

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Taxonomie der Spermatophyta	1
1.2 Circadiane Rhythmen in Pflanzen	2
1.3 Der LHC-Komplex in Pflanzen	5
1.4 Zielsetzungen	7
2. Material und Methoden	8
2.1 Material	8
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	8
2.1.2 Mikroorganismen	8
2.1.3 Pflanzen	9
2.1.4 Plasmide	9
2.2 Methoden	
2.2.1 Bakterien- und Pflanzenanzucht	10
2.2.1.1 Anzucht von <i>E.coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (nach Sambrook et al. 1989)	10
2.2.1.2 Anzucht von <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Nicotiana glauca</i>	10
2.2.1.3 Anzucht von <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinus contorta</i> und <i>Picea abies</i>	11
2.2.1.4 Anzucht von <i>Ginkgo biloba</i>	11
2.2.1.5 Anzucht von <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> Moneymaker und <i>Nicotiana tabacum</i> in Sterilkultur	11
2.2.2 RNA-Isolierungsmethoden	12
2.2.2.1 RNA-Isolierung (CsCl-Methode) aus <i>Lycopersicon esculentum</i>	12
2.2.2.2 RNA-Extraktion nach der CTAB-Methode aus Gymnospermen (Chang et al. 1993)	13
2.2.2.3 RNA-Extraktion-LiCl-Methode (nach Piechulla et al. 1996)	14
2.2.2.4 RNA-Extraktion Qiagen-Kit RNeasy	14
2.2.3 DNA-Isolierungsmethoden	15
2.2.3.1 DNA-Isolierung aus <i>Pinus contorta</i>	15
2.2.3.2 DNA-Isolierung aus <i>Lycopersicon esculentum</i>	15
2.2.3.3 Isolierung von genomischer DNA als zweites Produkt bei der RNA-Isolierung	15
2.2.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	15
2.2.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit Hilfe des DNA-Plasmid-Qiagen Kits	16
2.2.4 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	16
2.2.5 Horizontale Gelelektrophorese	17
2.2.5.1 Überprüfung der Intaktheit der RNA durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese	17
2.2.5.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese	17
2.2.6 Transfer von RNA auf Nylonmembranen	18
2.2.6.1 Transfer von RNA auf Nylonmembranen durch Kapillarkraft ("Northern Blot")	18
2.2.6.2 Transfer von RNA auf Nylonmembranen durch Unterdruck ("Northern Blot" durch einen Vakuumblotter)	19
2.2.7 Hybridisierungstechniken	19
2.2.7.1 Herstellung von Lachsspermien-DNA als Blockingreagenz	19
2.2.7.2 Radioaktive Markierung der Sonde durch „Random Priming“	20
2.2.7.3 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	20

