispiel zeigt, daß eingehendere Analysen der 5'-untranslatierten Bereiche von Genen in Gymnospermen, die bei Angiospermen lichtreguliert werden, interessante Informationen über die Entstehung und die grundsätzlichen Prinzipien von lichtregulierten Genen bzw. deren Promotorbereichen enthalten können.

Über lichtabhängige Phänomene der Cycadatae liegen bislang keinerlei Daten auf der Ebene der Expression von Proteinen vor.

4.2 *Pinus* besitzt mindestens drei Phytochromgenlinien *phyN*, *phyO* und *phyP* sowie Pseudogene

Sharrock und Quail (1989) sowie Clack *et al.* (1994) zeigten erstmals, daß in *Arabidopsis* fünf verschiedene Phytochromgene vorliegen, denen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden (für eine Zusammenfassung: Mathews und Sharrock 1997). Auch in anderen angiospermen Pflanzen wurden mehrere Phytochromgene gefunden, wobei die Größe der Genfamilie von drei Mitgliedern, z.B. in *Sorghum bicolor* (Alba *et al.* 2000), *Oryza sativa* (Tahir *et al.* 1998) und *Populus tremula* (Howe *et al.* 1998) bis zu fünf z.B. auch in *Lycopersicon esculentum* (Hauser *et al.* 1995) variiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun mittels PCR-Amplifikationen von genomischer DNA aus *Pinus* gezeigt werden, daß in Gymnospermen unterschiedliche Phytochromgene vorliegen.

Phylogenetische Analysen von sechs Genfragmenten mit einer Größe zwischen 564-576 bp ergaben, daß es sich um drei Genlinien handelt (Abb. 3.15). Weitere Stammbäume belegen,

daß *phyN* und *phyO* Abkömmlinge der *phyA*-Genlinie der Angiospermen sind. *phyP* hingegen zeigt Verwandtschaft zu den B-Phytochromen in Angiospermen (Abb. 3.11 und 3.12).

phyO von *Pinus* konnte in dieser Arbeit lediglich auf genomischer Ebene charakterisiert werden. Wiederholtes Durchsuchen der cDNA-Bank mit einer homologen Sonde führte zu keinem positiven Signal. Aufschluß über die Expression von *phyO* in *Pinus* sollen zukünftige RT-PCR-Analysen liefern.

Durch PCR-Amplifikationen von Gesamt-DNA von *Pinus* konnte desweiteren ein Pseudogen identifiziert werden, das 87,6% Identität zu *phyN* zeigte. Kolukisaoglu (1997) sequenzierte in *Ginkgo* ebenfalls ein Pseudogen, welches höchste Homologie mit *phyP* besaß. Pseudogene von Phytochromen haben sich demnach in verschiedenen Individuen und Genlinien entwickelt. Ob Pseudogenfragmente tatsächlich exprimiert werden, ist nicht bekannt.

Über die Rolle einzelner *phy*-Gene in Gymnospermen kann zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage gemacht werden, um so weniger, weil über die nachgewiesenen Genlinien *phyN*, *phyO* und *phyP* hinaus offensichtlich eine Reihe von Sublinien in Gymnospermen existieren.

Vergleicht man die in dieser Arbeit erhaltenen Gensequenzen mit Sequenzdaten von Thümmler und Dittrich (1995), die sechs partiale Phytochromfragmente von *Picea* veröffentlicht haben (Accession-Nr.: U38363 bis U38368), so wird die Vermutung unterstützt, daß in dieser Gymnospermenfamilie mindestens drei Phytochromtypen vorliegen. U38363 zeigt die größte Identität zu *phyN* aus *Pinus* (85%) und könnte das orthologe *phyN*-Gen aus *Picea* darstellen. U38365 und U38366 zeigen jeweils > 95% Ähnlichkeit zu der Vollängen-cDNA Sequenz von *Picea* (U60264, Clapham *et al.* 1999) und sind folglich mit *phyO* homologisierbar. Veröffentlichte Sequenzen von *phyP* aus *Picea* (X80298: Schneider-Poetsch *et al.* 1998, U38368: Thümmler und Dittrich 1995) zeigen nur 2% Unterschied und sind somit wahrscheinlich auch orthologe Gene. U38364 und U38367 überlappen auf einem Bereich von 24 Nukleotiden, auf dem sie sich um 2 Nukleotide unterscheiden. Möglicherweise handelt es sich hier um Fragmente eines Gens. Beide Fragmente zeigen etwa 90 % Identität zu *phyP* X80298. Sie könnten somit allelisch sein oder auf individuen-spezifischen Variationen beruhen. Die beschriebenen Sequenzinformationen aus *Picea* belegen daher ebenfalls das Vorhandensein einer Phytochromgenfamilie bestehend aus mindestens drei Mitgliedern: *phyN*, *phyO* und *phyP*.

Endgültigen Aufschluß über die Größe der Phytochromgenfamilie in *Pinus* kann erst durch genomische Southernblot-Analysen erreicht werden, die bis diesem Zeitpunkt keine eindeutigen Rückschlüsse zuließen (Daten nicht gezeigt).

4.3 Lichtabhängige Expression von Phytochrom in *Pinus*

In Angiospermen werden die Transkript- und Proteinmengen von *phyA* reguliert wohingegen *phyB-E* mehr oder weniger konstitutiv vorliegen (Quail *et al.* 1995).

Clapham *et al.* (1999) konnten durch RT-PCR-Experimente zeigen, daß in *Picea* die Transkriptmengen von *phyO* und *phyN*, welches, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, phylogenetisch *phyA* nahesteht, in licht- und dunkelgewachsenen 10 Tage alten Keimlingen unterschiedlich sind. So enthielten Keimlinge von *Picea*, die in Dunkelheit angezogen wurden, etwa die doppelte Transkriptmenge i.V. zu lichtgewachsenen Keimlingen. Dieser Effekt konnte in 7 Tage alten Keimlingen nicht festgestellt werden.

Die hier durchgeführten immunologischen Untersuchungen des Phytochromgehaltes von licht- und dunkelgewachsenen Keimlingen von *Pinus* mit dem mkAK Anti-Mais PHYA Z-3B1 belegten eine 3,5-fache Anreicherung von Phytochromen in Dunkelheit i.V. zu lichtgewachsenen (Abb. 3.5 A). Ähnlich wie Clapham *et al.* (1999) beschrieben, scheint die Dunkelanreicherung von Phytochrom in Gymnospermen geringer zu sein i.V. zu Angiospermen, für die eine bis zu 100-fache Anreicherung von PHYA in etiolierten Keimlingen nachgewiesen wurde (Quail *et al.* 1995). Jedoch konnte in *Pinus* die PHY-Dunkelanreicherung bereits in 7 Tage alten Keimlingen immunologisch nachgewiesen werden.

Die Immunoblots zeigten weiterhin, daß nach 8-stündiger Belichtung der *Pinus*-Keimlinge noch 44% der PHY-Dunkelmenge vorlagen, nach 24 h befand sich das Phytochromsystem in einem Gleichgewichtszustand von 27%, da die PHY-Mengen dem Vergleichswert lichtgewachsener Keimlinge annähernd entsprachen (Abb. 3.5 A und B).

Vorangegangene Experimente von Quail *et al.* (1973) hatten gezeigt, daß PHYA-P_R von etiolierten Kürbis-Keimlingen eine Halbwertszeit von etwa 100 h besaß, PHYA-P_{DR} hingegen eine Halbwertszeit von ungefähr 1 h. Hennig *et al.* (1999) untersuchten die Abbaueigenschaften von PHYA intensiver im genetischen Hintergrund einer *phyB* Mangelmutante von *Arabidopsis*. Belichtung der dunkelgewachsenen Keimlinge mit R belegte eine Halbwertszeit von PHYA von 30 min. Nach 2 h R-Belichtung konnte PHYA immunologisch nicht mehr detektiert werden. Belichtung der Keimlinge mit DR zeigte eine verzögerte Abbaurrate: die Halbwertszeit von PHYA lag bei 2 h und es wurde erst nach 12 h ein Gleichgewichtszustand erreicht, der bei 25% der Menge von dunkelgewachsenen Keimlingen lag, also wesentlich höher im Vergleich zu Keimlingen, die mit R belichtet wurden.

Die hier ermittelte Kinetik von Phytochrom in *Pinus* ähnelt der von Hennig *et al.* (1999) beschriebenen Dynamik von PHYA in *Arabidopsis* unter DR-Belichtung, wobei die Halbwertszeit des Phytochroms in *Pinus* mit etwa 4 h größer ist. Diese Beobachtung könnte sich durch zwei experimentelle Faktoren erklären lassen. Einerseits erfolgte die Belichtung der dunkelgewachsenen Keimlinge mit Hochdruck-Natriumlampen (Tageslichtlampen) im Gewächshaus, die Licht mit einem Spektralbereich von 390-750 nm emittieren (Fa. Philips,

Produktangaben des Herstellers), also R und DR. In Abhängigkeit von den R- und DR-Anteilen im emittierten Lichtspektrum stellt sich ein spezifisches Gleichgewicht zwischen der P_R - und P_{DR} -Form von Phytochrom ein (phytochrome cycling). Da v.a. die P_{DR} -Form einem schnellen proteolytischen Abbau zugänglich ist (Clough und Vierstra 1997, Clough 1999), könnte die nach 24-stündiger Belichtung detektierte Restmenge von etwa 27% der verbleibenden P_R -Form entsprechen, die aufgrund des DR-Anteils im Lichtspektrum revertiert wird. Diese Tatsache könnte durch Belichtung von dunkelgewachsenen *Pinus*-Keimlingen mit monochromatischem R- bzw. DR-Licht eingehender ermittelt werden.

Ein weiterer Faktor, der den Gleichgewichtszustand von 27% Phytochrom nach 24 h Belichtung beeinflussen könnte, ist die Kreuzreaktivität des mkAK Anti-Mais Phytochrom Z-3B1 mit zwei verschiedenen Phytochromen aus *Pinus*. Mit Hilfe der heterolog exprimierten Phytochromfragmente $PHYN_{rek}$ und $PHYP_{rek}$ von *Pinus* sowie *Picea PHYO_{rek}* wurde festgestellt, daß Z-3B1 PHYN und PHYP markiert (Abb. 3.6 B). Quail *et al.* (1995) konnten mit Hilfe monoklonaler phytochromtyp-spezifischer Antikörper zeigen, daß PHYB konstitutiv vorliegt und keine lichtabhängige Degradation des Apoproteins stattfindet. Sowohl phylogenetische Analysen als auch Sequenzvergleiche von funktionspezifischen Motiven (Nukleuslokalisationsdomäne, PEST-Domäne, s. 7.3) belegen, daß PHYP von *Pinus* der PHYB-Linie der Angiospermen entstammt. Somit könnte auch PHYP, wie für *Arabidopsis* PHYB gezeigt, konstitutiv vorliegen. Der ermittelte Gleichgewichtswert für *Pinus* Phytochrom von 27% bei Belichtung könnte folglich auch durch Vorliegen von zwei Phytochromapoproteinen bedingt sein, PHYN und PHYP, da das Epitop von Z-3B1 mit beiden Phytochromen reagiert. Die gemessenen Mengen repräsentieren folglich zwei Phytochromtypen mit möglicherweise unterschiedlicher lichtabhängiger Expression und Degradation.

Um einen experimentellen Nachweis zu erhalten, welches der Phytochrome von *Pinus* lichtabhängig abgebaut wird, wurden pkAK gegen heterologe Fusionsproteine von PHYN und PHYP generiert. Erste Immunoblotanalysen der Gesamtproteinextrakte von *Pinus*-Keimlingen zeigten, daß beide AK (pkAK-N und pkAK-P) ein Protein mit einer Größe von etwa 120 kDa markieren (Abb. 3.8). Die Inkubation von Membranen, auf die Proteinextrakte von licht- bzw. dunkelangezogenen *Pinus*-Keimlingen übertragen wurden, mit pkAK-N belegte eine Akkumulation von PHYN in Dunkelheit. Demgegenüber scheint PHYP in licht- und dunkelgewachsenen Keimlingen vorzuliegen (Abb. 3.9). Eine Quantifizierung der Abbaukinetiken der Phytochrome, die durch pkAK-N bzw. pkAK-P markiert werden, steht noch aus.

Die hier diskutierten Ergebnisse sind ein erster Hinweis, daß auch in *Pinus* lichtlabile (Typ I) und lichtstabile (Typ II) Phytochrome vorliegen, wie sie für verschiedene angiosperme Pflanzen beschrieben sind (Quail *et al.* 1973, 1995, Clough und Vierstra 1997, Clough *et al.* 1999, Hennig *et al.* 1999). Das Vorliegen einer Lichtregulation von Phytochrom in *Pinus*-Keimlingen scheint erstaunlich in dem Zusammenhang, daß bislang nur geringe Photomorphogenesen (z.B. Hypokotylstauchung, Kotyledonenentfaltung sowie verstärkte

Chlorophyll- und Anthocyansynthese) erkennbar sind, jedoch keine Regulation von Enzymen, die in Angiospermen eindeutig lichtabhängig reguliert werden. Dennoch scheint einer der beteiligten Photorezeptoren mit Eigenschaften ausgestattet zu sein, die denen von Angiospermen ähneln.

4.4 Die Evolutionsraten von Phytochromgenen variieren zwischen Organismengruppen

Als Rate wird die kontinuierliche Änderung eines Parameters über einen Zeitintervall definiert. Zuckerkandl und Pauling (1965) beschrieben eine konstante Evolutionsrate von Proteinen und formulierten die Hypothese der molekularen Uhr. Auf der Basis konstanter Evolutionsraten von Makromolekülen postulierten sie, daß man anhand phylogenetischer Analysen von molekularen Datensätzen evolutionäre Ereignisse zeitlich einordnen kann. Mittlerweile wurde diese Beobachtung für einzelne Gene und Proteine widerlegt (Wu und Li 1985, Britten 1986, Bousquet *et al.* 1992). Es wurden unterschiedliche Evolutionsraten verschiedener Genregionen, Proteinstrukturen und auch differentiell exprimierter aber doch homologer Gene beobachtet (für eine Zusammenfassung: Sanderson 1998). Heterogene Evolutionsraten wurden auch zwischen einzelnen Organismengruppen beschrieben, z.B. zwischen Poaceae und Palmaceae (Wilson *et al.* 1990, Gaut *et al.* 1992) und zwischen annuellen und perennierenden Angiospermen (Savard *et al.* 1994).

