

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung	1
1. Einleitung	1
2. Differentielle Expression nukleärer Gene in höheren Pflanzen	2
2.1 Transkriptionelle Regulation	2
2.2 Posttranskriptionelle Regulation	4
2.3 Translationale Regulation	7
2.4 Posttranslationale Regulation	9
3. Regulation der nukleären Genexpression in einzelligen Algen	9
4. Zusammenfassung und Ausblick	10
II. Problemstellung	12
III. Material und Methoden	14
1. Material	14
1.1 Stämme	14
1.2 Genbibliotheken	15
1.3 Plasmide	17
1.4 Oligonukleotide	16
1.5 Chemikalien	17
1.6 Enzyme	17
1.7 Häufig verwendete Puffer	18
1.8 Nährmedien	18
2. Methoden	19
2.1 Kulturbedingungen	19
2.2 Isolierung von Nukleinsäuren	19
2.3 Gelelektrophorese	21
2.4 Southern Blot und DNA/DNA Hybridisierungen	21
2.5 Northern Blot und RNA/DNA Hybridisierungen	21
2.6 Dot Blots	21
2.7 Radioaktive Markierung von DNA	22
2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.9 DNA-Sequenzierung	22
2.10 Oligonukleotid-Synthese	22

2.11 Auswertung von Nukleotid-Sequenzen	22
2.12 Transformationen	23
2.13 Nachweis der Reportergen-Expression	22
2.13.1 Qualitativer Arylsulfatase-Nachweis	23
2.13.2 Quantitativer Arylsulfatase-Nachweis	23
2.14 <i>In vitro</i> Rekombination von DNA/cDNA	23
2.14.1 Klonierung in Plasmide	23
2.14.2 Konstruktion von cDNA-Bibliotheken	24
2.15 Differentielle Hybridisierung von cDNA-Bibliotheken	24
2.15.1 Methodische Grundlagen	24
2.15.2 Synthese einzelsträngiger, radioaktiv markierter cDNA	25
2.15.3 Differentielle Hybridisierung	25
2.16 "Run-on" Transkription	25
2.16.1 Methodische Grundlagen	25
2.16.2 Markierung transkribierter RNAs	25
2.16.3 Hybridisierung	26
2.17 Sicherheitsbestimmungen	26
IV. Ergebnisse	27
A. Differentielle Genexpression in aeroben und anaerob adaptierten Kulturen	27
1. Isolierung von "anaerob spezifischen" cDNA-Klonen	27
2. Transkript-Analysen mit "anaerob spezifischen" cDNA-Klonen	29
3. Sequenz-Analysen der isolierten cDNA-Klone	30
3.1 Die cDNA 20-2 kodiert für die Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	31
3.2 Die cDNAs 3-10 und 42-3 kodieren für ribosomale Proteine	32
3.3 Die cDNAs 1-7, 33-10, 25-3 und 45-10 besitzen unbekannte offene Leserahmen	34
B. Differentielle Genexpression in genetisch verschiedenen <i>C. reinhardtii</i> Stämmen	35
1. Differentiell exprimierte cDNAs im Photosynthese-defekten Stamm CC1060	35
2. Identifizierung differentiell exprimierter Gene	36
2.1 Die cDNA 65-3 kodiert für ein Chlorophyll-a/b Bindeprotein des Lichtsammelkomplexes II	37
2.2 Die cDNA 68-3 kodiert für das PsaD-Protein des Photosystems I	38
2.3 Die cDNA 44-3 kodiert für das PsaF-Protein des Photosystems I	39

2.4	Die cDNA 4-3 kodiert für ein plastidäres 7-kDa Protein	40
2.5	Die cDNA 53-1 enthält einen unbekannten offenen Leserahmen	41
3.	Transkriptanalysen bei den Photosynthese-defekten Stämmen CC1051 und CC934	41
4.	Untersuchungen zur Expression des <i>Lhcb1</i> -Gens mit einem homologen Reportergen	43
4.1	Konstruktion eines chimären Reportergens	43
4.2	Kotransformation von <i>C. reinhardtii</i>	46
4.3	Qualitativer Nachweis der Arylsulfatase-Expression	46
4.4	Molekulare Charakterisierung der Transformanten	47
4.5	Nachweis des Arylsulfatase-Transkriptes	49
4.6	Quantitativer Nachweis der Arylsulfatase-Expression	51
4.7	Analyse der Expression der Arylsulfatase in dem Transformant TR24	52
4.7.1	Transformation des "promotorlosen" <i>Ars</i> -Gens	52
4.7.2	PCR-Analyse des chimären Gens	53
4.7.3	Arylsulfatase-Aktivität in anaerob adaptierten Kulturen	54
4.8	Expression des chimären Reportergens in Photosynthese-defekten Kreuzungsnachkommen	55
5.	Untersuchungen zur Transkription differentiell exprimierter Gene im Stamm CC1051	59
V. Diskussion		61
A. Differentielle Genexpression in aeroben und anaerob adaptierten Kulturen		61
1.	Anaerobe Kulturbedingungen beeinflussen die nukleäre Genexpression in <i>C. reinhardtii</i>	61
1.1	Das <i>Csbp</i> -Gen wird verstärkt in anaerob adaptierten <i>Chlamydomonas</i> -Kulturen exprimiert	62
1.2	Die <i>Rps18</i> - und <i>Rps27</i> -Gene zeigen eine verstärkte Transkriptakkumulation in anaerob adaptierten Kulturen	64
1.3	Die cDNAs 45-10 und 25-3 entsprechen Transkripten, die ausschließlich in anaerob adaptierten Kulturen nachweisbar sind	66
B. Differentielle Genexpression in genetisch verschiedenen <i>C. reinhardtii</i> Stämmen		67
1.	In PS I-defekten Mutanten werden verschiedene Photosynthese-Gene nicht exprimiert	67
1.1	Die PsaD-Sequenzen aus <i>C. reinhardtii</i> , höheren Pflanzen und Cyanobakterien zeigen viele Übereinstimmungen	67
1.2	Kodiert die cDNA 4-3 für eine Untereinheit des PS I?	69
1.3	Die PS I-defekten Stämme CC1060, CC1051 und CC934 zeigen das gleiche differentielle Transkriptmuster	72

2. Analyse der Expression eines chimären <i>Lhcb1</i>/Reportergens in PS I-defekten Stämmen	74
2.1 Das Arylsulfatase-Gen aus <i>C. reinhardtii</i> eignet sich als Reportergen	74
2.2 Das <i>Lhcb1/Ars</i> -Gen wird in den Transformanten unterschiedlich stark exprimiert	75
2.3 Der <i>Lhcb1</i> -Promotor kann die <i>in vivo</i> Expression des Arylsulfatase-Gens vermitteln	76
2.4 Die Expression des chimären <i>Lhcb1/Ars</i> -Gens ist in PS I-defekten Stämmen und Wildtyp-Stämmen gleich	77
3. Die Transkriptionsraten verschiedener Photosynthese-Gene sind im PS I-defekten Stamm CC1060 und im Wildtyp CC410 ähnlich	78
4. Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation in <i>C. reinhardtii</i>	79
C. Die Expression nukleärer Gene in <i>C. reinhardtii</i> wird auf verschiedenen Ebenen reguliert	82
VI. Zusammenfassung	84
VII. Literatur	86
VIII. Anhang	103