2.2.7.4	Markierung der Sonde mit Dig-dUTP durch „Random Priming“	20
2.2.7.5	Markierung der Sonde mit Dig-dUTP mittels PCR	21
2.2.7.6	Bestimmung der eingebauten Menge an Radioaktivität in die DNA-Sonde	22
2.2.7.7	Bestimmung der eingebauten Menge an DIG-dUTP in die DNA Sonde	22
2.2.7.8	Hybridisierung mit radioaktiven Sonden, die über „Random priming“ markiert worden waren	22
2.2.7.9	Hybridisierung mit radioaktiven Oligonukleotiden als Sonde	24
2.2.7.10	Hybridisierung mit Dig-dUTP-markierten Sonden	25
2.2.7.11	Immunologischer Nachweis der mRNA bzw. rRNA	25
2.2.8	Klonierungstechniken	26
2.2.8.1	Plasmid-Restriktion	26
2.2.8.2	Gelaufreinigung von DNA mit QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen)	27
2.2.8.3	Reinigung von PCR-Produkten	27
2.2.8.4	Ligation	27
2.2.8.5	PCR auf Kolonien von <i>E. coli</i> oder <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
2.2.8.6	DNA-Sequenzierung	28
2.2.9	Transformationstechniken	29
2.2.9.1	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen	29
2.2.9.2	Herstellung und Transformation chemokompenter <i>E.coli</i> -Zellen	30
2.2.9.3	Tomatentransformation mittels Agrobakterien (modifiziert nach Filatti et al. 1987)	31
2.2.9.4	Transformation von <i>Picea abies</i> durch Partikelbombardement	33
2.2.10	GUS-Proteinaktivitätsassay	35
2.2.10.1	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	35
2.2.10.2	Fluorimetrische Messungen von GUS-Protein (nach Jefferson et al. 1987)	35
2.2.11	Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)	37
2.2.12	Blattbewegungen	40
2.2.13	Gaswechsellmessungen	40
2.2.14	EM-Bilder	42
2.2.15	Untersuchungen zur RNA-Stabilität	42
2.2.15.1	Kinetische Grundlagen für die Bestimmung von Halbwertszeiten mit Hilfe von Actinomycin D	42
2.2.15.2	Untersuchungen zur Stabilität der Transkripte verschiedener Gene in <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Ginkgo biloba</i>	43
2.2.15.3	Überprüfung des Transportes von radioaktiven Substanzen in Gymnospermen	44
2.2.15.4	Überprüfung der Wirkung von Actinomycin D	44
2.2.15.5	Berechnungen zur Vorhersage der Sekundärstrukturen verschiedener <i>Lhc</i> -RNA-Spezies	45
2.2.9	Zur Auswertung der Experimente	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	Genexpression in Gymnospermen und Angiospermen	47
3.1.1	<i>Lhc</i> -Genexpression im Licht-Dunkelwechsel	47
3.1.2	<i>Lhc</i> -Genexpression im Dauerdunkel bei <i>Pinus sylvestris</i> und <i>Ginkgo biloba</i>	51
3.1.3	Expressionsmuster anderer Gene in Angiospermen und Gymnospermen	56

3.1.4 Expression von Reportergenen unter der Kontrolle verschiedener Promotoren in Angiospermen und Gymnospermen	59
3.1.5 Reaktionen der <i>Lhc</i> -Transkriptmenge auf Lichteinstrahlung in <i>Ginkgo biloba</i> und <i>Pinus sylvestris</i> nach einigen Tagen im Dauerdunkel	72
3.2 Untersuchungen zur RNA-Stabilität	77
3.2.1 Transport von radioaktiv markierten Molekülen in <i>Ginkgo biloba</i> und <i>Pinus sylvestris</i>	77
3.2.2 Wirkung von Actinomycin D in <i>Pinus sylvestris</i>	80
3.2.3 Bestimmung von Transkriptstabilitäten in verschiedenen Pflanzen	83
3.2.3.1 Halbwertszeiten der <i>Lhc</i> -Transkripte in verschiedenen Pflanzen	83
3.2.3.2 Halbwertszeiten der Transkripte anderer Gene	90
3.2.3.3 Gleichzeitige Bestimmung der Stabilitäten der <i>Pinus contorta-Lhc</i> - und der Tomaten- <i>Lhc</i> -Transkripte in transgenen Tomaten	94
3.2.3.4 Sequenzvergleichende Untersuchungen und Berechnungen zur Vorhersage der Sekundärstrukturen verschiedener <i>Lhc</i> -RNA-Spezies aus <i>Lycopersicon esculentum</i> und <i>Pinus contorta</i>	103
3.3 Physiologische Untersuchungen	107
3.3.1 Blattbewegungen	107
3.3.2 Gaswechselfmessungen und elektronenmikroskopische Aufnahmen	110
4. Diskussion	115
4.1 <i>Lhc</i> -Transkriptakkumulation und <i>Lhc</i> -Transkription in Gymnospermen	115
4.2 <i>Lhc</i> -Genexpression und <i>Lhc</i> -mRNA-Stabilität	125
4.2.1 Auswahl eines geeigneten Verfahrens und Voraussetzungen zur Bestimmung von Transkripthalbwertszeiten	125
4.2.2 <i>Lhc</i> -Genexpression und <i>Lhc</i> -mRNA-Stabilität	132
4.3 Rhythmische Phänomene in Gymnospermen	138
5. Zusammenfassung	142
Literaturverzeichnis	