Betrachtet man die Evolutionsraten von Phytochromgenen z.B. in Abb. 3.10, die sich in den Astlängen von Distanzbäumen ausdrücken, so fallen die deutlich längeren Äste der Angiospermen im Vergleich zu Niederen Pflanzen und Gymnospermen auf. Die genetische Distanz (Anzahl der angehäuften Mutationen pro Nukleotid) entsprechend dem Kimura-2-Parameter Modell von *Physcomitrella* zu *Adiantum* beträgt 0,22, die von *Oryza phyA* zu *Arabidopsis phyA* 0,26. Setzt man in diesem Fall konstante Evolutionsraten voraus, so müßte die genetische Distanz zwischen *Physcomitrella* und *Adiantum* beträchtlich größer sein, da seit ihrer Speziation wesentlich mehr Zeit verstrichen ist im Vergleich zu der Auftrennung monokotyler und dikotyler Angiospermae. Demzufolge sind die Evolutionsraten von Phytochromgenen in angiospermen Pflanzen im Vergleich zu Niederen Pflanzen wesentlich erhöht. Gleiches läßt sich auch bei einem Vergleich der Astlängen von Gymno- und Angiospermen erkennen (Abb 3.10). Ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren beider Abteilungen erkennt man bei Angiospermen aufgrund der viel längeren Äste eine verstärkte Anhäufung von Mutationen im Vergleich zu Gymnospermen. Die Astlänge von *Pinus phyP* ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren beträgt 70% der Länge von *Arabidopsis phyA* über den gleichen Zeitraum. In *phyP* von *Pinus* wurden in diesem Zeitraum folglich weniger Mutationen als im orthologen *phyB*-Gen von *Arabidopsis* angehäuft.

4.5 Die Evolutionsraten von Phytochromgenen variieren zwischen den Genlinien A und B

Unter 4.4 wurde die Heterogenität der Evolutionsraten innerhalb der Genlinien, also zwischen verschiedenen Angehörigen von Organismengruppen, verglichen. Unterschiedliche Evolutionsraten konnten aber auch für einzelne Mitglieder von Genfamilien festgestellt werden, z.B bei Mitgliedern der Enolase Genfamilie (Day *et al.* 1993), der Serumalbumin-Genfamilie (Gibbs *et al.* 1998) sowie der Chalkonsynthese-Genfamilie (Durbin *et al.* 2000). Die Linien A/B der CHS-Genfamilie häuften 2,7-mal mehr nicht-synonyme Mutationen an im Vergleich zu den Genlinien D/E. Außerdem wurde beobachtet, daß im Anschluß an eine Genduplikation und während Phasen adaptiver Radiation die Evolutionsraten anstiegen (Goodman 1981, Czelusniak *et al.* 1982).

Um molekulare Datensätze unabhängig von paläobiologischen Daten hinsichtlich ihrer Evolutionsraten zu untersuchen, entwickelten Sarich und Wilson (1973) den 'Relativen-Raten-Test'. Dazu wird in diesem Fall die Anzahl der angehäuften Substitutionen zwischen zwei Spezies für verschiedene Genlinien betrachtet. Unter der Voraussetzung von konstanten Evolutionsraten müßte für jede der betrachteten Genlinien die annähernd gleiche Anzahl an Substitutionen akkumuliert worden sein. Für einzelne Spezies-Paare konnte dieser Test für Phytochromsequenzen (2906 bp) angewandt werden:

Tab. 4.1: Vergleich der Evolutionsraten zwischen den *phy*-Linien A und B (2906 bp).

Bestimmung der Evolutionsraten der *phy*-Linien A (Angiospermae) bzw. N (Gymnospermae) und B (Angiospermae) bzw. P (Gymnospermae) mit Hilfe des Relativen-Raten-Tests (Sarich und Wilson 1973) durch den Vergleich der akkumulierten Mutationen zwischen gleichen Paaren von Spezies der Genlinien PHYA bzw. PHYB (2906 bp). Σ : Summe der angehäuften Mutationen zwischen beiden Spezies.

	<i>phyA</i> -Genlinie Σ	<i>phyB</i> -Genlinie Σ
<i>Arabidopsis / Solanum</i>	329	342
<i>Arabidopsis / Oryza</i>	576	384
<i>Solanum / Oryza</i>	559	322
<i>Arabidopsis / Pinus</i>	577	522
<i>Solanum / Pinus</i>	608	412
<i>Oryza / Pinus</i>	660	488

Anhand Tab. 4.1 ist erkennbar, daß, mit Ausnahme von *Arabidopsis / Solanum*, die Evolutionsraten von *phyA* und *phyB* unterschiedlich sind. Die angehäuften Substitutionen zwischen den gleichen Spezies liegen für *phyA* etwa 1,5-fach höher im Vergleich zu *phyB*. Für die betrachteten Gensequenzen liegen somit auffällig unterschiedliche Evolutionsraten vor.

Diese Tatsache deckt sich mit Beobachtungen von Goodman (1981) und Czelusniak *et al.* (1982), die im Anschluß an eine Genduplikation eine Beschleunigung der Evolutionsraten in beiden duplizierten Genen feststellen konnten. Auf der *phyA*-Genlinie, bei einem gemeinsamen Vorfahren von Gymnospermae, Mono- und Dikotyledonae, erfolgte eine Genduplikation in *phyA/C* (Angiospermae) bzw. *phyN/O* (Gymnospermae) und es liegt hier eine höhere Evolutionsrate im Vergleich zu der *phyB*-Genlinie in Angiospermen bzw. der P-Linie der Gymnospermae vor. So erklärt sich möglicherweise auch die Ausnahmestellung der *Arabidopsis*-Sequenzen, da im Genom von *Arabidopsis* eine zusätzliche Genduplikation diesmal auf der *phyB*-Genlinie erfolgte. Dadurch könnten die ähnlichen Evolutionsraten beider Genlinien von *Arabidopsis* erklärt werden, die im Gegensatz zu den restlichen Spezies stehen.

Betrachtet man die Evolutionsraten der Phytochromgenfragmente, fällt der eben beschriebene Unterschied geringer aus:

Tab. 4.2: Vergleich der Evolutionsraten zwischen den *phy*-Linien A und B im konservierten Bereich der Chromophorbindungsstelle (570 bp).

Vergleich der akkumulierten Mutationen zwischen gleichen Paaren von Spezies der Genlinien *phyA/N*, *phyC/O* und *phyB/P* einer 570 bp Sequenz, die den konservierten Bereich der Chromophorbindungsstelle flankiert. (AS 271-460 *Arabidopsis* PHYB). : Summe der Mutationen zwischen beiden Spezies.

	<i>phyA</i> -Genlinie	<i>phyC</i> -Genlinie	<i>phyB</i> -Genlinie
<i>Cupressus / Pinus</i>	100 (N1)	134	121
<i>Ginkgo / Macrozamia</i>	77 (N1)	74	93
<i>Arabidopsis / Sorghum</i>	172	186	174

Bei dem hier betrachteten konservierten Genfragment scheint innerhalb der untersuchten Speziespaare eine homogenere Evolutionsrate auf den Genlinien vorzuliegen. Für die dargestellten Gymnospermen kann man zwar unterschiedliche Evolutionsraten zwischen *phyN/O/P* erkennen, jedoch in einem kleineren Ausmaß im Vergleich zu den zuvor untersuchten längeren Gensequenzen (maximal um den Faktor 1,2 verändert). Auffällig ist außerdem, daß in diesem Sequenzbereich durchschnittlich mehr Mutationen in den *phyC*- und *phyB*-Linien angehäuft wurden als in *phyA*, im Gegensatz zu der Betrachtung der längeren Sequenzabschnitte (2906 bp, Tab. 4.1). Ob diese Beobachtung mit einer funktionell wichtigen Struktur von PHYA in diesem Bereich zusammenhängt, kann aufgrund der bislang vorliegenden Daten nicht generell gefolgert werden. In dem untersuchten Bereich liegt jedoch beispielsweise die konservierte PEST-Domäne, die als Erkennungssignal für das Ubiquitin-Degradationssystem dient (Rogers *et al.* 1986) und die nachweislich für A-Phytochrome konservierter ist als für PHYB-E (Quail *et al.* 1973).

Diese Analysen belegen jedoch, daß zwischen PHY-Genlinien (Tab. 4.1) und auch zwischen PHY-Genregionen (Tab. 4.2) unterschiedliche Evolutionsraten vorliegen.

4.6 Die molekulare Phylogenie anhand von Phytochromgenen entspricht der Landpflanzenevolution

Durch die technische Automatisierung molekularbiologischer Arbeiten hat sich der Zugang zu Sequenzinformationen von Nucleinsäuren erheblich beschleunigt. Mittlerweile liegen Datensätze von plastidären, mitochondrialen und nukleären Genen für phylogenetische Analysen vor. Diese Tatsache bietet die Möglichkeit die Abstammungsgeschichte von Organismen, die klassisch auf morphologischen und anatomischen Merkmalen basiert und mit der Problematik der Zuordnung homologer Strukturen steht und fällt, durch molekulare Phylogenien, und somit neutrale Information, zu ergänzen. Andererseits kann anhand dieser Datensätze die Evolution von Genen und Genfamilien nachvollzogen werden und mögliche Funktionsveränderungen einzelner Genlinien verstanden werden.

Die Phytochromgenfamilie bietet als nukleär kodiertes Gen pflanzlicher Organismen ein interessantes Untersuchungsobjekt, deren Potential bislang im Zusammenhang mit der Phylogenie von Angiospermae (Mathews *et al.* 1995, Mathews und Sharrock 1996, Mathews *et al.* 2000) und Niederen Pflanzen betrachtet wurde (Kolukisaoglu 1997, Schneider-Poetsch *et al.* 1994, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Phylogenie der Phytochromgenfamilie anhand von unterschiedlichen Datensätzen untersucht (Abb. 3.10, 3.11, 3.12). Soweit die phylogenetische Abfolge von Pflanzenklassen ins Auge gefaßt wird, geben Phytochrom-Bäume die auf fossilen Daten basierende wieder. Im Detail liegen aber doch bedenkenswerte Unterschiede vor.

Psilotum, traditionell als den Urlandpflanzen nahestehend eingeordnet, wird in Analysen von kompletten Phytochromsequenzen *Anemia* und *Adiantum* zugeordnet (Abb. 3.10). Analysen größerer Datensätze von partialen Phytochromsequenzen, die durch viele Sequenzen, u.a. von *Tmesipteris*, ergänzt sind, belegen eine Verwandtschaft von *Psilotum* und *Tmesipteris* zu *Ophioglossum* und *Botrychium* entgegen der bislang angenommenen ursprünglichen Position der Psilotatae (Abb. 3.21) (Sitte *et al.* 1999).

Eine Ungereimtheit, die sich aus den Analysen der AS-Sequenzen im Vergleich zu Nucleotidsequenzen ergab, ist die Position der Gymnospermengenenlinien N und O. AS-Analysen zeigen PHYN näher verwandt zu den A-Phytochromen der Angiospermae und O näher bei der C-Linie (Abb. 3.11). Nucleotidsequenzen hingegen belegen eine größere Ähnlichkeit der beiden Gymnospermensequenzen N und O zueinander als zu A oder C Phytochromen der Angiospermae. Die Topologie der Nucleotidbäume kann durch die zuvor beschriebenen heterogenen Evolutionsraten der Angiospermae im Vergleich zu Gymnospermae bedingt sein. Längere Äste führen bei Distanzanalysen zu 'long branch attraction', so daß OTU's mit längeren Ästen einen Cluster bilden (Felsenstein 1985); in diesem Fall alle Angiospermensequenzen getrennt von den Gymnospermae. Parsimonyanalysen von Sequenzen mit unterschiedlichen Evolutionsraten können ebenfalls abweichende Topologien zeigen (Felsenstein 1978). In beiden Analysen (AS- und

Nukleotidsequenzen) entspricht die basale Position der O- und N-Gene jedoch der Position der Gymnospermae in der Evolution der Landpflanzen. Abgesehen von dieser Differenz stimmen die Topologien von AS- und Nukleotidsequenzen (2955 bzw. 570 Charaktere) überein.

Vergleiche der Stammbaumtopologien, die anhand von 2955 bzw. 570 Charakteren erhalten wurden, zeigten demgegenüber in ihrem Verzweigungsmuster Übereinstimmung, so daß die Landpflanzenevolution auch durch molekulare Phylogenien von kürzeren Phytochromgenfragmenten nachgezeichnet werden kann.

4.7 Die molekulare Phylogenie der Gymnospermae anhand von Phytochromgenfragmenten stimmt nicht mit der klassischen Phylogenie überein aber mit anderen molekularen Daten

Die rezenten Vertreter der Gymnospermae sind entwicklungsgeschichtlich die ursprünglichste Gruppe der Spermatophyten. Alle Spezies dieser Gruppe besitzen Samenanlagen, die nicht in Fruchtblattgehäusen eingeschlossen sind. Zudem teilen sie weitere Synapomorphien, die sie taxonomisch zusammenfassen (Pollenkörner gelangen direkt auf die Mikropyle, meist diözisch und windbestäubt, primäres Endosperm als Nährgewebe des Embryos, perennierend). Die vier Klassen dieser Abteilung (Pinatae, Ginkgoatae, Cycadatae und Gnetatae) zeigen jedoch zueinander morphologische Heterogenität, so daß Homologisierungen bestimmter Merkmale schwerfallen (z.B. Blattnervatur bzw. Blattformen) und ihre evolutionären Beziehungen untereinander und zu den Angiospermen bis heute unaufgeklärt blieben (Crane 1985, Doyle und Donoghue 1986).

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Phylogenien der Gymnospermae mit weiteren Phylogenien molekularer und morphologischer Datensätze verglichen.

Alle untersuchten Datensätze dieser Arbeit belegen eine gemeinsame Abstammung der Taxaceae, Taxodiaceae und Cupressaceae mit hohen Bootstrapwerten. Die Cephalotaxaceae werden den Taxaceae zugeordnet (*phyN1: 79/80*). Diese Gruppierung steht im Einklang mit weiteren molekularen Untersuchungen von 18S rRNA (Chaw *et al.* 1997, Soltis *et al.* 1999) und 28S rRNA (Stefanovic *et al.* 1998). Morphologisch wurde v.a. die Stellung der Taxaceae kritisch gesehen, da ihre Fruchtform von der der übrigen Pinatae erheblich abweicht. Neuere morphologische Untersuchungen konnten jedoch auch eine Verwandtschaft belegen, die auf eine Reduktion des Zapfens der Coniferales zu einer terminalen einsamigen Frucht zurückgeführt wurde (Harris 1976). Analysen eines seltenen strukturellen cpDNA-Merkmals, das alle Coniferales teilen, unterstützen ebenfalls, daß Taxaceae einen Vorfahren mit allen Coniferales teilten (Raubeson und Jansen 1992).

Innerhalb der Pinatae variiert die Stellung von *Sciadopitys*, jedoch ergeben nur Distanzanalysen der partialen *phyN*-Sequenzen eine Bootstrapabsicherung von 70, alle anderen Werte sind statistisch nicht abgesichert (<50). Die unterstützte phylogenetische Stellung entspricht Analysen von Chaw *et al.* (1997) und Stefanovic *et al.* (1998). Die *Sciadopityaceae* wären in diesem Fall eine Schwestergruppe der *Cupressaceae/Taxodiaceae/Taxaceae*-Gruppe innerhalb der Pinatae, was ebenfalls traditionellen Einordnungen entspricht (Pilger 1926, Page 1990).

Unklar verbleiben anhand der untersuchten Datensätze die Positionen der *Podocarpaceae* und *Pinaceae* innerhalb der Pinatae. Vier von fünf Analysen belegen eine nahe Verwandtschaft der *Podocarpaceae* mit den *Araucariaceae*. Nur Analysen von partialen *phyP* Sequenzen ergeben ein anderes Bild (Abb. 3.18, *Pinaceae* bei *Podocarpaceae*). Da die basalen Verzweigungen des *phyP*-Stammbaumes, die die Verwandtschaften der vier Ordnungen der *Gymnospermae* manifestieren, in dieser Analyse nicht statistisch abgesichert werden, könnte diese Tatsache auf dem untersuchten Datensatz der *phyP*-Sequenzen beruhen. *PhyP*-Stammbäume weichen auch bezüglich anderer Fragestellungen von *phyN*- und *phyO*-Topologien ab (z.B. Position von *Sciadopitys*, Position der *Pinaceae*). Untersuchungen der Homoplasi und des phylogenetischen Signals (Huelsenbeck 1991) der drei Genlinien zeigten keine auffälligen Differenzen der *phyN*, *phyO* und *phyP* Datensätze (Daten nicht gezeigt). Worauf die erhaltenen Unterschiede der phylogenetischen Positionen einzelner Taxa zurückzuführen sind, bleibt zu klären.

Die Mehrzahl der untersuchten Datensätze und verwendeten Analysen belegt jedoch eine monophyletische Abstammung von *Podocarpaceae* und *Araucariaceae* (Abb. 3.16, 3.17, 3.19 und 3.20). Innerhalb der *Coniferales* sind sie die basale Schwestergruppe der *Taxaceae / Taxodiaceae / Cupressaceae*-Linie. Diese Position ist in Übereinstimmung mit molekularen Analysen von Chaw *et al.* (1997) und Stefanovic *et al.* (1998).

Die Stellung der *Pinaceae* variiert zwischen einer näheren Verwandtschaft zu *Ginkgo* und *Cycadatae* bzw. den übrigen Pinatae. Klassisch werden die *Pinaceae* anhand morphologischer Daten eindeutig den Pinatae zugeordnet (für eine Zusammenfassung: Doyle 1998). Auch die bereits erwähnten Untersuchungen eines strukturellen cpDNA Merkmals unterstützen, daß die *Pinaceae* diese Mutation mit allen Pinatae teilen und so wahrscheinlich aus einer gemeinsamen Stammart hervorgegangen sind, da alle übrigen *Gymnospermae* dieses Merkmal nicht besitzen (Raubeson und Jansen 1992). Dieser Tatsache entsprechen die Stammbaumtopologien des kombinierten Datensatzes aus *phy*-Sequenzen und 18S rRNA. Dort stellen die *Pinaceae* die basale Gruppe der Pinatae dar, die alle gemeinsam eine Stammart teilen. Zu diesem Ergebnis kommen auch phylogenetische Analysen der 18S rRNA (Chaw *et al.* 1997, Soltis *et al.* 1999) und 28S rRNA (Stefanovic *et al.* 1998).

Eine mögliche Erklärung der Tatsache, daß *Pinaceae* durch Phytochromsequenzen unterschiedlich eingeordnet werden, könnte u.a. eine Genduplikation von *phyN* sein, die bei allen Gruppen der *Coniferales* außer den *Pinaceae* gefunden wurde. Für *Araucariaceae*, *Podocarpaceae*, *Cephalotaxaceae*, *Taxaceae* und *Taxodiaceae* liegen Sequenzen eines

weiteren *phyN*-Subtypes, hier mit *phyN2* bezeichnet, vor. Nimmt man an, daß durch die Genduplikation eine Veränderung der Evolutionsraten von *phyN1* und *phyN2* für die Spezies eintrat, die beide Gene enthalten, so könnte diese Tatsache Mutationsraten von *phyN* und möglicherweise auch *phyO* beeinflussen. Die Pinaceae, welche nur ein *phyN*-Gen besitzen (ein Pseudogen der N-Linie wurde im Genom von *Pinus* sequenziert) könnten dadurch einem abweichenden evolutivem Druck unterlegen haben. Durch die Genduplikation in *phyN1* und *phyN2* könnten sich demnach z.T. die unterschiedlichen Positionen der Pinaceae in Bezug zu den Pinatae deuten lassen. Anhand dieses Beispiels ist erkennbar, daß die Kenntnis der Evolution einzelner Genlinien unabdingbar ist und in Bezug zur Evolution der Organismen zu setzen ist.

Auch die Position der Cycadatae und Ginkgoatae zu den Pinatae variiert bei den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Phylogenien. Morphologische Merkmale ergeben eine basale Stellung der Cycadatae innerhalb der Gymnospermen (Befruchtung durch Spermatozoide, typische Mikro- und Megasporophylle, vielzelliges Megaprothallium) (Crane 1985, Doyle 1996, Nixon *et al.* 1994). Molekulare Phylogenien (*rbcL*, 28S rRNA) deuten an, daß die Cycadatae die Schwestergruppe der Ginkgoatae und Pinatae sind (Hasebe *et al.* 1992, Stefanovic *et al.* 1998). In Kombination mit Daten von Raubeson und Jansen (1992) erscheint die Position der *Ginkgo* / Cycadatae-Gruppe an der Basis der Pinatae wahrscheinlich, wie es die Analysen des kombinierten Datensatzes *phy*+18S rRNA ergeben. Würde man eine Verdopplung des inverted Repeats im Chloroplastengenom eines Vorfahren der rezenten Pinatae annehmen, müßte diese Mutation auch bei Cycadatae und *Ginkgo* zu finden sein, wenn sie eine monophyletische Gruppe mit den Pinaceae bilden. Dies konnte jedoch nicht gezeigt werden (Raubeson und Jansen 1992).

Phylogenetische Analysen der partialen *phy*-Sequenzen und kombinierter Datensätze befürworten durch alle durchgeführten Berechnungen eine gemeinsame Stammart von Cycadatae und *Ginkgo* (alle Bootstrapwerte >63). Auch molekulare Analysen von cpITS-Sequenzen (Goremykin *et al.* 1996), *rpoC1* (Samigullin *et al.* 1999) und 18S rRNA (Chaw *et al.* 1997) ergaben die Monophylie beider Taxa. Zudem teilen beide Gruppen ursprüngliche und innerhalb der Gymnospermae einzigartige Merkmale (Synapomorphien), wie das Vorkommen freibeweglicher Spermatozoide, ein dichotomer Grundbauplan der Laubblätter bei *Ginkgo*, der auch bei ursprünglichen Vertretern der Cycadatae noch zu finden ist. Sitte *et al.* (1999), ebenso wie Page (1990), ordnet hingegen *Ginkgo* und Cycadatae trotz morphologischer und molekularer Evidenzen nach wie vor zwei verschiedenen Unterabteilungen (Coniferophytina bzw. Cycadophytina) zu. Diese systematische Einordnung ist, wie auch hier gezeigt werden konnte, grundlegend zu überdenken.

4.8 Die Phylogenie von Phytochromen unterstützt die Monophylie der Gymnospermae (inklusive Gnetales)

Die Frage, ob Gymnospermae unter Einschluß der Gnetales eine monophyletische Gruppe bilden, war immer strittig und wurde durch molekulare Sequenzen erneut angefaßt. Kladistische Analysen auf der Basis morphologischer Merkmale von rezenten und fossilen Spermatophyten deuten auf eine Verwandtschaft der Gnetatae zu den Angiospermen hin (Abb. 4.1 A), die zusammengefaßt als Antophyten bezeichnet werden (Crane 1985, Crane 1995, Doyle und Donoghue 1986). Molekulare Analysen von 18S rRNA Sequenzen (Chaw *et al.* 1997), *rpoC1* (Samigullin *et al.* 1999), internen transkribierten Spacern (cpITS2 und cpITS3, Goremykin *et al.* 1996) sowie nukleärer MADS-box Gene (Winter *et al.* 1999) unterstützen hingegen die Monophylie der Gymnospermae (Abb. 4.1 B und C).

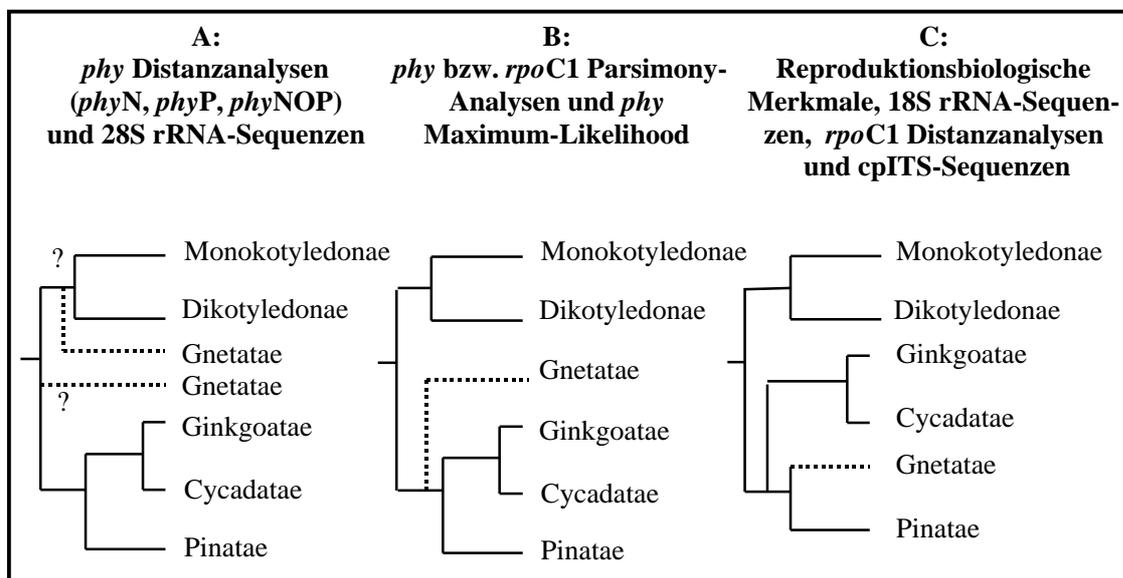


Abb. 4.1: Vergleich der Stammbaumtopologien, die anhand von molekularen Daten (*phy*: die vorliegende Arbeit, 18S rRNA: Chaw *et al.* 1997, *rpoC1*: Samigullin *et al.* 1999, cpITS2 und cpITS3: Goremykin *et al.* 1996) erhalten wurden. Ein wichtiges reproduktionsbiologisches Merkmal (Befruchtung durch Spermatozoide bzw. Spermakerne) wurde zusätzlich als Merkmal berücksichtigt.

Unsere Analysen zeigen die Gnetatae als monophyletische Gruppe, die in den meisten Fällen ein Abkömmling der Gymnospermae ist (Abb. 4.1 A und B). Abb. 4.1 stellt die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen synoptischen Topologien im Vergleich zu anderen molekularen Phylogenien dar. Parsimony-Analysen von Phytochromen unterstützen in allen untersuchten Fällen die gemeinsame Abstammung der Gymnospermae (Abb. 4.1 B), wobei kombinierte Datensätze diese Gruppe mit den höchsten Bootstrapwerten absichern (93/90). Die niedrigen Bootstrapwerte der Einzelanalysen von *phyN* und *phyP* könnten wiederum durch die

unterschiedlichen Evolutionsraten von gymno- und angiospermen Phytochromgenen bedingt sein. Relative-Raten-Tests mit *Marchantia* als Bezugsorganismus ergaben für Gymnospermen durchschnittlich 0,33 Substitutionen pro untersuchtes Nukleotid und für Angiospermen zwischen 0,38 und 0,41. Die Gnetatae zeigten teilweise einen mittleren Wert bei 0,35. Parsimony-Analysen können durch unterschiedliche Evolutionsraten orthologer Gene zu unerwarteten Phylogenien führen (Felsenstein 1978). Diese Tatsache könnte die geringen Bootstrapunterstützungen der Parsimony-Analysen bewirken.

Grundsätzlich problematischer stellen sich Distanz-Analysen dieser Datensätze dar, die in zwei von vier Fällen die Gnetatae den Angiospermae zuordnen (beide <50) und in einem weiteren Fall als Schwestergruppe zu Angio- und Gymnospermae (<50) (Abb. 4.1 A). Auch hier kann dieses Verzweigungsmuster durch unterschiedliche Evolutionsraten der Organismen bedingt sein (long branch attraction, Felsenstein 1987). Der größte kombinierte Datensatz (*phyN+phyO+phyP+18S rRNA*) sowie alle Maximum-Likelihood und Parsimony Analysen hingegen belegen eine Monophylie der Gymnospermen (Abb. 4.1 B). Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so unterstützt diese Arbeit eher die Möglichkeit, daß alle rezenten Gymnospermae einen gemeinsamen Vorfahren teilten.

Daß die Gnetatae die basale Gruppe der Gymnospermae bilden (Abb. 4.1 B), worauf die durch Phytochrome erhaltene Phylogenie der Gymnospermen hinweist, ist jedoch schwer mit einem reproduktionsbiologischen Merkmal vereinbar: die Befruchtung erfolgt bei den Cycadatae und bei *Ginkgo* mit Spermatozoiden wohingegen bei allen Angiospermen und den restlichen Gymnospermen die Befruchtung mit Spermakernen erfolgt. Dieses ursprüngliche Merkmal, das sonst nur bei Pteridophyten zu finden ist, würde eine basale Position von *Ginkgo* und Cycadate innerhalb der Gymnospermen erfordern (Abb. 4.1 C).

Differierende Stammbaumtopologien bei unterschiedlichen Analysemethoden beobachteten auch Samigullin *et al.* (1999) bei Phylogenien anhand von *rpoC1*. In Abhängigkeit von der verwendeten Analyseverfahren stand *Gnetum* bei *Pinus* (Maximum-Likelihood und Distanz-Analysen) bzw. an der Basis der Gymnospermen (Parsimony-Baum) (Abb. 4.1 B bzw. C). Hingegen zeigen 18S rRNA-Sequenzen, die homogenere Evolutionsraten im Pflanzenreich haben, Cycadatae an der Basis der Gymnospermen gefolgt von Gnetatae (Abb. 4.1 C). Diese Phylogenie der Gymnospermae wäre auch im Hinblick auf Phytochromsequenzen und des diskutierten reproduktionsbiologischen Merkmals die wahrscheinlichste.

Neueste molekulare Phylogenien, die anhand von kombinierten Datensätzen der drei Genome von Pflanzen erhalten wurden (*rbcL* als plastidäres Gen + *cox1* als mitochondriales Gen + 18S rRNA als nukleäre Sequenzen), belegen ebenfalls die Monophylie aller rezenten Gymnospermen (Bowe *et al.* 2000, Chaw *et al.* 2000). Außerdem unterstützen sie die Annahme, daß die Gnetatae Verwandte der Pinatae sein könnten (Abb. 4.1 C).

4.9 Niedere Pflanzen besitzen bis zu drei orthologe Phytochromgene und mehrere paraloge

In Moosen konnten bislang zwei Phytochromgene gefunden werden, wovon lediglich eines der konventionellen Phytochromstruktur entspricht (Thümmler *et al.* 1992, Schneider-Poetsch *et al.* 1994, Hughes *et al.* 1996).

Für Farne wurden unterschiedliche Angaben bezüglich der Größe der Genfamilie von Phytochromen gemacht. In *Anemia* wurden vier verschiedene Gene (*Anemia phy* B1-B4) gefunden (Maucher 1994) und in *Adiantum* konnten zwei konventionelle Phytochrome (*Adiantum phy* 1 und 2) auf genomischer und cDNA-Ebene sequenziert werden (Okamoto *et al.* 1993). In *Psilotum* wurden drei genomische und zwei cDNA Teilsequenzen gefunden (Schneider-Poetsch *et al.* 1994). Die Ähnlichkeit dieser Teilsequenzen liegt zwischen 5 und mehr als 22% auf Aminosäureebene und unter den genomischen Sequenzen könnten auch Pseudogene vorliegen.

Faßt man diese Daten zusammen, so könnte die Phytochromgenfamilie in Farnen aus vier vielleicht auch mehr Mitgliedern bestehen. Betrachtet man die in dieser Arbeit erhaltene Phylogenie anhand partialer Phytochromfragmente unter dem Aspekt der Evolution dieser Genfamilie, ergeben sich folgende Zusammenhänge.

Moose besitzen ein konventionelles Phytochromgen. Eine erste Genduplikation könnte bei einem Vorfahren der Lycopodiatae erfolgt sein, da in *Huperzia* zwei unterschiedliche Phytochromgene gefunden wurden (Identität 72,6%).

Bei den echten Farnen konnten durch PCR-Analysen für die eusporangiaten Formen *Angiopteris* und *Marattia* zwei Genlinien gefunden werden (*phy1* und *phy2*), für *Botrychium*, *Ophioglossum*, *Psilotum* und *Tmesipteris* nur *phy2*. In *Tmesipteris* konnte lediglich ein Pseudogen gefunden werden und in *Botrychium* ein weiterer Subtyp von *phy2*. Möglicherweise konnten mit den hier verwendeten Primern keine Amplifikate für die zweite Genlinie von Ophioglossales und Psilotales erhalten werden. Möglich wäre aber auch, daß in Ophioglossales und Psilotales diese Genlinie nicht vorliegt. Aufgrund ihrer Stellung innerhalb der Phylogenie der Farne wäre auch die zweite Erklärungshypothese möglich, da sie zur Gruppe der primitiven Farne gerechnet werden (Hasebe *et al.* 1995, Schneider 1996, Wolf 1997, Sitte *et al.* 1999). Die Genduplikation wäre folglich in einem gemeinsamen Vorfahren von Marattiales, Osmundaceae und leptosporangiaten Farnen erfolgt.

In leptosporangiaten Farnen hat offensichtlich eine zweite Genduplikation stattgefunden. Die in dieser Analyse erhaltene Phylogenie befürwortet das Vorkommen von bis zu drei orthologen Genen in leptosporangiaten Farnen (*phy1*, *phy2A*, *phy2B*) sowie zwei in Marattiales (*phy1*, *phy2*). Zusätzlich konnten in einzelnen Organismen der niederen und mittleren Entwicklungsstufe echter Farne weitere paraloge Gene und Pseudogene gefunden werden. Im Genom dieser Organismen scheinen sich mehrere Kopien von Phytochromgenen unabhängig weiterentwickelt zu haben und mehrere Subtypen können entstanden sein. Diese Tatsache erschwert die Interpretation der Phylogenie von Organismengruppen anhand von

Phytochromgenen, da orthologe Gene nicht eindeutig identifizierbar sind. Zudem könnten durch die hohen Kopiezahlen der Chromosomen variable Evolutionsraten auch der orthologen Gene vorliegen, wodurch das phylogenetische Signal abgeschwächt werden kann.

Aus diesen Gründen können die basalen Topologien der Niederen Pflanzen durch Phytochromfragmente nicht beurteilt werden. Die Bootstrapabsicherungen dieser Verzweigungspunkte sind zu gering. Zudem veränderten sich diese Topologien in Abhängigkeit von dem untersuchten Datensatz bzw. der verwendeten Outgroup-Organismen. Molekulare und auch morphologische Phylogenien von Niederen Pflanzen stellen generell eine Herausforderung dar. Aufgrund des hohen stammesgeschichtlichen Alters dieser Gruppen, die ersten Landpflanzen entwickelten sich im Silur vor etwa 450 Mio. J. (Stewart und Rothwell 1993, Sitte *et al.* 1999), beeinträchtigt die Untersuchung rezenter Vertreter ein hohes Maß an Homoplasie. Viele morphologische Strukturen sind nicht eindeutig homologisierbar. So wurden die Psilophyten lange als ursprünglichste Gruppe innerhalb der Pteridophyten angesehen (Bremer 1985, Parenti 1980, Sitte *et al.* 1999). Molekulare Analysen hingegen deuteten an, daß Lycopodiatae die ursprünglichsten Pteridophyten sind (Raubeson und Jansen 1992, Malek *et al.* 1996, Qiu *et al.* 1998, Qiu und Palmer 1999, Duff und Nickrent 2000) und daß die Psilotatae mit den Ophioglossaceae verwandt sind (Malek *et al.* 1996, Wolf 1997). Die morphologischen Strukturen der Psilophyten wurden folglich lange als ursprünglich eingestuft (strikt dichtotomer Aufbau, Wurzellosigkeit, Gametophyt mit Leitgeweben) und erst in neuerer Zeit diskutiert, daß es sich in diesem Fall um Atavismen handeln könnte. Auch die hier erhaltenen Phylogenien anhand von partialen Phytochromgenen belegen eine gemeinsame Entstehung dieser Gruppe mit Ophioglossaceae (Abb. 3.21).

Die Ergebnisse des hier vorliegenden Datensatzes der Niederen Pflanzen sind folglich ein erster Ansatz zur detaillierteren Beschreibung der Phylogenie der Phytochromgenfamilie innerhalb cryptogamer Pflanzen. Um diese Daten abzusichern, müßte er durch Sequenzen weiterer Moose, Lycopodiatae sowie eu- und leptosporangiaten Farne ergänzt werden. Interessant im Hinblick auf die Phylogenie der Organismen könnte die Untersuchung längerer Sequenzen v.a. von variableren Bereichen im C-Terminus von Phytochromen sein.

5 Zusammenfassung

Phytochrome sind die bestuntersuchten Photorezeptoren in Pflanzen. Viele Daten liegen über lichtabhängige Morphogenesen sowie über die Mitglieder der Phytochromgenfamilie in Angiospermen vor. Hingegen ist wenig über lichtregulierte Phänomene in Gymnospermen bekannt und es gibt kaum Informationen über deren Phytochrome.

Die Untersuchung einiger Photomorphogenesen von Gymnospermen wurde am Beispiel von *Pinus sylvestris* L. durchgeführt. Auffällig ist, daß dunkelangezogene Keimlinge von *Pinus* Chlorophyll und Anthocyane synthetisieren. Biochemische Analysen ergaben, daß lichtgewachsene Keimlinge etwa 50% mehr Chlorophylle bzw. 20% mehr Anthocyan im Vergleich zu dunkelgewachsenen enthalten. Auch phänotypisch ist der Unterschied zwischen licht- und dunkelangezogenen Keimlingen weniger auffällig als bei den meisten angiospermen Pflanzen. Das Hypokotyl von sieben Tage alten Keimlingen, die in Dunkelheit angezogen wurden, war durchschnittlich 25% länger als die Lichtkontrolle. Die Kotyledonen waren entwickelt und im Vergleich zu lichtgewachsenen Pflanzen lediglich nicht entfaltet und schwächer pigmentiert.

Immunoblotanalysen zur lichtabhängigen Regulation der Expression von ALAD, LHCII, CHS, β -Amylase und RBCL mit Gesamtproteinextrakten von *Pinus* ergaben ein lichtunabhängiges Vorliegen dieser Proteine.

Um möglichst viele Phytochromgene einer Spezies zu erhalten, wurde ein Standardverfahren entwickelt. Durch PCR-Amplifikationen von genomischer DNA und anschließenden RFLP-Analysen konnten 84 Phytochromfragmente von Bryophyta, Pteridophyta und v.a. Gymnospermen sequenziert werden, die für einen konservierten Bereich kodieren, welcher die Chromophorbindungsstelle umgibt.

In *Pinus* wurden zwei Fragmente gefunden, die bekannten Genlinien zugeordnet werden konnten: *phyO* und *phyP*. Drei weitere Fragmente kodieren für eine neue Genlinie *phyN*, die ein Subtyp von *phyO* ist (75% Identität auf Nukleinsäureebene). Zwei dieser Fragmente waren allelisch, ein weiteres ein Pseudogen mit mehreren Stopcodons im wahrscheinlichen Leseraster. Mittels dieser Genfragmente lagen Matrizen für spezifische Sonden von *phyO* und *phyN* vor. Diese wurden für das Durchsuchen einer cDNA-Bank von *Pinus* eingesetzt. Es konnte ein Teillängenklon (2955 bp) von *phyN* isoliert werden. Weitere Phytochromgene wurden in dieser cDNA-Bank nicht gefunden.

Immunoblotanalysen von Gesamtproteinextrakten von *Pinus*, die mit dem phytochromspezifischen mkAK Z-3B1 inkubiert wurden, zeigten eine Anreicherung von Phytochrom in dunkelgewachsenen Keimlingen. Belichtete man etiolierte Keimlinge, so nahm die Phytochrommenge ab. Die Halbwertszeit des Abbaus lag bei 4 h. Ein Gleichgewichtszustand von etwa 27% wurde nach 24 h erreicht. Mit Hilfe von heterolog exprimierten Fusionsproteinen von PHYN, PHYO und PHYP, die das Bindungsepitop von Z-

3B1 enthielten, wurde festgestellt, daß Z-3B1 PHYN und PHYP markiert. Der beobachtete Phytochromabbau könnte somit beide Phytochrome betreffen. Um diese Beobachtung auf einen Phytochromtyp spezifizieren zu können, wurden die heterologen Proteine angereichert und für die Produktion von Antiseren verwendet. Erste Immunoblotanalysen mit den Antiseren gegen PHYN und PHYP deuten an, daß PHYN in dunkelangezogenen Keimlingen von *Pinus* akkumuliert vorliegt und nicht in lichtgewachsenen. Demgegenüber lag PHYP auch in lichtgewachsenen Keimlingen vor.

Auf der Basis von kompletten und partialen Phytochromsequenzen wurden phylogenetische Analysen durchgeführt. Die Stammbäume ergaben annähernd die gleichen Verzweigungsmuster. Sie spiegeln die Evolution der Landpflanzen, wie sie anhand von fossilen Daten belegt ist, bis auf einen Punkt wider: *Psilotum* ist in diesen Analysen kein 'Urfarn' sondern scheint den echten Farnen näher zu stehen als bisher angenommen.

Weitere Analysen der Phytochromfragmente von 30 Taxa bestätigten das Vorkommen von drei Genlinien in Gymnospermen. In der entwicklungs geschichtlich jüngsten Gruppe der Gymnospermen (Pinatae exklusiv Pinaceae) konnte eine zusätzliche PHYN-Sublinie identifiziert werden.

Da Sequenzdaten von Gymnospermen für alle Genlinien vorlagen, konnte die Phylogenie der Organismen für drei Datensätze untersucht werden. Erstaunlich war, daß die erhaltenen Verzweigungsmuster der Einzelanalysen nicht übereinstimmten. Problematisch erschien v.a. die Einordnung der Podocarpaceae und Pinaceae. Durch Analysen von kombinierten Datensätzen der drei Phytochromgenlinien und die weitere Ergänzung von 18S rRNA Sequenzen wurden die Stammbäume in Abhängigkeit von der verwendeten Analyse methode einheitlicher jedoch in keinem der Fälle ganz übereinstimmend. Zusammenfassend ließen sich folgende Zusammenhänge erkennen:

Phylogenetische Analysen von Phytochromfragmenten stellen die Gymnospermen in den meisten Fällen als monophyletische Gruppe dar. Die basale Position wurde den Gnetatae zugeordnet. Nächstfolgend wären *Ginkgo* und Cycadatae entstanden, die einen gemeinsamen Vorfahren teilen. Die Pinatae bilden die Kronengruppe innerhalb derer zwei Gruppierungen auffallen: Podocarpaceae und Araucariaceae sind demnach nah verwandt, ebenso Sciadopityaceae, Taxaceae, Cephalotaxaceae, Taxodiaceae und Cupressaceae.

Auch für Niedere Pflanzen konnten mehrere Phytochromlinien gefunden werden. Bereits in Lycopodiatae wurden zwei Phytochromgene sequenziert ebenso wie in den Marattiales und allen untersuchten leptosporangiaten Farnen. Eine dritte Linie wurde nur in höher entwickelten leptosporangiaten Farnen gefunden. Die Phylogenie der Niederen Pflanzen ist durch Phytochromgenfragmente nur bedingt darstellbar, da basale Gruppierungen nur mit geringen Bootstrapwerten abgesichert sind. Zudem liegen weitere Phytochromsublinien vor, wodurch die Interpretation der Verzweigungsmuster erschwert wird. Jedoch belegen auch diese Analysen die auffällige Position von *Psilotum*. Sie zeigen *Psilotum* und *Tmesipteris* als Verwandte der Ophioglossales, demnach nicht als 'Urfarne' wie bisher angenommen

6 Literaturverzeichnis

- Ahmad, M. und Cashmore, A.R.** (1993) *HY4* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 162-166.
- Alba, R., Kelmenson, P.M., Cordonnier-Pratt, M.-M. und Pratt, L.H.** (2000) The phytochrome gene family in tomato and the rapid differential evolution of this family in angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 362-373.
- Alosi, M.C. und Neale, D.B.** (1992) Light- and phytochrome mediated gene expression in douglas-fir seedlings. *Physiol. Plant.* **86**, 71-76.
- Alosi, M.C., Neale, D.B. und Kinlaw, C.S.** (1990) Expression of *cab* genes in douglas-fir is not strongly regulated by light. *Plant. Physiol.* **93**, 829-832.
- Argüello-Astorga, G. und Herrera-Estrella, L.** (1998) Evolution of light-regulated plant promoters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 525-555.
- Armstrong, G.A.** (1998) Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **43**, 87-100.
- Biggs, J., Hersperger, E., Steeg, P.S., Liotta, L.A. und Shearn, A.A.** (1990) A *Drosophila* gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell* **63**, 933-940.
- Birnbaum, H.C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* **12**, 8711-8721.
- Bonenberger, J., Schendel, R., Schneider-Poetsch, H.A. und Rüdiger, W.** (1992) Structural studies on the photoreceptor phytochrome: reevaluation of the epitope for monoclonal antibody Z-3B1. *Photochem. Photobiol.* **56**, 717-723.
- Borthwick, H.A., Hendricks, M.W. und Parker, M.W.** (1952) A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **38**, 662-666.
- Borthwick, H.A., Hendricks, S.B., Toole, E.H. und Toole, V.K.** (1954) Action of light on lettuce-seed germination. *Botanical Gazette* **115**, 205-225.
- Bousquet, J., Strauss, S.H., Doerksen, A.H. und Price, R.A.** (1992) Extensive variation pattern in evolutionary rate of *rbcL* gene sequences among seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7844-7848.
- Bowe, L.M., und DePamphilis, C.W.** (1997) Conflict and congruence among three plant genetic compartments: Phylogenetic analysis of seed plants from gene sequences of *cox1*, *rbcL*, and 18S rDNA. *Am. J. Bot.* **84**, 178-179.
- Bowe, M.L., Coat, G. und dePamphilis, C.W.** (2000) Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: Extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives to conifers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4092-4097.

- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamaguta, H. und Chua, N.-H.** (1994) Cyclic GMP and Calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**, 73-81.
- Boylan, M.T. und Quail, P.H.** (1991) Phytochrome A overexpression inhibits hypocotyl elongation in transgenic *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10806-10810.
- Bremer, K.** (1985) Summary of green plant phylogeny and classification. *Cladistics* **1**, 369-385.
- Britten, R.J.** (1986) Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science* **231**, 1393-1398.
- Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelmann, H.W. und Hendricks, S.B.** (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **45**, 1703-1708.
- Chase, M.W., Soltis, D.E., Olmstead, R.G., Morgan, D., Les, D.H., Mishler, B.D., Duvall, M.R., Price, R.A., Hills, H.G., Qiu, Y.-L., Kron, K.K., Rettig, J.H., Conti, E., Palmer, J.D., Manhart, J.R., Sytsma, K.J., Micheals, H.J., Kress, W.J., Karol, K.G., Clark, W.D., Hedren, M., Gaut, B.S., Jansen, R.K., Kim, K.-J., Wimpee, C.F., Smith, J.F., Furnier, G.R., Strauss, S.H., Xiang, Q.-Y., Plunkett, G.M., Soltis, P.S., Sewnsen, S.M., Williams, S.E., Gadek, P.A., Barrett, S.C.H., Dayanadan, S. und Albert, V.A.** (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **80**, 528-580.
- Chaw, S.-M., Long, H., Wang, B.-S., Zharkikh, A. und Li, W.-H.** (1993) The phylogenetic position of Taxaceae based on 18S rRNA sequences. *J. Mol. Evol.* **37**, 624-630.
- Chaw, S.-M., Sung, H.-M., Long, H., Zharkikh, A. und Li, W.-H.** (1995) The phylogenetic positions of the conifer genera *Amentotaxus*, *Phyllocladus*, and *Nageia* inferred from 18S rRNA sequences. *J. Mol. Evol.* **41**, 224-230.
- Chaw, S.-M., Zharkikh, A., Sung, H.-M., Lau, T.-C. und Li, W.-H.** (1997) Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 56-68.
- Chaw, S.-M., Parkinson, C.-L., Cheng, Y., Vincent, T.M. und Palmer, J.D.** (2000) Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: Monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4086-4091.
- Cherry, J.R., Hershey, H.P. und Vierstra, R.D.** (1991) Characterisation of tobacco expressing functional oat phytochrome: domains responsible for the rapid degradation of P_{fr} are conserved between monocots and dicots. *Plant Physiol.* **96**, 775-785.

- Cherry, J.R., Hondred, D., Walker, J.M. und Vierstra, R.D.** (1992) Phytochrome requires the 6-kDa N-terminal domain for full biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5039-5043.
- Cherry, J.R., Hondred, D., Walker, J.M., Keller, J.M., Hershey, H. und Vierstra, R.D.** (1993) Carboxy terminal deletion analysis of oat phytochrome A reveals the presence of separate domains required for structure and biological activity. *Plant Cell* **5**, 565-575.
- Childs, K.L., Miller, F.R., Cordonier-Pratt, M.-M, Pratt, L.-H., Morgan, P.W. und Mullet, J.E.** (1997) The *Sorghum* photoperiod sensitivity gene, *Ma3* encodes a phytochrome B. *Plant Physiol.* **113**, 611-619.
- Chinn, E. und Silverthorne, J.** (1993) Light-dependent chloroplast development and expression of a light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein gene in the gymnosperm *Ginkgo biloba*. *Plant Physiol.* **103**, 727-732.
- Choi, G., Yi, H., Lee, J., Kwon, Y.-K., Soh, M.S., Shin, B., Luka, Z., Hahn, T.-R. und Song, P.-S.** (1999) Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* **401**, 610-613.
- Christensen, A.H. und Quail, P.H.** (1989) Structure and expression of a maize phytochrome-encoding gene. *Gene* **85**, 381-390.
- Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E. und Briggs, W.R.** (1998) *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**, 1698-1701.
- Church, G.M. und Gilbert, W.** (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995.
- Clack, T., Mathews, S. und Sharrock, R.A.** (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of *PHYD* and *PHYE*. *Plant Mol. Biol.* **25**, 413-427.
- Clapham, D.H., Kolukisaoglu, H.Ü., Larsson, C.-L., Qamaruddin, M., Ekberg, I., Wiegmann-Eirund, C., Schneider-Poetsch, H.A.W. und von Arnold, S.** (1999) Phytochrome types in *Picea* and *Pinus*. Expression patterns of *PHYA*-related types. *Plant Mol. Biol.* **40**, 669-678.
- Clough, R.C. und Vierstra, R.D.** (1997) Phytochrome degradation. *Plant Cell Environ.* **20**, 713-721.
- Clough, R.C., Jordan-Beebe, E.T., Lohmann, K.N., Marita, J.M., Walker, J.M., Gatz, C. und Vierstra, R.D.** (1999) Sequences within both the N- and C-terminal domains of phytochrome A are required for P_{FR} ubiquitination and degradation. *Plant J.* **17**, 155-167.
- Cordonnier, M.-M., Greppin, H. und Pratt, L.H.** (1986) Phytochrome from green *Avena* shoots characterized with a monoclonal antibody to phytochrome from etiolated *Pisum* shoots. *Biochem.* **25**, 7657-7666.

- Corell, D.L., Edward, J.L. und Shropshire Jr., W.** (1977) Phytochrome: A bibliography with author, biological materials, taxonomic, and subject indexes of publications prior to 1975. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., USA.
- Crane, P.R.** (1985) Phylogenetic analysis of seed plants and the origin of angiosperms. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **72**, 716-793.
- Crane, P.R., Friis, E.M. und Pedersen, K.R.** (1995) The origin and early diversification of angiosperms. *Nature* **374**, 27-33.
- Czelusniak, J., Goodman, M., Hewett-Emmett, D., Weiss, M.L., Venta, P.J. und Tashian, R.E.** (1982) Phylogenetic origins and adaptive evolution of avian and mammalian haemoglobin genes. *Nature* **298**, 297-300.
- Day, I.N.M., Peshavaria, M. und Quinn, G.B.** (1993) A differential molecular clock in enolase isoprotein evolution. *J. Mol. Evol.* **36**, 599-601.
- Deforce, L., Furuya, M. und Song, P.-S.** (1993) Mutational analysis of the pea phytochrome A chromophore pocket: Chromophore assembly with apophytochrome A and photoreversibility. *Biochemistry* **33**, 4918-4922.
- Doyle, J.A.** (1998) Molecules, morphology, fossils, and the relationship of angiosperms and gnetales. *Mol. Phyl. Evol.* **9**, 448-462.
- Doyle, J.A. und Donoghue, M.J.** (1986) Seed plant phylogeny and the origin of the angiosperms: an experimental cladistic approach. *Bot. Rev.* **52**, 321-431, 673-679.
- Doyle, J.J. und Doyle, J.L.** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.
- Doyle, J.A.** (1996) Seed plant phylogeny and the relationships of the gnetales. *Int. J. Plant Science* **157**, S3-S39.
- Duff, R.J. und Nickrent, D.L.** (2000) Phylogenetic relationships of land plants using mitochondrial small-subunit rDNA sequences. *Am. J. Bot.* **86**, 372.
- Durbin, M.L., McCaig, B. und Clegg, M.T.** (2000) Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Mol. Biol.* **42**, 79-92.
- Ehmann, B., Ocker, B. und Schäfer, E.** (1991) Development- and light-dependent regulation of the expression of two different chalcone synthase transcripts in mustard cotyledons. *Planta* **183**, 416-422.
- Fankhauser, C., Yeh, K.-C., Lagarias, J.C., Zhang, H., Elich, T.D. und Chory, J.** (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **284**, 1539-1541.
- Farrens, D., Holt, R., Roaspendowski, B., Song, P.-S. und Cotton T.** (1989) Surface-enhanced resonance Raman Scattering (SERRS) Spectroscopy applied to phytochrome and its model compounds. II: Phytochromes and phycocyanins chromophores. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 9162-9169.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.

- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1984) Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**, 266-267.
- Felsenstein, J.** (1978) Cases in which parsimony or compatibility methods will positively misleading. *Syst. Zool.* **27**, 401-410.
- Felsenstein, J.** (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**, 368-376.
- Felsenstein, J.** (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Felsenstein, J.** (1987) Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set. *J. Mol. Evol.* **26**, 123-31.
- Felsenstein, J.** (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5C. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fernbach, E. und Mohr, H.** (1990) Coaction of blue/ultraviolet-A light and light absorbed by phytochrome in controlling growth of pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Planta* **180**, 212-216.
- Fischer, B., Sumner, I. und Goodenough, P.** (1992) Isolation and renaturation of bio-active proteins expressed in *E.coli* as inclusion bodies. *Drug. Res.* **42**, 1512-1515.
- Folch, J., Lees, M. und Stanley, G.H.S.** (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 496-509.
- Frohnmeyer, H., Ehmann, B., Kretsch, T., Rocholl, M., Harter, K., Nagatani, A., Furuya, M., Batschauer, A., Hahlbrock, K. und Schäfer, E.** (1992) Differential usage of photoreceptors for chalcone synthase gene expression during plant development. *Plant J.* **2**, 899-906.
- Fu, D.Z.** (1992) Nageiaceae - a new gymnosperm family. *Acta Phytotaxonomica Sinica* **30**, 515-528.
- Furuya, M. und Song, P.-S.** (1994) Assembly and properties of holophytochrome. In: Photomorphogenesis in plants. 2. Aufl. (Hrsg.: Kendrick, R.E. und Kronenberg, G.H.M., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 105-140.
- Gaut, B., Muse, S.V., Clark, W.D. und Clegg, M.T.** (1992) Relative rates of nucleotide substitution at the *rbcL* locus in monocotyledonous plants. *J. Mol. Evol.* **35**, 292-303.
- Gibbs, P.E., Witke, W.F. und Dugaiczyk, A.** (1998) The molecular clock runs at different rates among closely related members of a gene family. *J. Mol. Evol.* **46**, 552-61.
- Goodman, M.** (1981) Decoding the pattern of protein evolution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **38**, 105-164.
- Goremykin, V., Bobrova, V., Pahnke, J., Troitsky, A., Antonov, A. und Martin, W.** (1996) Noncoding sequences of the slowly evolving chloroplast inverted repeat in addition to *rbcL* data do not support gnetalean affinities of angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 383-396.

- Green, B.R. und Pichersky, E.** (1994) Hypothesis for the evolution three-helix chl *a/b* and chl *a/c* light-harvesting antenna proteins from two-helix and four-helix ancestors. *Photosyn. Res.* **39**, 149-162.
- Grimm, R., Eckerskorn, F., Lottspeich, R., Zenger, C. und Rüdiger, W.** (1988) Sequence analysis of proteolytic fragments of 124 kDa phytochrome from etiolated *Avena sativa* L. Conclusions on the conformation of the native protein. *Planta* **174**, 396-401.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-80.
- Hanelt, S.** (1994) Phytochrome in Farnen: Isolierung, Expression und Evolution. Dissertation Universität zu Köln.
- Harlow, E. und Lane, D. (Hrsg.)** (1988) Antibodies - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Harris, T.M.** (1976) The mesozoic gymnosperms. *Rev. Paleobot. Palyn.* **21**, 119-134.
- Hart, J.A.** (1987) A cladistic analysis of conifers: preliminary results. *Journal of the Arnold Arboretum* **68**, 269-307.
- Harter, K., Kircher, S., Frohnmeyer, H., Krenz, M., Nagy, F. und Schäfer, E.** (1994) Light regulated modification and nuclear translocation of cytosolic binding factors in parsley. *Plant Cell* **6**, 545-559.
- Hasebe, M., Kofuji, R., Ito, M., Kato, M., Iwatsuki, K. und Ueda, K.** (1992) Phylogeny of gymnosperms inferred from *rbcL* data do not support gnetalean affinities of angiosperms. *Bot. Mag.* **105**: 673-679.
- Hasebe, M., Wolf, P.G., Pryer, K.M., Ueda, K., Ito, M., Sano, R., Gastony, G.J., Yokoyama, J., Manhart, J.R., Murakami, N., Crane, E.H., Haufler, C.H. und Hauk, W.D.** (1995) Fern phylogeny based on *rbcL* nucleotide sequences. *Am. Fern J.* **85**, 134-181.
- Hauser, B.A., Cordonnier-Pratt, M.-M., Daniel-Vedele, F. und Pratt, L.H.** (1995) The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. *Plant Mol. Biol.* **29**, 1143-1155.
- Hennig, L., Büche, C., Eichenberg, K. und Schäfer, E.** (1999) Dynamic properties of endogenous phytochrome A in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* **121**, 571-577.
- Henning, W.** (1966) Phylogenetic systematics. University Illinois Press, Urbana.
- Hershko, A. und Ciechanover, A.** (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 761-807.
- Howe, G.T., Bucciaglia, P.A., Hackett, W.P., Furnier, G.R., Cordonnier-Pratt, M.-M. und Gardner, G.** (1998) Evidence that the phytochrome gene family in black cottonwood has one PHYA locus and two PHYB loci but lacks members of the PHYC/F and PHYE subfamilies. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 160-175.
- Huelsenbeck, J.P.** (1991) Tree-length distribution skewness: an indicator of phylogenetic information. *Syst. Zool.* **40**, 257-270.

- Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gärtner, W., Wilde, A. und Börner, T.** (1997) A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**, 663.
- Hughes, J.E., Lamparter, T. und Mittmann, F.** (1996) CpPHY2 (PHYCER2), a 'normal' phytochrome in *Ceratodon* (Accession No. U56698) (PGR96-067). *Plant Physiol.* **112**, 446.
- Jansson, S., Meyer-Gauen, G., Cerff, R. und Martin, W.** (1994) Nucleotide distribution in gymnosperm nuclear sequences suggests a model for GC-content change in land-plant nuclear genomes. *J. Mol. Evol.* **39**, 34-36.
- Jenkins, G.I., Christie, J.M., Fuglevand, G., Long, J.C. und Jackson, J.A.** (1995) Plant responses to UV and blue light: Biochemical and genetic approaches. *Plant Science* **112**, 117-138.
- Jones, A.M. und Erickson, H.P.** (1989) Domain structure of phytochrome from *Avena sativa*. *Photochem. Photobiol.* **49**, 479-483.
- Kaczor, C.M., Smith, M.W., Sangwan, I. und O'Brian, M.R.** (1994) Plant - aminolevulinic acid dehydratase. *Plant Physiol.* **104**, 1411-1417.
- Kaneko, T., Tanaka, A., Sato, S., Kotani, H., Sazuka, T., Miyajima, N., Sugiura, M. und Tabata, S.** (1995) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803.I. Sequence features in the 1 MB region from map position 64% to 92% of the genome. *DNA Res.* **2**, 153-166, 191-198.
- Kehoe, D.M. und Grossmann, A.R.** (1996) Sensor of chromatic adaption is similar to phytochrome and ethylene receptors. *Science* **273**, 1409-1412.
- Kerckhoff, L.H.J.** (1996) Physiological functions of phytochromes in tomato: A study using photomorphogenic mutants. Thesis Wageningen, Niederlande.
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schäfer, E. und Nagy, F.** (1999a) Light quality dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* **10**, 1445-1456.
- Kircher, S., Wellmer, F., Nick, P., Rügner, A., Schäfer, E. und Harter, K.** (1999b) Nuclear import of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by phytochrome photoreceptors. *J. Cell Biol.* **144**, 201-211.
- Kishino, H. und Hasegawa, M.** (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *J. Mol. Evol.* **29**, 170-179.
- Kojima, K., Sasaki, S. und Yamamoto, N.** (1994) Light-independent and tissue-specific expression of a reporter gene mediated by the pine cab-6 promotor in transgenic tobacco. *Plant J.* **6**, 591-596.
- Kolukisaoglu, H.Ü.** (1997) Struktur und Evolution pflanzlicher Photorezeptoren (Phytochrom und Cryptochrom). Dissertation Universität zu Köln.

- Kolukisaoglu, H.Ü., Braun, B., Martin, W.F. und Schneider-Poetsch, H.A.W.** (1993) Mosses do express conventional, distantly B-type-related phytochromes. *FEBS Letters* **334**, 95-100.
- Kolukisaoglu, H.Ü., Marx, S., Wiegmann, C., Hanelt, S. und Schneider-Poetsch, H.A.W.** (1995) Divergence of the phytochrome gene family predates angiosperm evolution and suggests that *Selaginella* and *Equisetum* arose prior to *Psilotum*. *J. Mol. Evol.* **41**, 329-337.
- Kramer, K.U. und Tryon, R.M.** (1990) Pteridophytes. In: Kubitzki K. (Hrsg.): The families and genera of vascular plants. Springer Verlag Berlin, Vol. 1, 11-277.
- Kraml, M.** (1994) Light direction and polarization. In: Kenrick, R.E und Kronenberg, G.M.H. (Hrsg.), Photomorphogenesis in plants. 2. Aufl., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 417-443.
- Laemmli, E.K.** (1979) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lagarias, D.M., Wu, S.H. und Lagarias, J.C.** (1995) Atypical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Mol. Biol.* **29**, 1127-1142.
- Lichtenthaler, H.K. und Wellburn, A.R.** (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 591-592.
- Lin, C.T., Yang, H.Y., Guo, H.W., Mockler, T., Chen, J. und Cashmore, A.R.** (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue-light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2686-2690.
- Malek, O., Lüttig, K., Hiesel, R., Brennicke, A. und Knoop, V.** (1996) RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants. *EMBO J.* **15**, 1403-1411.
- Manhart, J.R.** (1995) Chloroplast 16S rDNA sequences and phylogenetic relationship of fern allies and ferns. *Am. Fern J.* **85**, 182-192.
- Mariani, P., De Carli, M., Rascio, N., Baldan, B., Casadoro, G., Gennari, G., Bodner, M. und Larcher, W.** (1990) Synthesis of chlorophyll and photosynthetic competence in etiolated and greening seedlings of *Larix decidua* as compared with *Picea abies*. *J. Plant Physiol.* **137**, 5-14.
- Martin, W., Lydiate, D., Brinkmann, H., Forkmann, G., Saedler, H. und Cerff, R.** (1993) Molecular phylogenies in angiosperm evolution. *Mol Biol Evol.* **10**, 140-162.
- Mathews, S. und Donoghue, M.J.** (1999) The root of angiosperm phylogeny inferred from duplicate phytochrome genes. *Science* **286**, 947-950.
- Mathews, S. und Sharrock, R.A.** (1996) The phytochrome gene family in grasses (Poaceae): A phylogeny and evidence that grasses have a subset of the loci found in dicot angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 1141-1150.
- Mathews, S. und Sharrock, R.A.** (1997) Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ.* **20**, 666-671.

- Mathews, S., Lavin, M. und Sharrock, R.A.** (1995) Evolution of the phytochrome gene family and its utility for phylogenetic analysis of angiosperms. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **82**, 296-321.
- Mathews, S., Tsai, R.C. und Kellogg, E.A.** (2000) Phylogenetic structure in the grass family (Poaceae): Evidence from the nuclear gene phytochrome B. *Am. J. Bot.* **87**, 96-107.
- Maucher, P.H.** (1994) Molekularbiologie der Phytochrome des Farns *Anemia phyllitidis* (L.) SW. Dissertation Universität Ulm.
- McMichael Jr., R.W. und Lagarias, J.C.** (1990) Phosphopeptide mapping of *Avena* phytochrome phosphorylated by protein kinases in vitro. *Biochemistry* **29**, 3872-3878.
- Mohr, H.** (1972) Lectures on photomorphogenesis. Springer-Verlag Berlin.
- Mukai, Y., Tazaki, K., Fujii, T. und Yamamoto, N.** (1992) Light-independent expression of three photosynthetic genes, *cab*, *rbcS*, and *rbcL* in coniferous plants. *Plant Cell Physiol.* **33**, 859-866.
- Nagy, F. und Schäfer, E.** (2000) Nuclear and cytosolic events of light-induced, phytochrome-regulated signaling in higher plants. *EMBO J.* **19**, 157-163.
- Nairn, C.J. und Ferl, R. J.** (1988) The complete nucleotide sequence of the small-subunit ribosomal RNA coding for the cycad *Zamia pumila*: phylogenetic implications. *J. Mol. Evol.* **27**, 133-141.
- Neuhaus, G., Bowler, C., Kern, R. und Chua, N.-H.** (1993) Calcium/Calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* **73**, 937-952.
- Neuhoff, V., Philipp, K., Zimmer, H.-G. und Mesecke, S.** (1979) A simple versatile, sensitive and volumeindependent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **360**, 1657-1670.
- Ni, M., Tepperman, J.M. und Quail, P.H.** (1998) PIF3, a phytochrome interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**, 657-667.
- Ni, M., Tepperman, J.M. und Quail, P.H.** (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* **400**, 781-784.
- Nixon, K.C., Crepet, W.L., Stevenson, D. und Friis, E.M.** (1994) A reevaluation of phylogenetic relationships of seed plants. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **81**, 484-533.
- Nozue, K., Kanegae, T., Imaizumi, T., Fukuda, S., Okamoto, H., Yeh, K.-C., Lagarias, J.C. und Wada, M.** (1998) A phytochrome from the fern *Adiantum* with features of the putative photoreceptor NPH1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15826-15830.
- Okamoto, H., Hirano, Y., Abe, H., Tomizawa, K., Furuya, M. und Wada, M.** (1993) The deduced amino acid sequence of phytochrome from *Adiantum* includes consensus motifs present in phytochrome B from seed plants. *Plant Cell Physiol.* **34**, 1329-1334.

- Olmstead, R.G., Reeves, P.A. und Yen, A.C.** (1998) Patterns of sequence evolution and implications for parsimony analysis of chloroplast DNA. In: Soltis, D.E., Soltis, P.S. und Doyle, J.J. (Hrsg.): *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*, Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, USA, 164-187
- Page, C.N.** (1990) Coniferophytina. In: K.U. und Green P.S. (Hrsg.), *The families and genera of vascular plants*, Vol. 1, Pteridophytes and Gymnosperms. Springer Verlag Berlin, 282-361.
- Parenti, L.R.** (1980) A phylogenetic analysis of the land plants. *Biol. J. of the Linnean Soc.* **13**, 225-242.
- Peer, W., Silverthorne, J. und Peters, J.L.** (1996) Developmental and light-regulated expression of individual members of the light-harvesting complex *b* gene family in *Pinus palustris*. *Plant Physiol.* **111**, 627-634.
- Pilger, R.** (1926) Coniferae. In: Engler, A. und Prantl, K. (Hrsg.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. 2. Auflage, Vol. 13., W. Engelmann Verlag, Leipzig, 121-407.
- Ponting, C.P. und Aravind, L.** (1997) PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr. Biol.* **7**, 674-677.
- Pratt, L.H.** (1994) Distribution and localization of phytochrome within the plant. In: Kenrick, R.E und Kronenberg, G.M.H. (Hrsg.): *Photomorphogenesis in plants*. 2. Aufl. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande: 163-185.
- Pratt, L.H.** (1995) Phytochrome: differential properties, expression patterns and molecular evolution. *Photochem. Photobiol.* **61**, 10-21.
- Pratt, L.H. und Coleman, R.A.** (1974) Phytochrome distribution in etiolated grass seedlings as assayed by an indirect antibody-labelling method. *Am. J. Bot.* **61**, 195-202.
- Pratt, L.H., Stewart, S.J., Shimazaki, Y., Wang, Y.-C. und Cordonnier, M.-M.** (1991) Monoclonal antibodies directed to phytochrome from green leaves of *Avena sativa* L. cross-react weakly or not at all with the phytochrome that is most abundant in etiolated shoots of the same species. *Planta* **184**, 87-95.
- Qiu, Y.-L., Chase, M.W., Les, D.H. und Parks, C.R.** (1993) Molecular phylogenetics of the magnoliidae: cladistic analyses of nucleotide sequences of the plastid gene *rbcL*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **80**, 587-606.
- Qiu, Y.-L., Cho, Y., Cox, J.C. und Palmer, J.D.** (1998) The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. *Nature* **394**, 671-674.
- Qiu, Y.-L., Lee, J., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zanis, M., Zimmer, E.A., Chen, Z., Savolainen, V. und Chase, M.W.** (1999) The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* **402**: 404-407.
- Quail, P.H., Schäfer, E. und Marmé, D.** (1973) Turnover of phytochrome in pumpkin cotyledons. *Plant Physiol.* **58**: 128-131.

- Quail, P.H.** (1994) Phytochrome genes and their expression. In: Kenrick, R.E. und Kronenberg, G.H.M. (Hrsg.), *Photomorphogenesis in plants*, 2. Aufl., Kluwer Academic, Dordrecht, 71-104.
- Quail, P.H.** (1997) An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant Cell Environ.* **20**, 657-665.
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.M., Xu, Y. und Wagner, D.** (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**, 675-680.
- Quail, P.H., Hershey, H.P., Idler, K.B., Sharrock, R.A., Christensen, A.H., Parks, B.M., Somers, D., Teppermann, J., Bruce, W.B. und Dehesh, K.** (1992) *Phy*-gene structure, evolution, and expression. In: Thomas, B. und Johnson, C.B. (Hrsg.), *Phytochrome properties and biological action*, Springer-Verlag Berlin: 13-38.
- Rathgeber, J. und Capesius, I.** (1990) Nucleotide sequence of the intergenic spacer and the 18S rRNA gene from mustard (*Sinapis alba*). *Nucleic Acids Res.* **18**, 1288.
- Raubeson, L.A. und Jansen, R.K.** (1992) A rare chloroplast-DNA structural mutation is shared by all conifers. *Biochem. Syst. Ecol.* **20**, 17-24.
- Rogers, S., Wells, R. und Rechsteiner, M.** (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Rüdiger, W. und Correl, D.L.** (1969) Über die Struktur des Phytochrom-Chromophors und seine Proteinbindung. *Liebigs Ann. Chem.* **723**, 208-212.
- Rüdiger, W. und Thümmler, F.** (1991) Phytochrome, the visual pigment of plants. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 1216-1228.
- Saitou, N. und Nei, M.** (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Sakamoto, K. und Nagatani, A.** (1996) Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J.* **10**, 859-868.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samigullin, T.K., Martin, W.F., Troitsky, A.V. und Antonov, A.S.** (1999) Molecular data from the chloroplast *rpoC1* gene suggest a deep and distinct dichotomy of contemporary spermatophytes into two monophyla: gymnosperms (including gnetales) and angiosperms. *J. Mol. Evol.* **49**, 310-315.
- Sanderson, M.J.** (1998) Estimating rate and time in molecular phylogenies: Beyond the molecular clock? In: Soltis, D.E., Soltis, P. und Doyle, J. (Hrsg.) *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. Kluwer Academic Publishers, Niederlande: 242-264.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977) DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sarich, V.M. und Wilson, A.C.** (1973) Generation time and genomic evolution in primates. *Science* **179**, 1144-1147.

- Savard, L., Li, P., Strauss, S.H., Chase, M.W., Michaud, M. und Bousquet, J.** (1994) Chloroplast and nuclear gene sequences indicate late pennsylvanian time for the last common ancestor of extant seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5163-5167.
- Schneider, H.** (1996) The root anatomy of ferns: a comparative studie. In: Camus, J.M., Gibby, M. und Johns, R.J. (Hrsg.) *Pteridology in Perspective*, Royal Botanic Gardens Kew, USA, 271-283.
- Schneider-Poetsch, H.A.W. und Braun, B.** (1991) Proposal on the nature of phytochrome action based on the C-terminal sequences of phytochrome. *J. Plant Physiol.* **137**, 576-580.
- Schneider-Poetsch, H.A.W.** (1992) Signal transduction by phytochrome: Phytochromes have a module related to the transmitter modules of bacterials sensor proteins. *Photochem. Photobiol.* **56**, 839-846.
- Schneider-Poetsch, H.A.W., Kolukisaoglu, Ü., Clapham, D.H., Hughes, J. und Lamparter, T.** (1998) Non-angiosperm phytochromes and the evolution of vascular plants. *Physiol. Plant.* **102**, 612-622.
- Schneider-Poetsch, H.A.W., Marx, S., Kolukisaoglu, H.Ü., Hanelt, S., und Braun, B.** (1994) Phytochrome evolution: Phytochrome genes in ferns and mosses. *Physiol. Plant.* **91**, 241-250.
- Schneider-Poetsch, H.A.W., Schwarz, H., Grimm, R. und Rüdiger, W.** (1988) Cross-reactivity of monoclonal antibodies against phytochrome from *Zea* and *Avena*. *Planta* **173**, 61-72.
- Schröder, J., Kreuzaler, F., Schäfer, E. und Hahlbrock, K.** (1979) Concomitant induction of phenylalanine ammonia-lyase and flavanone synthase mRNA's in irradiated plant cells. *J. Biol. Chem.* **254**, 57-65.
- Shanklin, J., Jabben, M. und Vierstra, R.D.** (1987) Red light-induced formation of ubiquitin-phytochrome conjugates: identification of possible intermediates of phytochrome degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 359-363.
- Sharma, R. und Schopfer, P.** (1987) Phytochrome-mediated regulation of beta-Amylase mRNA level in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. *Planta* **171**, 313-320.
- Sharrock, R.A. und Quail, P.H.** (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Develop.* **3**, 1745-1757-
- Shropshire jr., W. und Mohr H.** (1983) Photomorphogenesis. *Encyclopedia of plant physiology* **16A** und **B**, Springer Verlag, Berlin.
- Simpson, J. und Herrera-Estrella L.** (1990) Light regulated gene expression. *Plant Sci.* **9**, 95-109.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A.** (1999) Strasburger: Lehrbuch der Botanik. Spektrum Akademischer Verlag mbH, Heidelberg.
- Smith, H.** (1995) Physiological and ecological functions within the phytochrome family. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 289-315.

- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Nickrent, D.L., Johnson, L.A., Hahn, W.J., Hoot, S.B., Sweere, J.A., Kuzoff, R.K., Kron, K.A., Chase, M.W., Swensen, E.A., Zimmer, E.A., Chaw, S.-M., Gillespie, L.J., Kress, W.J. und Sytsma K.J.** (1997) Angiosperm phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **84**, 1-49.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E. und Chase, M.W.** (1999) Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. *Nature* **402**, 402-403.
- Song, P.-S.** (1999) Inter-domain signal transmission within the phytochromes. *J. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 215-225.
- Southern, E.M.** (1974) An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal. Biochem.* **62**, 317-318.
- Stefanovic, S., Jager, M., Deutsch, J., Broutin, J. und Masselot, M.** (1998) Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. *Am. J. Bot.* **85**, 688-697.
- Stewart, W.N. und Rothwell, G.W.** (1993) Paleobotany and the evolution of plants. 2. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge.
- Stockhaus, J., Nagatani, A., Halfter, U., Kay, S., Furuya, M. und Chua, N.-H.** (1992) Serine to alanine substitutions at the amino-terminal region of phytochrome A result in an increase in biological activity. *Genes Develop.* **6**, 2364-2372.
- Sun, G., Dilcher, D.L., Zheng, S., und Zhou, Z.** (1998) In search of the first flower: A jurrasic angiosperm, *Archaeofructus*, from northeast china. *Science* **282**, 1692-1695.
- Swofford, D. L.** (1999) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tahir, M., Kanegae, H. und Takano, M.** (1998) Phytochrome C (PHYC) gene in rice: Isolation and characterization of a complete coding sequence (Accession No. AB018442). *Plant Physiol.* **118**, 1535-1538.
- Takaiwa, F., Oono, K. und Sugiura, M.** (1984) The complete nucleotide sequence of a rice 17S rRNA gene. *Nucleic Acids Res.* **12**, 5441-5448.
- The Angiosperm Phylogeny Group** (1998) An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **85**, 531-553.
- Thümmler, F. und Dittrich, P.** (1995) Phytochrome represents a small gene family in *Picea abies*: six partial sequences (Accession Nos. U38368 to U38368) encoding at least three different phytochrome isotypes. *Plant Physiol.* **109**, 1498.
- Thümmler, F., Dufner, M., Kreisl, P. und Dittrich, P.** (1992) Molecular cloning of a novel phytochrome gene of the moss *Ceratodon purpureus* which encodes a putative light-regulated protein kinase. *Plant Mol. Biol.* **20**, 1003-1007.
- Tobin, E.M. und Silverthorne, J.** (1985) Light regulation of gene expression in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 569-593.

- Vierstra, R.D.** (1993) Illuminating phytochrome function. There is light at the end of the tunnel. *Plant Physiol.* **103**, 679-684.
- Vierstra, R.D. und Quail, P.H.** (1983) Purification and initial characterization of 124-kilodalton phytochrome from *Avena*. *Biochemistry* **22**, 2498-2505.
- Wada, M., Kanegae, T., Nozue, K. und Fukuda, S.** (1997) Cryptogam phytochromes. *Plant Cell Environ.* **20**, 164-170.
- Wagner, D., Koloszvari, M. und Quail, P.H.** (1996) Two small spatially distinct regions of phytochrome B are required for efficient signaling rates. *Plant Cell* **8**, 859-871.
- Wagner, D., Tepperman, J.M. und Quail, P.H.** (1991) Overexpression of phytochrome B induces a short hypocotyl phenotype in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell* **3**, 1275-1288.
- Weber, K. und Osborn, M.** (1969) The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4409.
- Wellmann, E.** (1983) UV irradiation in photomorphogenesis. In: Mohr, H. und Shropshire W. (Hrsg.) Encyclopedia of plant physiology. Springer Verlag, Berlin, 745-756.
- Wellmer, F., Kircher, S., Rugner, A., Frohnmeyer, H., Schäfer, E. und Harter K.** (1999) Phosphorylation of the parsley bZIP transcription factor is regulated by light. *J. Biol. Chem.* **274**, 29476-29482.
- Westhoff, P.** (1996) Molekulare Entwicklungsbiologie - Vom Gen zur Pflanze. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Whitelam, G.C. und Halliday, K.J.** (1999) Photomorphogenesis: Phytochrome takes a partner. *Curr. Biol.* **9**, R225-R227.
- Wilson, M.A., Gaut, B. und Clegg, M.T.** (1990) Chloroplast DNA evolves slowly in the palm family (Arecaceae). *Mol. Biol. Evol.* **7**, 303-314.
- Winands, A. und Wagner, G.** (1996) Phytochrome of the green alga *Mougeotia*: cDNA sequence, autoregulation and phylogenetic position. *Plant Mol. Biol.* **32**, 589-597.
- Winter, K.-U., Becker, A., Münster, T., Kim, J.T., Saedler, H. und Theissen G.** (1999) MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7342-7347.
- Wisconsin Package** Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin.
- Wolf, P.G.** (1997) Evaluation of *atpB* nucleotide sequences for phylogenetic studies of ferns and other pteridophytes. *Am. J. Bot.* **84**, 1429-1440.
- Wu, C.-I. und Li, W.-H.** (1985) Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1741-1745.
- Wu, S.-H. und Lagarias, J.C.** (1997) The phytochrome photoreceptor in the green alga *Mesotaenium caldariorum*: implication for a conserved mechanism of phytochrome action. *Plant Cell Environ.* **20**, 691-699.

- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S.A. und Nagatani, A.** (1999) Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J. Cell. Biol.* **145**, 437-445.
- Yamamoto, N., Mukai, Y., Matsuoka, M., Kano-Murakami, Y., Tanaka, Y., Ohashi, Y., Ozeki, Y. und Odani, K.** (1991) Light-independent expression of *cab* and *rbcS* genes in dark-grown pine seedlings. *Plant Physiol.* **95**, 379-383.
- Yeh, K.C. und Lagarias, J.C.** (1998) Eukaryotic phytochromes: light regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13976-13981.
- Yeh, K.C., Wu, S.H., Murphy, J.T. und Lagarias, J.C.** (1997) A cyanobacterial phytochrome two component light sensory system. *Science* **277**, 1505-1508.
- Zuckerkindl, E. und Pauling, L.** (1965) Evolutionary divergence and convergence. In: Bryson, V. und Vogel, H.J. (Hrsg.) *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York, 97-166.

7 Anhang

7.1 Genbank-Eintrag des partialen Phytochromgens *phyN* aus *Pinus sylvestris*

AJ271627

Pinus sylvestris partial mRNA for phytochrome N (*phyN*)

phyN gene; phytochrome N.

Pinus sylvestris (Scotch pine)
 Eukaryota; Viridiplantae; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta;
 Coniferopsida; Coniferales; Pinaceae; Pinus.

[1]
 1-3023
 Schmidt M.;

Submitted (02-FEB-2000) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
 Schmidt M., University of Cologne, Botanical Institute II,
 Gyrhofstr. 15, D-50931 Cologne, GERMANY.

[2]
 Schmidt M., Schneider-Poetsch H.A.;
 "The phylogeny of gymnosperms seen by phytochrome genes";
 Unpublished.
 Unknown 0:0-0(0).

Key	Location/Qualifiers
source	1..3023 /organism="Pinus sylvestris"
CDS	<1..2631 /codon_start=1 /gene="phyN" /product="phytochrome N" /function="plant photoreceptor"

/translation=
 DDHGEVISEMRRYDLEPYLGLHYPATDIPQASRFLFMRNRVRMICDCYAQPVAVIQDERLPRDLSFCGSTLRAPH
 GCHAQYMANMGSIASLVMVAVINEKELDGDSEGQMQKGRRLWGLVVCHHTSPRYVPFPLRYACEFLMQVFGIQL
 NKEVELAAQIREKQILRTQTLLCDMLLRDTPLGIVTQKPNIMDLVRCDDGAALYYERNFWLLGVTPTTEAQIQDIVA
 WLSEHHMDSTGLSTDSLVAAGYPGAESLGNVCGIAAVRINSKDFLWFRSHTAKEIKWGGAKHDLQERDDGKKM
 HPRSSFNAFLVVKMRSLSWEDVEMDAIHSLQLILRGRKETDGSGRNISINRQLNDLKLQEMDELNAVTNEMVR
 LIETATAPILAVDAYGVVNGWNRKAAELTGLSVEEVLGEPINLVEETSAENVKRMHLHLALQGVEEQNVQIELKR
 HGSEEDKGPVLLVNACSSRDLENVVGVCFVAQDVTGQKIVMDKFTRIQQDYRAIVQNPSPLIPPIFGTDECGC
 VPENSAMEKLSGWKREEIIDKMLLGEVFGTRTACCRLKGQNALTQLRRIILNSSMTGQETEKFPFGFFDRHGKYVE
 TLLSANKKLDEEGKITGVFCFLHIASPELQALYVQHMLEQAAMKRLQALTYLRLEIKNPLYGIMFTQKMMERTD
 FLREDQRQLVETSALCQKQILKILDDMDLESIEDRYLDLDTVEFTLGALLDAVISQGMIOSEEKLEIGYDLPRE
 ITTTGLYGDQSRLLQILANFLVTVIQFTPAEKWVR IKVSPTKRHLGGGVYVIGIEFRITHPGPGLPEKLVQQMFN
 FDPDMSQEGFGLLICRKLVRMLMNGDVQYLRGGGTSSFVIIVVELATSQNEEC

Sequence 3023 BP; 907 A; 537 C; 757 G; 822 T; 0 other;

gacgatcatg	gtgaggatgat	atccgagatg	agaagatacg	attdagaacc	ttatttgggt	60
cttactacc	ctgcaactga	tatccctcag	gcttcaagat	ttttgtttat	gaggaacaga	120
gtaagaatga	tttgtgattg	ctatgcacag	cctgtagcgg	tgattcagga	cgagagattg	180
cctagagacc	taagtttctg	tggatctaca	ttgagagcac	ctcatggttg	tcatgctcaa	240
tacatggcca	acatgggttc	tatagcatct	ctagtaatgg	ctgtagtaat	caatgagaag	300
gaattggacg	gagatagcga	ggggcagatg	cagcagaag	gaagaaggct	ttggggactg	360
gtggtttgtc	atcacactag	tccacgctat	gttccatttc	ctttgaggta	tgctctggag	420
ttcttaatgc	aagtttttgg	aattcagcta	aacaaggaag	ttgaattggc	tgctcagata	480
agagagaagc	aaattctgcg	cactcaaaaca	ttgctctgcg	acatgctact	tccgcacaca	540
cccttgggaa	ttgtcactca	gaagcccaac	atcatggatc	ttgtcagatg	cgatggtgct	600
gccctttact	atgaaagaaa	cttttggctt	cttggggtaa	ctcctactga	ggctcagatc	660
caagatattg	ttgcatggct	gtctgagcac	cacatggatt	ccacaggttt	gagcacagat	720
agtcttgttt	atgcaggcta	tcctggagct	gaatcattag	gtaatgcagt	ttgtggaatt	780
gccgcgggtga	gaattaattc	aaaagacttt	ttgttttgg	tcagatccca	tacagcaaaa	840
gaaatcaaat	ggggagggtgc	caagcatgac	ctgcaggaaa	gagatgatgg	taagaaaatg	900
catccacgat	cttcttttaa	tgcattcctt	gaagtggtaa	agatgaggag	tttgtcttgg	960
gaggatgttg	agatggatgc	catccattca	ttgcagttaa	tactgcgggg	ttcccgcaaa	1020
gaaactgatg	gaagtggcag	aaatatctcg	ataaataggc	aactcaatga	tttgaactt	1080
caggagatgg	atgaattgaa	tgcatgaca	aatgagatgg	tgagactgat	tgaaacagca	1140
acggctccaa	tcttggcagt	tgatgcttat	ggagtagtaa	atggatggaa	cagaaaagct	1200
gctgaactta	cggggttgtc	agtggaaag	gttctggggg	agcctctaat	caatttggtc	1260
gaggaaacct	cagctgagaa	cgtgaaaagg	atgctgcatt	tggcttttga	aggagtggaa	1320
gaacaaaatg	ttcaaatgaa	gctgaaaaga	catggctcag	aggaggacaa	aggtccagta	1380
gttttactag	ttaatgcttg	ctcagcagc	gacctgaagg	agaatgttgt	gggagtgtgc	1440
tttgttgccc	aagatgtgac	cgggcagaag	atcgttatgg	ataagttcac	tccgattcaa	1500
ggtgactaca	gggcaatagt	tcagaatcca	agtcccttga	ttcctcccat	attdgaaaca	1560
gatgaatgtg	gatgtgttcc	ggagaattca	gctatggaaa	agttgtctgg	gtggaaaaga	1620
gaagagataa	ttgataaaat	gctattggga	gaggtttttg	gtaccgcac	agcatgctgt	1680
cgtcttaaag	gccagaatgc	cttgacacag	ctcagaatta	tactaaatag	ctccatgact	1740
ggccaagaga	cagagaagtt	tccttttgga	ttctttgacc	gtcatggtaa	atatgtagag	1800
accttacttt	ctgcaaaaca	gaaattagat	gaagagggaa	aaatcacagg	agttttctgc	1860
tttttgaca	ttgctagccc	agagcttcaa	caagcattgt	atgtgcagca	catgttagaa	1920
caagctgcta	tgaagagact	tcaggcatta	acataccttc	ggctggaaat	taaaaatcca	1980
ctttatggaa	tcatgtttac	gcaaaaaatg	atggaacgca	cagatttttt	gagggaggac	2040
cagagacaac	tagtggaaac	cagcgcactt	tgcaaaaaac	agatcttaa	aattctggat	2100
gatatggacc	tagaaagcat	cgaagatcgt	tatcttgact	tggtacgggt	ggaatttacc	2160
ttgggagcat	tgcttgatgc	tgtcataagt	cagggaatga	tacagagtga	agaaaaagga	2220
ttggagatag	gttatgactt	gccaagagaa	ataacaacaa	caggcctcta	tggggatcag	2280
tcgaggcttc	agcaaatttt	ggctaatttc	ctagtaactg	tgatacagtt	cacaccagca	2340
gaaaaatggg	ttcgaataaa	agtcagtcca	actaaaaggc	attdgggtgg	cggtgtatat	2400
gtcataggta	tagaattcag	aattactcat	ccaggcccgg	ggttgccaga	aaaactggta	2460
caacagatgt	tcaatctcga	cccggatatg	tctcaagagg	gttttggatt	gctcatttgc	2520
cgaaagcttg	taagacttat	gaatggagat	gtacagtatc	ttcgaggagg	aggaacatca	2580
tcctttgtaa	ttgtttgga	gctcgtacc	agtcaaaatg	aggaatgcta	gaacatttcc	2640
attcaataca	aagagatata	ctgttccaat	ttggcatctt	gaattgaaat	aggcattctg	2700
tttttcattc	aacttgagaa	attgaaagg	caaacgaaa	cccttctggg	ctgtttgagt	2760
tgaaacagcc	tacaacagga	gtttactact	ctgcccgat	attdactggg	aatgttgtaa	2820
acaccttgtg	tatgtttcaa	ggttcctaca	tgtgagaatc	taaatctaac	agaggaacgg	2880
cgcctgatgc	gcatacctg	ctttttaa	aaacagtgtc	tttgctagaa	caggtatgga	2940
actatttctg	ttgccaagt	cactgtttgt	gcacattttg	agaaataaac	aggacactgt	3000
ataagcttca	gctgcccggc	gcg				3023

7.2 Genbank-Einträge der Phytochromgenfragmente

Die Genbank-Einträge für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten Sequenzen:

<i>Anthoceros punctatum</i>	<i>phy1</i>	AJ286673
<i>Agathis dammara</i>	<i>phyN2</i>	AJ286620
.	<i>phyO</i>	AJ286619
	<i>phyP</i>	AJ286621
<i>Angiopteris evecta</i>	<i>phy2A</i>	AJ286674
	<i>phy2B</i>	AJ286675
<i>Araucaria araucana</i>	<i>phyN2</i>	AJ286617
	<i>phyO</i>	AJ286616
	<i>phyP</i>	AJ286618
<i>Azolla filiculoides</i>	<i>phy2A</i>	AJ286689
	<i>phy2B</i>	AJ286688
<i>Blechnum spicant</i>	<i>phy1</i>	AJ286670
	<i>phy2</i>	AJ286669
<i>Botrychium lunaria</i>	<i>phy2B</i>	AJ286671
	<i>phy2B/PG</i>	AJ286672
<i>Cephalotaxus fortunei</i>	<i>phyN1</i>	AJ286629
	<i>phyN2</i>	AJ286630
<i>Chameacyparis lawsoniana</i>	<i>phyO</i>	AJ286632
	<i>phyP</i>	AJ286631
<i>Conocephalum supradecompositum</i>	<i>phy1</i>	Y08159
<i>Cryptomeria japonica</i>	<i>phyN1</i>	AJ286624
	<i>phyO</i>	AJ286622
	<i>phyP</i>	AJ286625
<i>Cupressus sempervirens</i>	<i>phyN1</i>	AJ286626
	<i>phyO</i>	AJ286627
	<i>phyP</i>	AJ286625
<i>Cycas revoluta</i>	<i>phyO</i>	Y07571
	<i>phyP</i>	AJ286628
<i>Dacrydium cupressinum</i>	<i>phyN2</i>	AJ286668
<i>Dacrydium franklinii</i>	<i>phyN2</i>	AJ286634
	<i>phyO</i>	AJ286635
	<i>phyP</i>	AJ286633
<i>Dicksonia antarctica</i>	<i>phy2</i>	AJ286676
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>phyN1</i>	AJ286637
	<i>phyO</i>	AJ286638
<i>Gnetum gnemon</i>	<i>phyN</i>	AJ286636
<i>Huperzia selago</i>	<i>phy1</i>	AJ286677
	<i>phy2</i>	AJ286678
<i>Isoetes velata</i>	<i>phy1</i>	Y13792
<i>Juniperus phoenicea</i>	<i>phyP</i>	AJ286639
<i>Larix decidua</i>	<i>phyN1</i>	AJ286641
	<i>phyO</i>	AJ286640
<i>Marattia laevis</i>	<i>phy1</i>	AJ286679
	<i>phy2</i>	AJ286680
<i>Macrozamia communis</i>	<i>phyN1</i>	AJ286642
	<i>phyO</i>	AJ286644
	<i>phyP</i>	AJ286643

<i>Osmunda regalis</i>	<i>phy1A</i>	AJ286681
	<i>phy1B</i>	AJ286682
	<i>phy2</i>	AJ286683
<i>Phyllocladus trichomanoides</i>	<i>phyN1</i>	AJ286650
<i>Pilularia globulifera</i>	<i>phy2</i>	AJ286687
<i>Pinus sylvestris</i>	<i>phyN1/PG</i>	AJ286646
	<i>phyN1</i>	AJ286647
	<i>phyN1/Allel</i>	AJ286648
	<i>phyO</i>	AJ286645
	<i>phyP/Allel</i>	AJ286649
<i>Platycerium angolense</i>	<i>phy2</i>	Y13797
<i>Podocarpus neriifolius</i>	<i>phyN1</i>	AJ286652
<i>Polypodium vulgare</i>	<i>phy1</i>	AJ286686
	<i>phy2A</i>	AJ286685
	<i>phy2B</i>	AJ286684
<i>Pseutotsuga menziesii</i>	<i>phyP</i>	AJ286651
<i>Salvinia natans</i>	<i>phy2A</i>	Y13800
	<i>phy2B</i>	Y13801
<i>Saxegothaea conspicua</i>	<i>phyN1</i>	AJ286654
	<i>phyN2</i>	AJ286655
<i>Sciadopitys verticillata</i>	<i>phyN1</i>	AJ286657
	<i>phyP</i>	AJ286656
<i>Sequoiadendron giganteum</i>	<i>phyN1</i>	AJ286653
<i>Stangeria eriopus</i>	<i>phyP</i>	AJ286658
<i>Taxodium distichum</i>	<i>phyN1</i>	AJ286659
	<i>phyP</i>	AJ286660
<i>Taxus baccata</i>	<i>phyP</i>	Y13796
<i>Thuja plicata</i>	<i>phyN1</i>	AJ286662
	<i>phyN2</i>	AJ286663
	<i>phyO</i>	AJ286661
<i>Tmesipteris tannensis</i>	<i>phy1</i>	Y13798
	<i>phy1/PG</i>	Y13799
<i>Torreya nucifera</i>	<i>phyN1</i>	AJ286664
	<i>phyN2</i>	AJ286665
	<i>phyP</i>	AJ286666
<i>Vittaria lineata</i>	<i>phy2B</i>	Y13802
<i>Welwitschia mirabilis</i>	<i>phyN</i>	AJ286667
	<i>phyP</i>	Y13794

7.3 Funktionsspezifische Motive in *phyN*, *phyO* und *phyP*: Vergleiche mit *phyA*, *phyB* und *phyC* von Angiospermen

A: Zweigeteilte Nukleuslokalisations-Domänen (Kircher et al. 1999a)

Vergleich der Sequenzbereiche von Gymno- und Angiospermae

	844	877
AVENA A	RSGKYI-ECLLSAN R KENEGG	QASEQTS LKRLK
ORYZA A	RNGKYI-ECLLSVN R KVNADG	QASQQNAL TKLK
SOLANUM A	RYGKYV-ECLLCV S KRLDKEG	RLSEQTAL KRLK
ARABIDOPSIS A	RGGKYV-ECLLCV S KKLDKRG	RLAERTAV KRLK
ORYZA C	TDGKYI-ESLMTAT K RTDAG	KMSEQAAMNS FK
ARABIDOPSIS C	RDGSFI-EALLSANK R TDIEG	QISEHAIACAL N
PINUS N	RHGKYV-ETLLSANK K LDEEG	HMLEQAAM KRLQ
PICEA O	RHGKNT-EALLSANK R TDAG	RMAEQAA M DRLK
SORGHUM B	KNGKYV-QALLTAN T RSKMDG	RQ Q E K KCYAR M K
ORYZA B	KNGKYV-QALLTAN T RSRMDG	RH H E K KCYAR M K
SOLANUM B	RNGKYV-QALL T R N KRVNMEG	RQ Q E K KCY S Q M K
ARABIDOPSIS B	RNGKFV-QALLTAN K RVSLEG	RRQDTECF T K A K
PINUS P	KQ G KYV-EALLTAN K RTDADG	RQ Q E K KCFAR L K
	<u>Sequenz 1</u>	<u>Sequenz 2</u>
	1091	1127
AVENA A	RNLLR L LMN-GDVR H L-REAGVSTFIITAE-LASAPTAMQ-----	
ORYZA A	RNLLR L LMN-GDVR H M-REAGMSTFILSVE-LASAPAK-----	
SOLANUM A	RKLV K LMN-GEVQYL-REAGRSTFIISVE-LAVATKS-S-----	
ARABIDO A	RKLV K LMN-GDVQYL-RQAGKSSFIITAE-LAAANK-----	
ORYZA C	QKLV K TMS-GTVQYL-REAESSSFIVLVE-FPVAQLST K RCKASTSKF	
ARABIDOPSIS C	QKLV K L M ERG T L R YL-RESEMSAFVILTE-FPLI-----	
PINUS N	RKLV R LMN-GDVQYL-RGGGTSSFVIVVE-LATSQNEEC-----	
PICEA O	QQLV K IMN-GDVQYL-REAGRSSFIIINVE-FPLAQTDKQ-----	
SORGHUM B	RKIL K LM-GGEVQYI-RESERSFFLIVLE-LPQPRPAADREIS-----	
ORYZA B	RKIL K LM-GGEVQYI-RESERSFFHIVLE-LPQPQQA-SRGTS----	
SOLANUM B	RKML K LMN-GEIQYI-RESERCYFLIILD-LPM T R K GP K SVG-----	
ARABIDOPSIS B	RKIL K LMN-GEVQYI-RESERSYFLIILE-LPV P R K R P LSTASGSGDM	
PINUS P	RKLL K LMN-GDVR Y I-RESGICYFLVNVE-FPMAQ R EDAAS I K-----	
	<u>Sequenz 3</u>	<u>Sequenz 4</u>

B: PEST-Motiv (Rogers *et al.* 1986):

Pest-Motiv in Phytochromsequenzen von Gymno- und Angiospermen. Fettgedruckt: für dieses Motiv charakteristische AS (Glutamat (E) und Aspartat (D)):

	374	418
AVENA A	HLQYME N MNSIASLVMAVVVN ENEEDDEAESE QPAQQQKKKKLW	
ORYZA A	HLQYME N MNSIASLVMAVVVN ENEEDDDEVGAD QPAQQQKRKKLW	
SOLANUM A	HLQYME N MNSIASLVMAVVVND DEEGESSDSS --QSQKRKRLW	
ARABIDOPSIS A	HLQYMANM D SIASLVMAVVVN EEDGEGDAPDA -TTQPQKRKRLW	
ORYZA C	HAQYMASMGSVASLVMSVTIN EDEDDDGDTGSD --QQPKGRKRLW	
ARABIDOPSIS C	HAQYMSNMGSVASLVMSVTINGSD SDEMNRD -----LQTGRHLW	
PINUS N	HAQYMANMGSIASLVMAVVIN EKELDGDSE GQM---QQKGRRLW	
PINUS N PG	HAQYMANMGSIASLVMAVVIND KELNGAREG ---QMQQNKRKRLW	
PICEA O	HAQYMANMGSIASLVMSVTTN ENGDDSEGGG --QQQPQNRKRLW	
ORYZA B	HGQYMANMGSIASLVMAV IISSGGDDHNI ARGSI--PSAMKRLW	
SORGHUM B	HAQYMANMGSIASLVMAV IISSGGDDEQT GRGGIS---SAMKRLW	
SOLANUM B	HAQYMANMGSIASLTLAV IINGNDEE AVGGG-----RNSMRLW	
ARABIDOPSIS B	HSQYMANMGSIASLAMAV IINGNEDDGS NVASG----RSSMRLW	
PINUS P	HAQYMANMGSI R SLLMAV IINGNDEE GGGSG-----RNSMKLW	

C: Potentielle Degradationsdomäne (Clough *et al.* 1999):

	1110	1129
Avena A	REAGV STFIL TAE- LASAPTAMGQ --	
Oryza A	REAGM STFILSVE - LASAPAK -----	
Solanum A	REAGR STFIISVE - LAVATKS -S---	
Arabidopsis A	RQAGK SSFIITAE - LAAANK -----	
Pinus N	RGGGT SSFVIVVE - LATSQNEEC ---	
Oryza C	REAESS FFIVLVE -FPVAQL STKRCK	
Arabidopsis C	RESEMS AFVILTE -FPLI-----	
Picea O	REAGR SSFIINVE -FPLA QTDKQ ---	
Sorghum B	RESERS FFLIVLE -LPQPRPAADREI	
Oryza B	RESERS FFHIVLE -LPQPQQA A -SRG	
Solanum B	RESERCY FLIILD -LPMTR KGPK SVG	
Arabidopsis B	RESERS YFLIILE -LPVPR KRPL STA	
Pinus P	RESGICY FLVNVE -FPMAQREDAASI	

Danke

Herrn Prof. Dr. Hj.A.W. Schneider-Poetsch danke ich für die Arbeitsmöglichkeit am Botanischen Institut der Universität zu Köln sowie seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

Hildegard Lender möchte ich für die tatkräftige Unterstützung danken, gemeinsam mit Stefanie Ernst außerdem für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Zimmer gilt mein Dank für den Erhalt der Artenvielfalt im Garten des Botanischen Institutes der Universität zu Köln.

Dr. Andreas Weber und Dr. Karsten Fischer danke ich für viele nützliche Tipps und ihre Hilfsbereitschaft.

Ebenfalls für seine Hilfe in 'Druck' und Tat danke Siggi Werth.

Bei allen Mitarbeitern des Botanischen Institutes, insbesondere der Arbeitsgruppe Bothe, möchte ich mich für die Unterstützung und Zusammenarbeit bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Berthold.

Köln, den 18. Mai 2000

Erklärung:

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Hj.A.W. Schneider-Poetsch betreut worden.

Marion Schmidt

Lebenslauf

Name: Marion Schmidt
Geburtsdatum: 23.05.1969
Geburtsort: Berlin-Schöneberg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Adresse: Krefelder Str. 82, 50670 Köln

Schulausbildung:

1975-1979 Gemeinschaftsgrundschule Köln-Porz-Wahn
1979-1988 Maximilian-Kolbe-Gymnasium Köln-Porz-Wahn

Studium:

1989-1991 Grundstudium der Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
1991-1994 Hauptstudium der Biologie an der RWTH Aachen
1994 Diplomprüfung in den Fächern: Ökologie, Mikrobiologie, Biotechnologie und Siedlungswasserwirtschaft
1994-1995 Diplomarbeit, durchgeführt am Institut für Ökologie, Ökochemie, Ökotoxikologie der RWTH Aachen, Betreuer: Prof. Dr. I. Schuphan
Thema: „Populationsökologische Untersuchungen an Wildformen der Spezies *Beta vulgaris* L. - Risikoabschätzung der Folgen eines Inverkehrbringens transgener Zuckerrüben“
Oktober 1995 Beginn der experimentellen Arbeiten zur Dissertation am Lehrstuhl II des Botanischen Institutes der Universität zu Köln. Betreuer: Prof. Dr. Hj.A.W. Schneider-Poetsch